

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MÉDECINE

Année 2010

N° 37

Implication des protéines anti-apoptotiques de la famille
Bcl-2 dans la dépendance aux signaux de survie
des cancers du sein des sous-types HER2 et Luminal.

THÈSE DE DOCTORAT

Ecole doctorale : Chimie Biologie

Discipline : Science de la vie et de la santé

Spécialité : Cancérologie

Présentée

et soutenue publiquement par

Mario Campone

Le 28 octobre 2010, devant le jury ci-dessous

Président : Professeur François-Régis Bataille, Centre Paul Papin,
Angers

Rapporteurs :

Professeur Henri Roché, Institut Claudius Regaud, Toulouse

Professeur Patrice Viens, Institut Paoli Calmettes, Marseille

Examineurs :

Professeur Pierre Fumoleau, Centre Georges-François-Leclerc, Dijon

Professeur Jean-Yves Pierga, Institut Curie, Paris

Directeur de Thèse : M. Juin Philippe

Sommaire

SOMMAIRE	4
INDEX DES FIGURES ET DES TABLES	7
<u>INTRODUCTION.....</u>	<u>9</u>
I -CARCINOGENESE ET VIABILITE CELLULAIRE	10
A-GENERALITES	10
B- PHENOTYPES TUMORAUX DE STRESS.....	11
1-Stress lié aux dommages de l'ADN/stress réplicatif	12
2-Stress protéotoxique.....	14
3-Stress mitotique.....	15
4-Le stress métabolique.....	16
5-Le stress Oxydatif.....	17
C-STRESS TUMORAL INDUIT PAR LES ONCOGENES OU REPRIME PAR LES VOIES DE SUPPRESSION TUMORALE	19
II-CIBLAGE ONCOGENIQUE.....	20
A-LE CIBLAGE THERAPEUTIQUE DES VOIES ADDICTIVES ONCOGENIQUE	20
B- LE CIBLAGE THERAPEUTIQUE DES VOIES ADDICTIVES NON ONCOGENIQUES.....	24
III- LE CIBLAGE DES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES	26
A-DESCRIPTION GENERALE DE LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE	26
B-LES VOIES INDUCTRICES DE L'APOPTOSE	28
1- La voie extrinsèques ou la voie des récepteurs de mort cellulaire.....	28
2-Voie intrinsèques ou la voie mitochondriale	30
C-L'EXECUTION DU PROGRAMME DE L'APOPTOSE : LES CASPASES	33
1-Activation des caspases	34
1-1-Généralités	34
1-2-Autres voies d'activation des caspases :	34
2-Les substrats des caspases	35
3-Régulation de l'activité des caspases	35
3-1-Les inhibiteurs de l'apoptose	36
3-2- Apoptotic Inducing Factor (AIF) et Endonucléase:.....	38
D-LA REGULATION DU PROGRAMME APOPTOTIQUE : LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL2.....	39
1-Généralités	39
2-Les protéines à mutidomains anti-apoptotiques.....	41
2-1-Fonction et structure.....	42
2-2-Mode de régulation de la fonction des protéines à multidomains anti-apoptotiques	44
2-2-1-Régulation par localisation subcellulaire	44
2-2-2-Modifications transcriptionnelles.....	45
2-2-3-Modification post traductionnelles	45
3- Les protéines à multidomains pro-apoptotiques :	46
3-1-Fonctionnalité et structure	46
3-2-Les modes de régulation de la fonctionnalité des protéines à multidomains pro-apoptotiques :	50
3-2-1-Sublocalisation :	50
a-Du cytosol à la face externe de la mitochondrie	50
b-Au niveau du réticulum endoplasmique.....	54
3-2-2-Modifications post-traductionnelles.....	54
a-Modification post-traductionnelle par phosphorylation	54
b-Modification post-traductionnelle par protéolyse	55

c-Modification post-traductionnelle par interaction avec des inhibiteurs.....	55
d-Modification post-traductionnelle par interaction avec des activateurs.....	56
•La protéine Bif-1 :	56
•La protéine ASC.....	57
•La prostaglandine E2 :	57
•Le facteur de transcription p53.....	57
4- Les protéines pro-apototiques à domaine BH3 ou BH3 only	60
4-1-Structure et fonction des protéines à domaine BH3 only :	61
4-2-Mode de régulation de l'activité des protéines BH3 only :	62
4-2-1-Au niveau transcriptionnelle :	62
4-2-2-Au niveau traductionnelle : stabilité et inhibition de l' ARNm.....	63
4-2-3- Au niveau post-traductionnelle:.....	63
a-Phosphorylation :	63
b-Protéolyse ou clivage	64
c-Localisation subcellulaire et séquestration	64
d-Facteurs de transcriptions.....	65
•Le facteur de transcription c-Myc :	65
•Le facteur de transcription E2F1 :	68
4-3-Modèle d'activation directe ou indirecte de l'apoptose:.....	70
4-3-1-Le modèle d'activation directe/interaction	71
4-3-2-Le modèle de déplacement/neutralisation.....	72
E-LE CIBLAGE THERAPEUTIQUE DES PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES.	75
IV- APPLICATION AU CANCER DU SEIN.....	80
A- INTRODUCTION.....	80
B-LA VOIE ONCOGENIQUE ADDICTIVE HER2 :	81
1-Signaux induits par l'activation de la voie oncogénique HER2	81
1-1-Généralités :	81
1-2-HER2 impliqué dans la carcinogenèse mammaire.....	84
1-2-1- Les données expérimentales.....	84
1-2-2-Les données cliniques	84
1-3-Signaux induits par l'activation de la voie oncogénique HER2	85
1-3-1- Les signaux de prolifération.....	85
1-3-2-Les signaux d'invasion.....	86
1-3-3- Les signaux de survie	87
2- Signaux induits par l'inactivation de la voie oncogénique HER2	87
2-1- Mécanismes d'action du trastuzumab.....	87
2-2-Les mécanismes de résistance au trastuzumab.	88
2-2-1-Défaut d'internalisation du complexe trastuzumab-récepteur	88
2-2-2-Constitution d'hétérodimères entre les membres de la famille HER.....	89
2-2-3-Interaction entre HER2 et autres récepteurs : IGF-R et c-Met	90
2-2-4-Les seconds messagers.....	90
3- La voie mTor :	91
3-1-Structure et fonction.....	91
3-1-1- Le complexe mTORC1 ou le complexe RAPTOR-mTOR.....	92
3-1-2-Le complexe mTORC2 ou le complexe RIPTOR-mTOR.....	94
3-2-Mode de régulation	95
3-2-1-Les voies des facteurs de croissance :	95
3-2-2-La voie LKB1-AMPK.....	98
3-2-3-La boucle de rétrocontrôle négative.....	99
3-3-Implication de mTORC1 dans la carcinogenèse	101
C -LA VOIE ONCOGENIQUE ADDICTIVE ER :	102
1- Signaux induits par l'activation de la voie oncogénique ER.....	103
1-1-La voie transcriptionnelle génomique directe ou initiation nucléaire du signal stéroïdien (NISS) :	103
1-2-La voie non génomique ou signalisation membranaire du signal stéroïdien : MISS:	105
2-Signaux induits par l'inactivation de la voie oncogénique ER.....	107

V-PROBLEMATIQUE :	110
A-« CHOCS ONCOGENIQUES » DANS LE CANCER DU SEIN HER2 ET LUMINAL	110
B- PROBLEMATIQUE RESULTATS ACQUIS : PROTEINES ANTI-APOPTOTIQUES ET VOIES ONCOGENIQUES DANS LES CANCERS DU SEIN	111
<u>PRESENTATION DES RESULTATS EXPERIMENTAUX.....</u>	<u>114</u>
<u>PARTIE I : MANUSCRIT.....</u>	<u>115</u>
<u>PARTIE II.....</u>	<u>157</u>
<u>DISCUSSION GENERALE</u>	<u>169</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>177</u>
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....</u>	<u>201</u>

Index des figures et des tables

FIGURE 1- REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROCESSUS DE CARCINOGENESE SELON SPORN ET SUH (2002).....	10
FIGURE 2- REPRESENTATION SELON LUO ET AL. (2009) ADAPTE DE HAHN AND WEINBERG, DES PROPRIETES ESSENTIELLES DES CELLULES CANCEREUSES : ONCOGENES ET NON ONCOGENES ADDICTION.	11
FIGURE 3- VOIE DE SIGNALISATION DE REPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN SELON HARPER ET ELLEDGE (2007).....	13
FIGURE 4- REPRESENTATION DU CERCLE VICIEUX SELON TRACHOOTHAM, ALEXANDRE ET PENG HUANG (2009).	18
FIGURE 5- CHOC ONCOGENIQUE ET THERAPIE CIBLEE.....	22
FIGURE 6 : L'ACTIVATION DE LA VOIE ONCOGENIQUE ADDICTIVE VA INDUIRE UN DESEQUILIBRE DES SIGNAUX EN FAVEUR DES SIGNAUX DE SURVIE (ROUGE) PAR RAPPORT AUX SIGNAUX DE MORT (VERT). CE DESEQUILIBRE VA S'INVERSER, « CHOC ONCOGENIQUE », EN FAVEUR DES SIGNAUX DE MORT APRES INHIBITION DE CETTE VOIE ONCOGENIQUE. IL S'AGIT D'UN MECANISME DYNAMIQUE AU COURS DU TEMPS D'APRES SHARMA ET SETTLEMAN (2007).....	23
FIGURE 7- ACTIVATION DE LA CASPASE 9 ET CONSTITUTION DE L'APOPTOSOME D'APRES HENGARTNER (2000).	32
FIGURE 8- ACTIVATION DE LA CASPASE 3 PAR L'APOPTOSOME D'APRES CAIN, BRATTON ET COHEN (2002).....	33
FIGURE 9- ACTIVATION DES CASPASES AU DECOURS DE L'APOPTOSE D'APRES HENGARTNER (2000).....	34
FIGURE 10- MEMBRES DE LA FAMILLE DES IAP D'APRES FULDA (2009).	37
FIGURE 11- INTERACTION ENTRE SMAC ET LES IAP D'APRES FULDA (2009).....	37
FIGURE 12- REPRESENTAION DES MEMBRES DE LA FAMILLE DES PROTEINES BCL-2 SELON ER ET AL.(2006).....	41
FIGURE 13- REPRESENTATION DU DOMAINE BH3 DE BAK DANS LA POCHE HYDROPHOBE DE BCL-XL ; D'APRES SATTLER ET AL. (1997).	43
FIGURE 14- STRUCTURE DE BAX D'APRES SUZUKI ET AL. (2000).....	48
FIGURE 15- REPRESENTATION DE L'INTERACTION MOLECULAIRE ENTRE HELICE 1 ET HELICE 2 D'APRES LALIER ET AL. (2007).....	48
FIGURE 16- STRUCTURE DE BAK A MIS EN EVIDENCE UNE POCHE HYDROPHOBE FORMEE PAR LES DOMAINES BH1 ET BH2 D'UN COTE ET BH3 DE L'AUTRE D'APRES MOLDOVEANU ET AL. (2006).	49
FIGURE 17- MODELE EXPLIQUANT L'ACTIVATION DE L'APOPTOSE MEDIEE PAR P53 SELON LE MODE NON TRANSCRIPTIONNEL D'APRES SPEIDEL (2010).	60
FIGURE 18- ANALYSE PHYLOGENIQUE DU DOMAINE BH3 DES MEMBRES DE LA FAMILLE DES PROTEINES BH3 ONLY D'APRES DAY ET AL. (2008).	61
FIGURE 19- IMPLICATION DE C-MYC DANS L'APOPTOSE SELON UN MODE P53 DEPENDANT ET INDEPENDANT D'APRES HOFFMAN ET LIEBERMANN (2008).	67
FIGURE 20- IMPLICATION DE C-MYC DANS LA CARCINOGENESE SELON DANG, O'DONNELL, ET JUOPPERI (2005).....	68
FIGURE 21- ACTIVITE REGULEE PAR P53 (A) ET E2F (B) D'APRES POLAGER ET GINSBERG(2009).	69
FIGURE 22- REGULATION DES ACTIVITES DE P53 PAR E2F D'APRES POLAGER ET GINSBERG (2009).....	70
FIGURE 23- COOPERATION ENTRE LA VOIE ARF-MDM2-P53 ET INK4-RB-E2F D'APRES POLAGER ET GINSBERG (2009).	70
FIGURE 24- MODELE ACTIVATION/INTERACTION DEFINI SELON CHONGHAILE ET LETAI (2008A).....	72
FIGURE 25 ACTIVATION DE BAK ET BAX SELON LE MODELE DE DEPLACEMENT D'APRES ADAMS ET CORY (2007).-	73
FIGURE 26- MODELISATION DE L'ECHAPPEMENT TUMORAL A L'APOPTOSE SELON LE MODELE DE CHONGHAILE ET LETAI (2008A).....	74
FIGURE 27-REPRESENTATION DES QUATRE MEMBRES DE LA FAMILLE HER SELON LEUR CONFORMATION NON ACTIVE ET ACTIVE, D'APRES BASELGA ET SWAIN (2009).	82
FIGURE 28- REPRESENTATION DES VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR L'ACTIVATION DE LA VOIE ONCOGENIQUE ADDICTIVE HER2 D'APRES BASELGA ET SWAIN (2009).....	83
FIGURE 29- REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CONSEQUENCES INDUITES PAR L'AMPLIFICATION DE HER2 D'APRES MOASSER (2007).	87
FIGURE 30- STRUCTURE DE MTOR D'APRES HAY ET SONENBERG (2004).	92
FIGURE 31- VOIE DE SIGNALISATION ACTIVANT ET MEDIEE PAR LES VOIES MTORC1 ET MTORC2 D'APRES GUERTIN ET. SABATINI (2007).	95
FIGURE 32- MODELE QUI POURRAIT EXPLIQUER L'ACTIVATION DE MTORC1 PAR AKT SELON GUERTIN ET SABATINI (2007).....	98
FIGURE 33- MTOR REGULANT LA VOIE PI3K/AKT SELON EFEYAN ET SABATINI (2010).	99
FIGURE 34- D'APRES CARRACEDO ET AL. (2008) MISE EN EVIDENCE DU RETROCONTROLE NEGATIF DE MTOR SUR AKT.	100
FIGURE 35- P53 ET PTEN REGULANT LA VOIE MTOR SELON EFEYAN ET SABATINI (2010).....	100
FIGURE 36- DEPTOR REGULANT LA VOIE MTOR SELON EFEYAN ET SABATINI (2010).....	101
FIGURE 37- REPONSE GENOMIQUE DIRECTE ET INDIRECTE SELON ARPINO ET AL. (2008).	105
FIGURE 38- REPONSE GENOMIQUE ET NON GENOMIQUE SELON ARPINO ET AL. (2008).	107

TABLEAU 1 :_DESCRIPTION DES DIFFERENCES, MORPHOLOGIQUES, BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUE ENTRE LES PHENOMENES DE MORT PAR NECROSE ET PAR APOPTOSE.	27
TABLEAU 2: AFFINITE DES PROTEINES A DOMAINE BH3 ONLY AVEC LES PROTEINES A MULTIDOMAINES ANTI-APOPTOTIQUES. ROUGE HAUTE AFFINITE, ORANGE FAIBLE AFFINITE, VERT AUCUNE AFFINITE D'APRES DENG ET AL. (2007).	72
TABLEAU 3: MOLECULES NATURELLES OU DE SYNTHESE BH3 EN DEVELOPPEMENT PRE-CLINIQUE ET CLINIQUE.	78

INTRODUCTION

I -Carcinogenèse et viabilité cellulaire

A-Généralités

Il existe actuellement un axiome en oncologie, qui définit la carcinogenèse comme un processus, progressif et multi-étapes. Ce processus (Sporn et Suh 2002) est guidé par l'acquisition, au cours du temps, d'une accumulation d'aberrations génétiques somatiques (mutation, amplification, délétion), mais aussi par une dysrégulation épigénétique (mécanismes de méthylation ou d'acétylation des gènes). La résultante de ces anomalies génétiques est l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs.

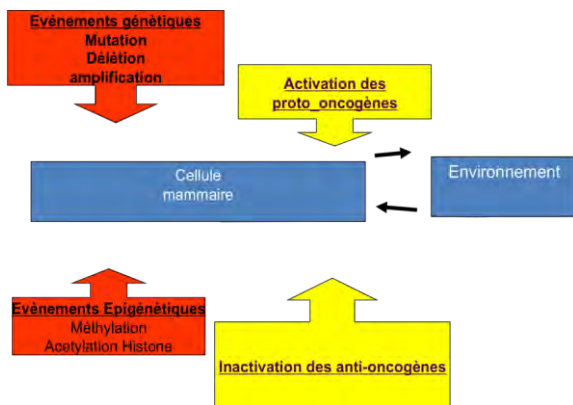


Figure 1- représentation schématique du processus de carcinogenèse selon Sporn et Suh (2002)

Ces gènes sont classés en deux catégories selon leur fonctionnalité (Weinstein et al. 1997; Weinstein 2000). La première catégorie regroupe les gènes impliqués dans le « circuit » de la régulation intercellulaire. La deuxième catégorie, regroupant quant à elle, les gènes impliqués dans les fonctions extracellulaires, c'est-à-dire dans l'interaction cellule tumorale et stroma. La première catégorie est, elle-même, sous-divisée en quatre sous catégories : (1) les gènes impliqués dans la réponse cellulaire aux stimuli extérieurs (gènes codant pour les facteurs de croissance, les récepteurs transmembranaires, les protéines kinases intracellulaires et les facteurs de transcriptions), (2) les gènes impliqués dans les mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN, (3) les gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, (4) les gènes impliqués dans le déterminisme cellulaire à savoir la différenciation cellulaire, la senescence et la mort cellulaire programmée (l'apoptose).

Par conséquent, le processus de carcinogenèse ne se définit pas seulement comme une sommation d'activation des oncogènes et une inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs mais comme la résultante d'un déséquilibre entre les mécanismes de réplication *de novo* et du déterminisme cellulaire.

Notre travail de thèse, présenté ici, porte plus précisément sur le rôle des processus de régulation de la mort cellulaire dans ce déséquilibre. L'apoptose en particulier participe aux mécanismes de surveillance tumorale (Lowe, Cepero et Evan 2004) et sa dysrégulation, par l'activation de mécanismes anti-apoptotiques, contribue à la progression tumorale et à la réponse aux traitements.

B- Phénotypes tumoraux de stress

Pourquoi les mécanismes régulant la viabilité cellulaire contribuent-ils tout autant à la carcinogenèse que les mécanismes qui régulent, par exemple, la prolifération ou les capacités métastatiques?

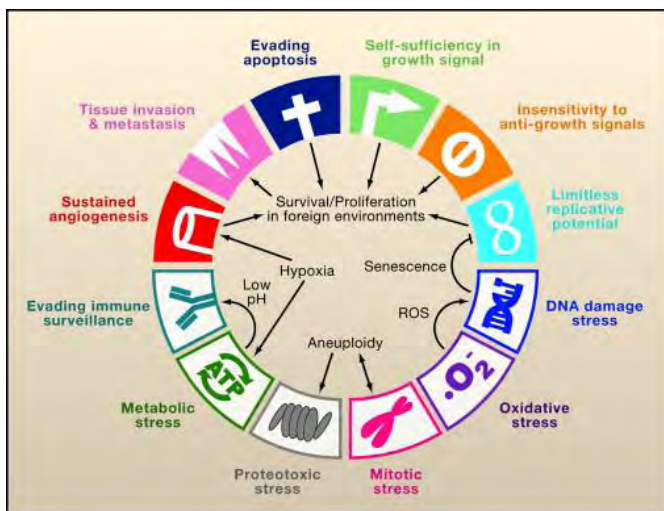


Figure 2- Représentation selon Luo et al. (2009) adapté de Hahn and Weinberg, des propriétés essentielles des cellules cancéreuses : oncogènes et non oncogènes addition.

Il apparaît que les cellules cancéreuses (Luo, Solimini et Elledge 2009) présentent une dépendance accrue aux signaux impliqués dans la réponse à différents stress cellulaires associés à la biologie même de la tumeur. Les auteurs parlent de « phénotype tumorale de stress ». Les gènes impliqués dans l'adaptation à ce type de stress ne sont pas impliqués dans l'initiation, mais dans les processus de promotion et de progression de la carcinogenèse.

La notion développée ci-dessous est que l'adaptation cellulaire qu'ils permettent est rendue nécessaire par la transformation oncogénique elle-même. Quels sont les stress qu'ils doivent contrecarrer ?

1-Stress lié aux dommages de l'ADN/stress réplcatif

La cellule somatique au décours du processus du cycle cellulaire va se diviser tout en dupliquant son matériel génétique. La cellule mère va donner naissance à deux cellules filles qui vont hériter fidèlement du même patrimoine génétique.

Cette transmission met en jeu des voies impliquant la réplication et la réparation de l'ADN. Les mécanismes de réparation de l'ADN sont représentés par *base excision repair (BER)*, *nucleotide excision repair (NER)*, *non homologous and joining repair (NHEJ)* et *homologous recombination (HR)*. La régulation du cycle cellulaire et l'intégrité du génome sont couplées par les mêmes mécanismes de surveillance.

Ces voies de régulations ne sont pas uniquement impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN ou à l'arrêt du cycle cellulaire mais aussi dans l'adressage des protéines de réparation de l'ADN au niveau du site du dommage, la composition chromatinienne et la taille des télomères et à l'induction de la mort cellulaire (Zhou et Elledge 2000).

La réponse aux dommages de l'ADN va mettre en jeu une voie de transduction médiée par des transducteurs, des effecteurs et des senseurs. Quatre classes de transducteurs ont été identifiées à ce jour. La première classe est constituée par les protéines de la famille *phospho-inositide kinase (PIK)*, *ataxia telangiectasia mutated (ATM)* et *ATM-rad3-related (ATR)*, la famille des protéines *checkpoints kinases 1 (Chk1)* et *2 (Chk2)* et enfin, par la famille des protéines *BCRT-repeat-containing proteine*. Le rôle de chacune de ces protéines n'est pas totalement élucidé. Les effecteurs exécutent leurs fonctions de réparation de l'ADN. Ces protéines incluent les substrats des protéines *PIK* et *CHK* comme BRCA1, Nbs1, p53 et Cdc25c.

Les protéines senseurs qui vont initier la réponse aux dommages de l'ADN sont la *poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)* et *DNA-proteine-kinase (ADN-PK)*. Les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN joue un rôle déterminant dans le maintien de l'intégrité du génome (Kinzler et Vogelstein 1997).

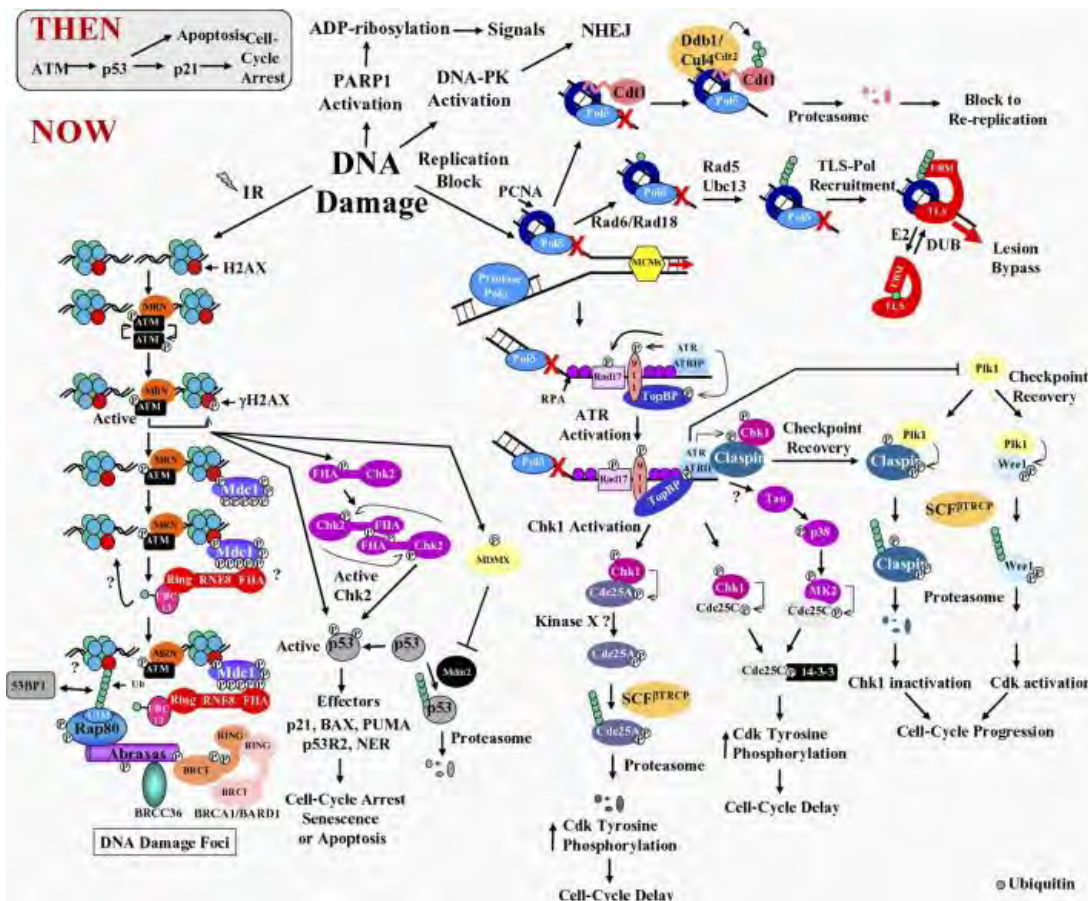


Figure 3- voie de signalisation de réponse aux dommages de l'ADN selon Harper et Elledge (2007).

À l'inverse de la cellule somatique, la cellule tumorale présente une grande instabilité génomique (mutation, délétion, réarrangement chromosomique) qui se traduit par une augmentation spontanée de dommages à l'ADN et d'un degré de stress réplcatif augmenté (Hartwell et Kastan 1994).

Ce niveau d'instabilité est lié en grande partie à un niveau constitutif de dommages à l'ADN endogène ce qui va induire l'activation de la voie de réponse de dommages à l'ADN. Les niveaux élevés de dommages à l'ADN observés dès les stades précoces tumoraux sont liés à plusieurs facteurs.

Le premier facteur est le raccourcissement des télomères et une activité de la télomérase non suffisante. Cette situation va conduire à l'apparition de cassures double-brin (CDB) à l'extrémité *end* des télomères initiant des fusions de ces extrémités (cassure-fusion-pont) et se traduisant par des translocations et des amplifications géniques (Maser et DePinho 2002).

Il a été démontré que l'activation d'un oncogène, par des mécanismes d'hyper-réplication, dans les lésions précancéreuses pouvait induire des CDB et donc de l'instabilité génomique (Di Micco et al. 2006).

Enfin, la mutation des gènes impliqués dans le programme de réparation de l'ADN (ATM, Chk1, BCRA1, BCRA2,.....) peut conduire à une augmentation des dommages de l'ADN, une progression inappropriée du cycle cellulaire et une instabilité génomique (Harper et Elledge 2007; Negrini, Gorgoulis et Halazonetis 2010).

Dans une cellule normale les dommages liés à l'ADN induisent un arrêt de prolifération et une mort cellulaire par sénescence ou par apoptose. Quant à la cellule cancéreuse, elle évolue en continuant à se répliquer, surmontant l'arrêt de la prolifération induit par les dommages à l'ADN sans nécessairement diminuer la cause de ces dommages.

2-Stress protéotoxique

L'homéostasie protéique est régulée par la voie des protéines du choc thermique HSP). Cette régulation va impliquer un contrôle à différents niveaux comme la régulation de l'importation des protéines dans le compartiment intracellulaire, le repliement des protéines, la dégradation des protéines instables (protéasome), la dissolution des complexes protéiques, la prévention de l'agrégation des protéines. Cette voie de régulation est fréquemment activée au sein de la tumeur.

L'aneuploïdie favorise la tumorigenèse par modification de l'équilibre entre les signaux de croissance et de survie cellulaire. Les altérations de la transcription (Torres et al. 2007a; Tsafrir et al. 2006) vont produire des déséquilibres stœchiométriques des complexes protéiques (Papp, Pál, et Hurst 2003). La voie du choc thermique est activée dans de nombreuses tumeurs via sa fonction de repliement des protéines (Whitesell et Lindquist 2005a).

Les déséquilibres impliqués par un stress protéotoxique vont favoriser le dépliement et l'inhibition de la dégradation de ces complexes protéiques (Denoyelle et al. 2006).

Nous venons de voir que les signaux de stress protéotoxique sont médiés en partie par la voie de réponse aux chocs thermiques mais aussi par le système ubiquitine-protéasome de dégradation des complexes protéiques.

Le protéasome est une protéinase multimérique impliquée dans l'élimination des protéines anormales, âgées ou en excès, dont l'accumulation serait toxique.

Il assure aussi la production des peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH de classe I, la destruction de nombreux régulateurs cellulaires ainsi que la maturation de différents précurseurs polypeptidiques.

Par conséquent le protéasome est impliqué dans tous les processus cellulaires majeurs tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la réponse immunitaire adaptative.

La dégradation des protéines par le protéasome peut être réalisée selon deux voies. Une voie indirecte qui va impliquer une étape préliminaire par modification post-transductionnelle du substrat par une réaction de poly-ubiquitination ou par une voie directe sans cette étape préliminaire.

La protéolyse dépendant de l'ubiquitination va faire intervenir 3 types d'enzyme : *ubiquitin-activating enzyme* ou E1, *ubiquitin-conjugating enzyme* ou E2 et *ubiquitin ligase* ou E3 (Hershko et Ciechanover 1998) (Joazeiro et Weissman 2000). E1 active l'ubiquitine de manière ATP dépendante et permet le transfert de l'ubiquitine par une liaison thiol-ester à la protéine E2. L'ubiquitine ainsi transférée sur E2 à un résidu lysine de la protéine substrat requiert l'activité de la ligase E3. Les protéines poly-ubiquitinilées sont alors reconnues par la fraction 26s du protéasome et rapidement dégradées. La ligase E3 semble jouer un rôle déterminant dans la régulation de la progression du cycle cellulaire ainsi que dans la tumorigenèse. Nous savons que la protéine MDM2, qui agit comme une ubiquitine ligase E3, va réprimer ainsi les fonctions p53 dépendantes (Kubbutat, Jones et Vousden 1997; Haupt et al. 1997; Honda, Tanaka, et Yasuda 1997).

3-Stress mitotique

Komarova et al. (2002) définit le phénotype d'instabilité chromosomique par une augmentation du taux de chromosomes de mis-ségrégation. Cette instabilité résulte d'une modification de la distribution des chromosomes, permettant ainsi à la cellule tumorale d'évoluer rapidement. Ce phénotype implique un défaut des voies de contrôle de la mitose.

Notamment des protéines impliquées (Cahill et al. 1998) dans le contrôle de la ségrégation des chromosomes et l'assemblage du fuseau mitotique à l'entrée de l'anaphase.

De nombreux auteurs pensent que cela est dû au degré remarquable de l'aneuploïdie et aux altérations de la transcription fréquemment présentes dans les tumeurs solides (Ganem, Storchova et Pellman 2007; Torres, Williams et Amon 2008; Williams et al. 2008).

Nos propres travaux (étude transcriptomique et protéique) ont démontré que l'expression de UBE2C ou UbCH10 au diagnostique est un facteur de mauvais pronostic et impacte négativement sur la survie des patientes (Campone et al. 2008 ; Jézéquel et al. 2009 ; Loussouarn et al. 2009).

Le complexe APC (*anaphase-promoting complex /cyclosome*) qui agit comme une ligase E3 lors de la mitose, induit une dégradation des cyclines dépendant du cycle cellulaire et permet ainsi la progression du stade de la métaphase à l'anaphase (Haupt et al. 1997) . E2 joue aussi un rôle important dans la régulation de la progression du cycle cellulaire. Il a été démontré que UbCH10 est nécessaire pour l'ubiquitination du complexe APC (King et al. 1995; Aristarkhov et al. 1996; Yu et al. 1996). La perte d'expression de UBE2C induit la dégradation des cyclines impliqué dans la mitose et une accumulation des cellules en mitose (Townesley et al. 1997).

De plus, le phénotype d'instabilité chromosomique pourrait résulter de la présence de centrosomes supplémentaires dans les cellules tumorales (Ganem, Storchova et Pellman 2007). Cependant, les causes précises de stress mitotique que connaissent les cellules tumorales demeurent mal cernées.

4-Le stress métabolique

Contrairement à la cellule normale qui génère son énergie (ATP) par des réactions de phosphorylation oxydative mitochondriale, la plupart des cellules cancéreuses utilisent la voie de la glycolyse (glycolyse aérobie) et cela, même en présence d'oxygène. Ce phénomène de détournement métabolique est appelé « l'effet Warburg » (WARBURG 1956). Bien que moins efficace, la glycolyse aérobie semble toutefois avantageuse pour les cellules cancéreuses.

En fait, l'effet Warburg faciliterait la captation et l'incorporation d'éléments nécessaires au renouvellement cellulaire (par exemple, les nucléotides, acides aminés et lipides) plutôt que le rendement énergétique.

Les cellules tumorales présentent de façon spectaculaire une augmentation de la capture du glucose et un taux très élevé de glycolyse (DeBerardinis et al. 2007). Cette transition vers la glycolyse pour la production d'énergie offre plusieurs avantages à la tumeur (Kroemer et Pouyssegur 2008).

5-Le stress Oxydatif

La principale caractéristique du stress oxydatif est la présence de composés ROS (*Reactive Oxygen Species*). Les cellules tumorales présentent fréquemment un taux intracellulaire élevé de ROS (Szatrowski et Nathan 1991) par rapport aux cellules normales. Une production modérée de composés ROS induit une prolifération et une différenciation cellulaire (Boonstra et Post 2004 ; Schafer et Buettner 2001) alors qu'une production excessive va induire des dommages oxydatifs sur l'ADN, les protéines et les lipides (Perry et al. 2000).

Ces dommages induiront alors une dysrégulation des signaux de transduction impliqués dans la prolifération, la différenciation, la transition épithélio-mésenchymateuse et la survie cellulaire.

L'homéostasie des composés ROS est indispensable à la prolifération et à la survie cellulaire. La production est contre balancée par l'élimination de ces composés par le système dit *ROS-scavenging* comprenant les *superoxide dismutase*, *glutathionne peroxidase*, *peroxiredoxines*, *glutaredoxine*, les *thioredoxine* et les *catalases*.

Ce taux élevé des composés ROS joue un rôle essentiellement dans les événements d'initiation et de progression tumorale.

Par conséquent, une élévation des composés ROS peut être liée soit à une augmentation de la production ou à une diminution de l'élimination. Il est décrit une voie endogène et exogène dans la production des composés ROS.

Les facteurs intrinsèques sont représentés par l'activation d'oncogènes (Ras, c-MYC, Bcr-Abl), par des anomalies du métabolisme, un dysfonctionnement mitochondriale ou une perte de fonction de p53 (voir plus loin).

Le gardien du génome, p53, joue un rôle crucial dans la prévention des dommages oxydatifs de l'ADN nucléaire ou mitochondriale.

Toute perte de fonction va induire des dommages et accentuer l'instabilité génomique. Nous pouvons parler alors d'un véritable cercle vicieux. La surproduction des composés ROS qui va induire des dommages à l'ADN et par conséquent augmenter l'instabilité génomique.

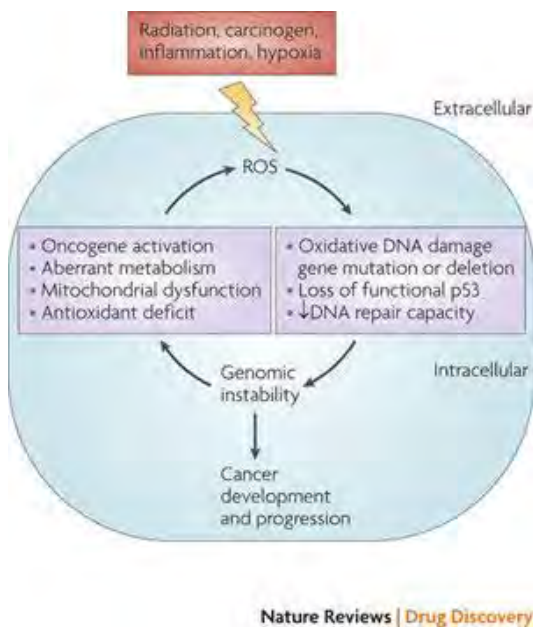


Figure 4- représentation du cercle vicieux selon Trachootham, Alexandre et Peng Huang (2009).

Les facteurs exogènes de stress sont représentés par les cytokines pro-inflammatoires, par un déficit en nutriment et un milieu hypoxique. Au décours de la carcinogenèse, sous l'effet des facteurs de stress endogènes et exogènes, il existe une accumulation des composés ROS au niveau cellulaire induisant des dommages létaux au niveau de cellules ne pouvant répondre ou s'adapter de manière adéquate au message de stress oxydatif. Certaines cellules néoplasiques en présence des composés ROS vont adopter une réponse adaptée en activant les facteurs de transcription d'oxydo-réduction comme le facteur nucléaire kB (NF-kB) et Nrf2, conduisant à une augmentation de l'expression des enzymes *ROS-scavenging*, comme la superoxyde dismutase et de glutathion, par l'expression des protéines de survie tels que Bcl-2 et Mcl-1, et l'inhibition des caspases.

Les dommages de l'ADN comme nous l'avons vu plus haut, liés aux composés ROS vont augmenter le nombre de mutations de l'ADN (instabilité génomique) et promouvoir un nouveau mécanisme d'adaptation de réponse au stress oxydatif.

Les facteurs de transcription induits par les complexes ROS sont déterminants dans l'expression des gènes de prolifération, de l'échappement à la sénescence, de l'angiogenèse et de l'invasion. Par conséquent, l'adaptation au stress d'oxydo-réduction favorise le développement du cancer.

C-Stress tumoral induit par les oncogènes ou réprimé par les voies de suppression tumorale

La plupart des stress décrits ci-dessus affectent négativement la viabilité cellulaire à moins que des mécanismes de survie compensatoires n'interviennent. Ces mécanismes sont particulièrement critiques pour la survie des cellules transformées parce que ces stress sont intrinsèquement associés au processus de transformation. Au-delà du fait qu'ils puissent être favorisés dans les tumeurs par le contexte de la croissance tumorale (hypoxie, par exemple), ils peuvent, en effet, directement découler de l'activation de voies oncogéniques ou de la perte de voies de suppression tumorale.

Des mutations de Ras (activatrices), et p53 (inactivatrices), ont été proposées pour contribuer au phénotype de stress mitotique (Denko et al. 1994). Comme décrite au chapitre précédent, la réponse au stress réplicatif, métabolique, oxydatif, est en partie sous le contrôle du gène suppresseur p53.

En réponse à ces différents signaux de stress, l'expression de p53 va être augmentée et va réguler l'expression positivement ou négativement de plus de 500 gènes qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération, de la production de ROS, la réparation des dommages liés à l'ADN, la mort cellulaire (Olovnikov, Kravchenko et Chumakov 2009). p53 va jouer un rôle déterminant dans la régulation des signaux du stress métabolique.

Il participe à l'homéostasie métabolique cellulaire en maintenant une activité optimale du métabolisme du glucose. p53 va stimuler la production énergétique impliquant la chaîne respiratoire mitochondriale en réponse à une carence en ATP.

Nous pouvons alors comprendre aisément qu'une perte d'expression de p53 induira l'absence de réponse adéquate aux signaux de stress oxydatif et métabolique. Les conséquences seront une augmentation de l'instabilité génomique d'une part et d'autre part la prédominance de la glycolyse aérobie par l'effet Warburg (Wenzhe Ma et al. 2007) dans la cellule cancéreuse.

L'activation des oncogènes participe aussi à l'instabilité génomique.

La voie oncogénique RAS (Lee et al. 1999) est également directement impliquée dans la production de composés ROS conduisant à la sénescence cellulaire. Cela a également été décrit pour c-Myc.

Nous verrons dans la suite de notre exposé que certains oncogènes ont la capacité d'induire des signaux pro-apoptotiques.

II-Ciblage oncogénique

A-Le ciblage thérapeutique des voies addictives oncogénique

Les données évoquées ci-dessus mettent en avant, en théorie tout au moins, divers types de faiblesses abritées par les cellules tumorales, offrant tout autant d'opportunités thérapeutiques.

Elles mettent en avant la notion que les voies oncogéniques ou la perte de voies de suppression tumorale, n'ont pas un effet univoque sur la biologie de la cellule tumorale.

Elles n'affectent pas uniquement la survie ou la prolifération cellulaire mais elles induisent plutôt des signaux antagonistes de survie, de mort, d'arrêt et de prolifération. Cela implique que la cellule tumorale est beaucoup plus sensible et dépendante pour sa survie aux mécanismes d'adaptation aux signaux de stress que la cellule normale.

Ceci permet de mieux comprendre le phénomène d'addiction oncogénique apparente qui est la base des approches thérapeutiques ciblant des oncogènes.

L'expression « oncogène addiction » décrit le fait qu'une tumeur est sous la dépendance d'un nombre limité d'oncogènes (Weinstein 2002). Ce processus a été démontré *in vivo* pour un certain nombre d'oncogène. Par exemple, dans des modèles de d'induction de c-Myc chez la souris.

L'expression de c-Myc induit des papillomes cutanés, des ostéosarcomes, des lymphomes qui régressent quand l'expression de c-MYC est abolie (Felsher et Bishop 1999; Jain et al. 2002; Pelengaris et al. 1999). De même que la dépendance aux gènes H-Ras et Bcr-Abl a été démontrée dans des modèles murins de mélanome et de leucémies (Chin, Momand, et Pfeifer 1997; Huettnet et al. 2000).

La mise sous silence des mutations de K-RAS, des lignées humaines de cancer du colon, permet de reverser le phénotype malin et inhibe le développement des cancers K-Ras dépendant chez la souris *nude*. De ce fait, toute inhibition de ces oncogènes va être déterminant dans la stratégie thérapeutique comme cible thérapeutique. Cette stratégie est actuellement validée pour un certain nombre d'oncogènes (kinase) tels que l'imatinib pour Bcr-Abl, l'erlotinib et le gefitinib pour HER1 et le trastuzumab pour HER2.

L'ensemble de ces phénomènes sont comparables : les cellules tumorales sont beaucoup plus dépendantes de l'activité de la voie oncogénique qui y prédomine que les cellules normales (Weinstein et Joe 2006).

Ceci permet de comprendre que l'activation par cette voie oncogénique dominante va induire des signaux opposés (pro-apoptotique, anti-apoptotique, prolifération ou arrêt cellulaire), mais que seuls les signaux de prolifération et de survie cellulaire seront prépondérants. Cette voie oncogénique dominante représente le «talon d'Achille » de la cellule tumorale (Evan et Littlewood 1998 ; Evan 2006a).

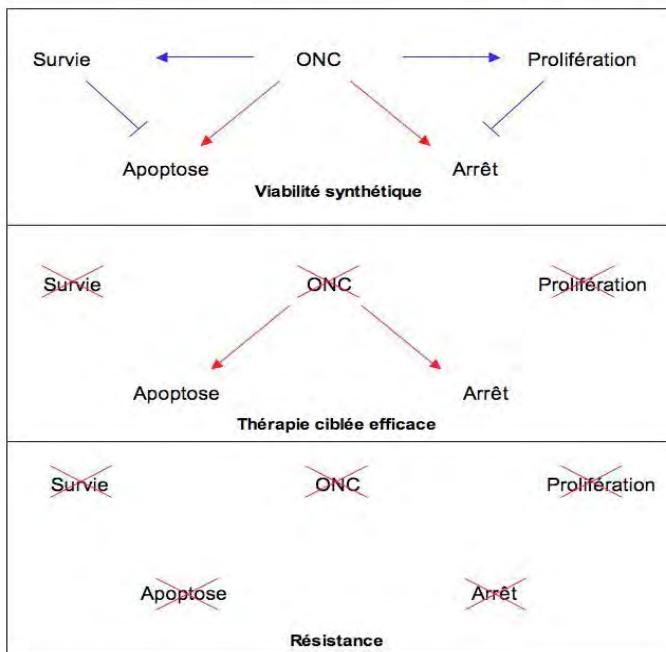


Figure 5- Choc oncogénique et thérapie ciblée.

Haut : au sein d'une cellule tumorale, un seul oncogène induit divers signaux antagonistes. Ceux-ci sont synthétiquement viables et les effets oncogéniques (prolifération et survie illustrés ici) dominant

Milieu : lorsque cet oncogène est inhibé de manière aiguë, un déséquilibre entre différents signaux se crée, favorisant les signaux d'arrêt et de mort suffisamment longtemps pour obtenir un effet thérapeutique d'autant plus efficace que l'oncogène ciblé est, au départ, actif.

Bas : une résistance peut avoir lieu (en particulier dans des cas d'inhibition prolongée de l'oncogène) si cette inhibition ne préserve pas les signaux de suppression tumorale induits par l'oncogène.

Cette fragilité est mise à profit en clinique par le développement d'agents thérapeutiques (inhibiteur de kinase) qui vont inhiber cette voie oncogénique « addictive ». Ces thérapies vont induire un « choc oncogénique » (Sharma et al. 2006). L'induction de ce choc, qui est dynamique au cours du temps, va provoquer un déséquilibre de signaux qui, cette fois ci, se fera en faveur des signaux d'arrêt et de mort cellulaire.

Une résistance peut avoir lieu si cette inhibition ne préserve pas les signaux de suppression tumorale ou d'arrêt de prolifération, induits par l'oncogène.

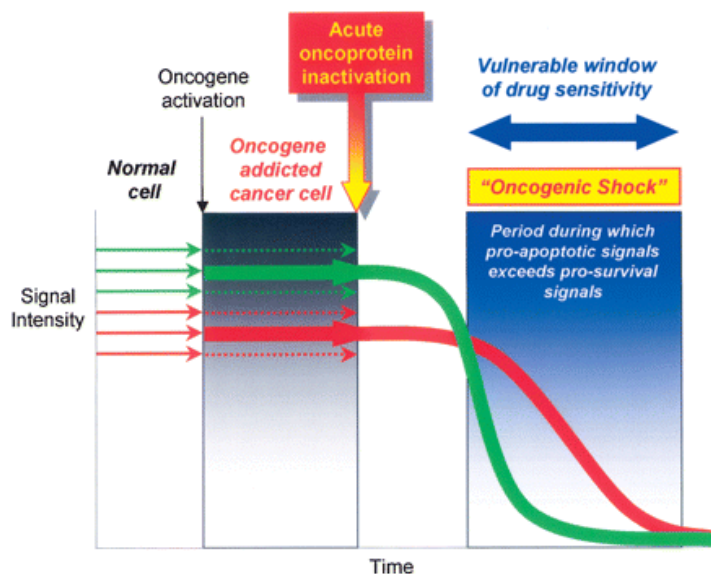


Figure 6 : L'activation de la voie oncogénique addictive va induire un déséquilibre des signaux en faveur des signaux de survie (rouge) par rapport aux signaux de mort (vert). Ce déséquilibre va s'inverser, « choc oncogénique », en faveur des signaux de mort après inhibition de cette voie oncogénique. Il s'agit d'un mécanisme dynamique au cours du temps d'après Sharma et Settleman (2007).

Dans le même ordre d'idée, les cellules tumorales sont sensibles aux effets antiprolifératifs des gènes suppresseurs de tumeurs (hypersensibilité aux gènes suppresseurs de tumeurs).

Contrairement aux oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs vont prévenir une prolifération aberrante, la survie ou l'instabilité génomique. La perte d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs par délétion, mutation inactivatrice, ou par mise sous silence (contrôle épigénétique) va contrôler le phénotype tumoral. La ré-introduction de ce gène peut induire une régression des tumeurs. Ce concept a été démontré à partir de modèles murins en réactivant l'expression de p53 (Martins, Brown-Swigart et Evan 2006; Ventura et al. 2007). Pharmacologiquement, il est plus difficile de restaurer ou d'induire l'expression d'un gène suppresseur de tumeur qui est muté ou absent. Dans les cas où un suppresseur de tumeur régule négativement l'activité d'un proto-oncogène, des médicaments ciblant ce proto-oncogène devrait se révéler efficace. Par exemple, les tumeurs qui ont perdu le gène suppresseur de tumeur PTEN, qui agit normalement en inhibant la PI3K, tout agent qui inhiberait la PI3K, doit restaurer une activité PTEN dépendante.

De même, lors de la perte de Rb, p16, p21 et p27, qui sont des protéines clef dans la régulation du cycle cellulaire, toute inhibition des kinases dépendantes des cyclines (CDK) doit induire un signal d'arrêt du cycle cellulaire.

La conséquence directe de ces constatations est d'ordre thérapeutique. Pour améliorer l'index des thérapeutiques des thérapies ciblées dans la prise en charge du cancer en général et du sein en particulier, il est capital d'identifier les signaux qui sont et qui seront mis en jeu lors de l'activation et de l'inactivation de la voie oncogénique dominante.

B- Le Ciblage thérapeutique des voies addictives non oncogéniques.

D'un point de vue général, le concept de voie addictive non oncogénique a été formulé par Elledge (Luo, Solimini et Elledge 2009). Fait important, ces gènes et ces voies sont essentielles pour maintenir le phénotype oncogénique des cellules cancéreuses, mais ne sont pas nécessaires pour assurer la viabilité des cellules normales.

D'un point de vue purement thérapeutique, ces voies de dépendance sont autant de cibles potentielles qui induiront, lors de leur inhibition, la mort de la cellule tumorale selon le génotype tumoral sous jacent. Des études conduites chez la levure semblent étayer cette notion. Par exemple, certaines mutations impliquant des gènes régulant la prolifération cellulaire sont associées à certaines autres mutations. Collins rapporte pour une mutation donnée six mutations associées (Collins et al. 2007). Par conséquent, comme une tumeur présente plusieurs altérations génétiques, chacune de ces altérations ira de paire avec la perte de fonction d'un second gène qui induira un phénotype de survie.

La protéine de ce second gène devient alors une cible thérapeutique de choix. Les gènes impliqués dans les voies « addictives » non oncogéniques sont deux types : intrinsèques et extrinsèques. Les gènes intrinsèques sont impliqués dans le maintien de l'autonomie de la tumeur (stress de réplication, stress mitotique, stress protéo-toxique, stress métabolique et stress oxydatif) et les gènes extrinsèques (cellules du stroma et vasculaires) sont impliqués dans les interactions avec le microenvironnement. Selon ce modèle, il existe, en principe, deux approches pour exploiter cette dépendance et tuer sélectivement les cellules tumorales.

La première approche dite « de sensibilisation au stress », consiste à diminuer les signaux d'adaptation aux voies de stress. La cellule tumorale ne peut plus faire face aux signaux de stress, sous la dépendance de ses oncogènes et soit cesse de proliférer, soit initie son programme de mort cellulaire par apoptose ou nécrose.

La deuxième approche, dite « de surcharge au stress », vise à accentuer les signaux de stress oncogénique ce qui freine la croissance ou la mort cellulaire. Ces deux approches vont perturber l'équilibre entre les signaux pro-et antiapoptotique au détriment des cellules tumorales.

Nous illustrerons nos propos par trois exemples.

Le premier exemple est lié à l'activité de la protéine chaperonne HSP 90 qui est impliquée dans l'adaptation aux signaux de stress protéo-toxique. Cette protéine peut être inhibée par la geldanamycine (inhibiteur de l'activité ATPase).

Bien que l'activité de cette molécule a été attribuée à la déstabilisation des complexes HSP90-CDK4 et HSP90-HER2 impliqués dans la prolifération cellulaire, il est possible que la sensibilisation des cellules tumorales à des concentrations élevées de stress protéo-toxique conduit à son efficacité (Whitesell et Lindquist 2005b). Le deuxième exemple implique le protéasome. Le protéasome comme nous l'avons décrit plus haut est impliqué dans la réponse au stress protéo-toxique. Des données pré-cliniques ont démontré que la présence d'un chromosome supplémentaire est suffisante pour augmenter la sensibilité des cellules de levure à des inhibiteurs du protéasome (Torres et al. 2007b) comme le bortezomib (Richardson et al. 2006). Il est susceptible de stabiliser de nombreuses protéines. Il est suggéré que l'activité anti-tumorale du bortezomib serait liée à la stabilisation d'un sous-ensemble particulier de protéines. Toutefois, il est également probable que ces résultats soient liés à une «surcharge en stress» (Nikiforov et al. 2007a). Le troisième exemple implique la polymérase poly-ADP-ribose (PARP1), une enzyme qui est impliquée dans la réparation des cassures simple-brin (Bryant et al. 2005; Farmer et al. 2005). Nous savons que de nombreux agents cytotoxiques induisent des dommages à l'ADN.

Il est alors logique de penser qu'inhiber les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN va potentialiser l'effet de ces thérapeutiques. Ce propos est illustré par les cancers du sein présentant une mutation de BCRA2.

Ces tumeurs présentent une altération de la réparation de recombinaison homologue de l'ADN. De plus, elles sont dépendentes fortement d'autres formes de mécanismes de réparation de l'ADN tels que la réparation par excision de base impliquant PARP1. La conséquence est que ces cancers doivent être très sensibles aux inhibiteurs de PARP1. La dépendance des cancers présentant une mutation BRCA2, à l'activité de PARP1, fait actuellement l'objet d'études cliniques.

Plus spécifiquement à la lumière de toutes ces constatations, le ciblage des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 nous semble une approche thérapeutique tout particulièrement opportune dans la prise en charge du cancer du sein.

III- Le ciblage des protéines anti-apoptotiques

A-Description générale de la mort cellulaire par apoptose

La mort cellulaire est un processus physiologique. Elle est impliquée dans l'homéostasie des tissus, la régulation de la diversité cellulaire au sein d'un organisme, l'embryogenèse et *in fine* elle veillera à l'intégrité du génome. Il n'existe pas une mort cellulaire mais des «morts cellulaires» qui se différencient selon des critères morphologiques, biochimiques, en fonction de la survenue et du déroulement du processus létal (programmé ou accidentel). Il est actuellement décrit la mort cellulaire de type 1 ou l'apoptose, la mort cellulaire de type 2 ou l'autophagie, la mort cellulaire de type 3 ou nécrose et des morts cellulaires atypiques (anoikis, catastrophe mitotique, dégénérescence wallérienne, entose, excito-toxicité). L'autophagie est un mécanisme de survie qui peut aboutir à une mort cellulaire en réponse à une privation de nutriments qui va mettre en jeu un processus catabolique (dégradation lysosomiale) aboutissant à la dégradation des organelles et de certaines protéines (longue durée de vie). La nécrose cellulaire est un mécanisme de mort accidentel qui est déclenché par différents facteurs (mécanique, thermique, chimique) et qui se caractérise morphologiquement par une rupture de la membrane plasmique. Le contenu intracellulaire est alors libéré dans l'environnement et déclenche une réponse inflammatoire.

L'apoptose décrite dans les années 1970 par Kerr (Kerr, Wyllie et Currie 1972) se définit comme le processus de mort cellulaire naturelle, physiologique et programmée qui s'oppose point par point à la mort accidentelle par nécrose.

Nécrose	Apoptose
Morphologie	
*perte de l'intégrité membranaire *floculation de la chromatine *gonflement et lyse de la cellule *pas de vésicules, lyse complète *désintégration de la cellule et des organites	*bourgeonnement de la membrane *condensation de la chromatine *rétrécissement cellulaire *formations de vésicules (corps apoptotiques) *les organites restent intacts
Biochimie	
*perte des homéostasies ioniques *pas de besoin énergétique *digestion aléatoire de l'ADN (dégradation uniforme visible en électrophorèse) *fragmentation de l'ADN post-lyse cellulaire	*processus extrêmement régulé au niveau cytoplasmique *dépendant en ATP *dégradation spécifique de l'ADN en échelle visible après électrophorèse *fragmentation de l'ADN pré-lytique
Physiologie	
*mort par groupe de cellules *provoquée par des phénomènes non physiologiques *phagocytose par des macrophages *réponse inflammatoire	*mort d'une seule cellule *induite par des conditions physiologiques *phagocytose par cellules adjacentes et macrophages *pas de réponse inflammatoire

Tableau 1 : Description des différences, morphologiques, biochimiques et physiologique entre les phénomènes de mort par nécrose et par apoptose.

L'apoptose se caractérise au niveau cellulaire par des modifications morphologiques et biochimiques spécifiques. Morphologiquement, on assiste à la condensation et à la fragmentation du contenu nucléocytoplasmique. La cellule finit par emballer ses contenus dans de petites vacuoles appelées corps apoptotiques qui seront phagocytés par les macrophages sans induire de réaction inflammatoire, ni de cicatrice fibreuse.

D'un point de vue biochimique, après transduction du signal de mort cellulaire, on note, d'une part, une élévation du calcium intracellulaire, de l'inositol triphosphate, de l'AMPc et, d'autre part, l'activation d'enzymes calcium dépendants (endonucléases, protéases, transglutaminases) aboutissant à la fragmentation de l'ADN, à la production de radicaux libres et à l'acidification du pH intracellulaire. Classiquement, cette mort cellulaire programmée se déroule en trois étapes : l'induction, l'engagement et l'exécution (dégradation).

B-Les voies inductrices de l'apoptose

Les stimuli pouvant induire un message de mort cellulaire sont multiples. Ils peuvent être physiologiques, liés à des dommages induits par un choc thermique, une infection virale, des toxines bactériennes, des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs ou bien par des agents thérapeutiques.

A l'issue des stimuli, les voies de transduction du signal sont nombreuses. Elle peut être activée par l'induction de dommages de l'ADN engendrés par les agents cytotoxiques (voie médiée par p53), mais également par des récepteurs transmembranaires, comme les récepteurs de la super famille TNF comprenant FAS, TNF-R et DR3. La voie médiée par les récepteurs de mort cellulaire est décrite comme la voie d'induction extrinsèque et la voie mitochondriale comme la voie intrinsèque.

1- La voie extrinsèques ou la voie des récepteurs de mort cellulaire

Les récepteurs de mort cellulaire ont comme caractéristique commune de posséder, à leur extrémité C-terminale, une région intracellulaire appelée "domaines de mort" ou *Death Domain (DD)*.

Le récepteur Fas, ainsi que son ligand Fas-L, sont exprimés à la surface des cellules immatures et compétentes du système immunitaire (macrophages, lymphocytes cytotoxiques). Il assure une fonction de sélection des clones auto-réactifs au sein du thymus par leur élimination et favorise la réponse cytotoxique en induisant l'apoptose des cellules exprimant Fas.

Après liaison de Fas-L à son récepteur Fas au niveau de la cellule cible, ce dernier s'oligomérise en un trimère. Activé, ce complexe est capable, désormais, de fixer par son domaine *DD* une protéine adaptatrice *FADD* (*FAS Associated Domain*).

Cette protéine ne possède pas uniquement un domaine *DD*, mais aussi un domaine *DED* (*Death effector Domain*) à son extrémité N-terminale.

Ce domaine *DED* permettra à l'ensemble du complexe d'activer la caspase 8, par autoclivage, en fixant par le domaine *DED* la procaspase 8. Fas/Fas-ligand peut activer l'apoptose par une seconde voie.

A son extrémité C-terminale peut se fixer la protéine Daxx par les domaines *DD* s'ensuivra l'activation d'une protéine kinase Ask1 (extrémité N-terminale) qui activera à son tour les kinases impliquées dans la transduction du signal de la voie c-Jun kinase.

En ce qui concerne le récepteur TNF, les choses sont très semblables : après liaison du TNF au récepteur TNF-R (Nagata 1997), son domaine de mort fixe une molécule adaptatrice dite *TRADD* (*TNF-R Associated Death Domain*). La protéine *TRADD* peut aussi s'associer par son *DD* soit à la protéine *FADD* activant caspase 8 ou bien au complexe *RIP* (*Recepteur Interacting Protein*). La protéine *RIP* est une sérine/thréonine kinase qui possède à son extrémité C-terminale un domaine *DD* et à son extrémité N-terminale l'activité kinase.

RIP s'associe à la procaspase 2 par l'intermédiaire de la protéine *RAIDD* (*RIP associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a Death Domain*). Elle peut s'associer aussi à la protéine *TRAF 2* (*TNF-R Associated Factor 2*) qui fixe à son tour la protéine kinase Ask1 permettant la transduction du signal par la voie c-Jun kinase/c-jun (l'expression du facteur de transcription AP) favorisant l'apoptose.

Ce même complexe peut générer un signal de survie impliquant l'activation du facteur de transcription NF- κ B par dissociation de l'hétérocomplexe IKK β / NF- κ B. Un même signal peut avoir des conséquences opposées (Ashkenazi et Dixit 1998; Baker et Reddy 1998). Parallèlement à cette voie, il existe une voie qui est médiée par p53 (Amundson, Myers, et Fornace 1998).

Certains stimuli engendrent directement des lésions au niveau de l'ADN ayant pour conséquence l'activation de p53. Une fois activée, il induit la transcription de gènes comme ceux qui codent pour la p21, FAS, Bax et MDM 2 et inhibe la transcription d'autres gènes comme Bcl-2.

2-Voie intrinsèques ou la voie mitochondriale

La voie d'activation intrinsèque, dite mitochondriale, des caspases fait intervenir la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Cette perméabilisation va provoquer la libération de protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial dans le cytosol aboutissant à la constitution de l'apoptosome qui va activer la voie effectrice des caspases.

L'activation de la caspase 3 est induite par un complexe dénommé APAF pour *Apoptotic Protease Activating Factor* qui regroupe 3 facteurs : Apaf-1, Apaf-2 ou cytochrome c et Apaf-3 ou procaspase 9. Les données expérimentales d'inactivation de ses 3 gènes (APAF1-/-, caspase 9 -/-, cytochrome c -/-) conduit à un phénotype similaire, à savoir une mort léthale durant la vie embryonnaire, la constatation de malformations cérébrales avec un excès cellulaire au niveau cérébral. De plus la caspase 3 n'est pas activée au niveau cérébral. Les cellules Es (cellules trophoblastiques embryonnaires) de ces souris libèrent du cytochrome c de leur mitochondrie suite à une irradiation aux UV sans pouvoir activer la caspase 3 (Hakem et al. 1998). Les thymocytes issus de souris caspase 9-/-, ne peuvent activer la caspase 3, même en présence de dATP ou de cytochrome c (Kuida et al. 1998).

Ces données démontrent bien le rôle fondamental de ces 3 facteurs dans l'exécution du programme apoptotique.

Apaf 2 ou cytochrome c est une petite hémoprotéine ou protéine à hème, de 104 acides aminés associé à la membrane interne (15%) et la cristae (85%) de la mitochondrie.

La première fonction décrite du cytochrome c est de transférer les électrons de la chaîne respiratoire entre les complexes III et IV (cytochrome oxydase). Puis il a été démontré que le cytochrome c était impliqué dans l'apoptose. Durant la perméabilisation mitochondriale seul le cytochrome c de l'espace inter-membranaire est libéré (Saelens et al. 2004).

Zou et al. (1997) a identifié le partenaire cytosolique du cytochrome c dans la cascade apoptotique, à savoir la protéine Apaf 1. Apaf-1 présente des homologies de séquence avec Ced-4 (E-Elegans). L'action d'Apaf-1 requiert non seulement la présence du cytochrome c mais aussi de dATP (Li et al. 1997).

La protéine Apaf-1 dont 4 isoformes ont été clonées et caractérisées. Elle est constituée de trois domaines (Zou et al. 1999).

Un domaine N-terminal dénommé domaine *CARD* pour *Caspase Recruitment Domain* (Hofmann, Bucher et Tschopp 1997) qui possèdent des homologies avec CDE-3 et les caspases. La fonction de ce domaine est d'assurer une interaction avec les caspases. Certaines protéines adaptatrices possédant un domaine de mort, possèdent aussi un domaine *CARD* comme les protéines *RAID* (Duan et Dixit 1997), cIAP-1 et 2 (Hofmann, Bucher et Tschopp 1997), Rip2 (McCarthy, Ni, et Dixit 1998) et ARC (Koseki et al. 1998).

Un domaine central, d'homologie avec CED4. Ce domaine comporterait également une séquence de liaison des nucléotides et un domaine ATPase, (site de *nucleotide binding oligomerisation domain* ou *NOD*).

Un domaine C-terminal, comportant un motif WD-40 (Neer et al. 1994). Domaine impliqué dans les interactions protéine-protéine et notamment avec le cytochrome c. Ce domaine semblerait jouer un rôle de régulation négative sur Apaf-1.

En cas de délétion de cette région, la forme tronquée de Apaf-1 est capable d'induire l'activation de la caspase 9 en absence du cytochrome c et de l'dATP (Srinivasula et al. 1998).

La protéine Apaf-1 est initialement dans une conformation *off* et son domaine *CARD* est masqué et possède une faible affinité pour dATP.

L'interaction cytochrome c/Apaf 1 (via domaine WD-40) va induire une augmentation de l'affinité pour dATP, permettant de démasquer le domaine CARD/Apaf-1.

Le domaine CARD/Apaf1 va passer d'une position *off* à une position *on* induisant le recrutement de la procaspase 9 (via son domaine CARD). L'ensemble constituant un assemblage complexe multiprotéique dénommé l'apoptosome.

Les données de microscopie électronique ont démontré que cette structure était circulaire et qu'elle était constituée d'un heptamère cytochrome c/Apaf-1. Les domaines CARD/Apaf-1 sont regroupés au centre de cette structure. Les procaspase 9 vont s'ancrer sur cette structure, s'homodimériser et par conséquent s'activer (Acehan et al. 2002).

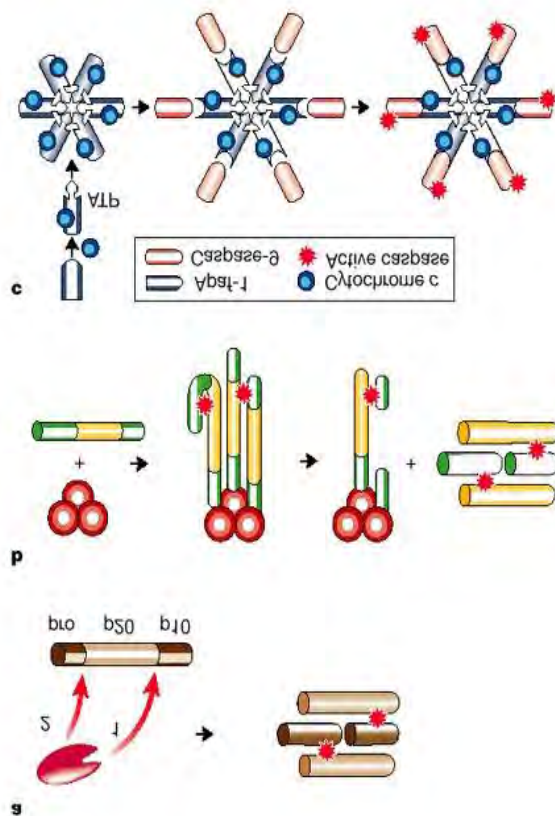


Figure 7- activation de la caspase 9 et constitution de l'Apoptosome d'après Hengartner (2000).

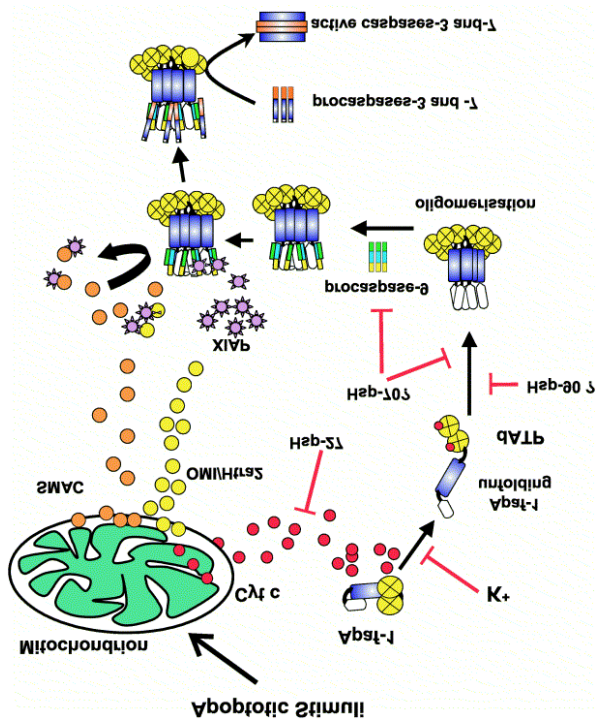


Figure 8- activation de la caspase 3 par l'Apoptosome d'après Cain, Bratton et Cohen (2002)

C-L'exécution du programme de l'apoptose : les caspases

En dépit de la diversité des stimuli et des voies inductrices du message, la mort cellulaire programmée aboutit *in fine* à l'activation irréversible d'un tronc commun constitué par des protéases à cystéine appelées caspases.

Leur site catalytique possède un résidu cystéine inclus dans une séquence peptidique QACRG* leur conférant une spécificité de clivage d'un résidu aspartate en position P1.

A ce jour, il a été identifié 13 caspases chez les mammifères, toutes n'étant pas impliquées dans l'exécution du programme apoptotique.

Structurellement elles présentent 4 domaines, un prodomaine en position N-terminal, une grande sous unité, une petite sous unité et un peptide dit *linker* liant ces deux sous unités.

L'activation des caspases nécessite un clivage du prodomaine et du peptide *linker* par protéolyse, tandis que la grande et la petite sous unité s'associent en un dimère. C'est sous la forme tétramérique que le complexe sera totalement actif comme le démontre les études cristallographiques (Nuñez et al. 1998).

1-Activation des caspases

1-1-Généralités

Classiquement, comme nous l'avons décrit plus haut, on distingue les caspases dites activatrices et effectrices. Les premières possèdent un prodomaine long : un domaine DED (caspase 8) de mort ou un domaine CARD (*Caspase Recruitment Domain*, caspase 9).

Après association à un complexe protéique, elles sont activées par autoclivage (caspase 8/FADD ; caspase 9/Apaf-1) et s'oligomèrisent. Quant aux caspases effectrices, au prodomaine court (caspase 3, 6, 7), elles sont clivées par les caspases activatrices (Thornberry et Lazebnik 1998). L'activation de ces enzymes protéiques est similaire à la cascade d'activation des facteurs de coagulation. Les caspases effectrices peuvent à leur tour activer les caspases activatrices par rétrocontrôle positif aboutissant à une amplification du processus.

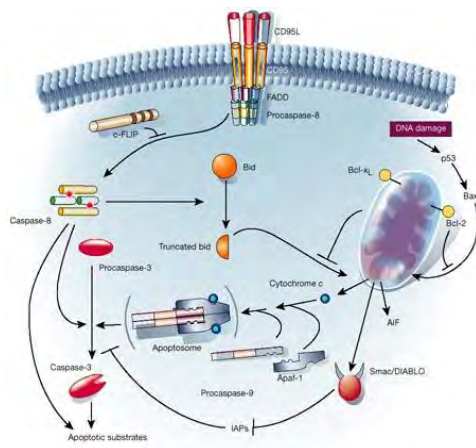


Figure 9- activation des caspases au décours de l'apoptose d'après Hengartner (2000).

1-2-Autres voies d'activation des caspases :

D'autres voies d'activation ont été décrites, notamment la voie impliquant la caspase 2. Cette voie est en amont de la mitochondrie et participe à la voie d'activation intrinsèque. La caspase est connue pour cliver et activer la forme inactive de la protéine Bid.

Un modèle suggère qu'en réponse à des stimuli apoptotiques comme les dommages à l'ADN, la protéine p-53-inductible adaptor protein, PIDD, va de dimériser avec la protéine RAIDD (*RIP-associated ICH-1 /CED3 homologous protein withna death domain*). Ce complexe va alors recruter la caspase 2 via une interaction CARD-CARD constituant le complexe PIDDome (structure analogue à l'apoptosome) qui va alors se dimériser et s'activer (Tinel et Jürg schopp 2004). Alors la caspase 2 va agir sur ces différents substrats. Il est possible que la caspase 2 soit impliqué dans l'apoptose des cellules néoplasique mais n'aurait qu'un rôle redondant dans les cellules saines (Kumar 2007).

2-Les substrats des caspases

Les caspases effectrices assurent la protéolyse des protéines assurant le maintien de l'architecture nucléocytoplasmique telles que la pro-interleukine1 (pro IL-1), la poly-(ADP)-ribose polymérase (PARP), les lamines nucléaires. La caspase 3 assure le clivage de l'inhibiteur (DFF45/ICAD) de l'endonucléase responsable de la fragmentation internucléosomique de l'ADN (DFF45/CAD). Les caspases activatrices par leur action peuvent amplifier la réponse proapoptotique de la cellule.

En effet, la caspase 8, en assurant le clivage de Bid, permet à ce dernier de s'hétérodimériser avec bcl-2 pour inhiber sa fonction au niveau mitochondrial.

La caspase 9 peut cliver bcl-2 et bcl-xl au niveau de leur domaine BH4 perdant ainsi leur propriété anti apoptotique (Nuñez et al. 1998).

3-Régulation de l'activité des caspases

Comme décrit plus haut, il est actuellement reconnu, qu'il existe deux voies d'activation des caspases. La première implique les récepteurs transmembranaires de mort cellulaire et la deuxième met en jeu la mitochondrie. Avant la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, le cytochrome c et le dATP sont redistribués de la mitochondrie au cytoplasme permettant la constitution du complexe Apaf-1/procaspase 9/ATP et son autoactivation (Cecconi 1999).

L'activité des caspases est régulée négativement par interaction avec des protéines inhibitrices de l'apoptose ou IAPs.

Cette famille de protéines comprend à ce jour 8 membres, *neuronal apoptosis inhibitory protein* (NAIP/BIRC1/NLRB), *cellular IAP1* (cIAP1), *cellular IAP2*, *X-linked IAP* (XIAP), *survivin*, *baculoviral IAP repeat* (BIR) *containing ubiquitin-conjugating/apollon/BIRC6*, *livin/melanoma-IAP* and *testis-specific IAP*. Elles possèdent des caractéristiques communes à savoir en position N-terminale au moins un domaine BIR (*baculoviral IAP repeat*) et à l'exception de la survivine en C- terminale un ou plusieurs domaines RING (*Really Interesting new gene*) et un domaine CARD.

Le domaine possède une activité d'auto ou hétéro-ubiquitination par la ligase ubiquitine E3 réalisant la dégradation des substrats par le protéosome.

Le CARD domaine permet une interaction protéine–protéine notamment avec des protéines possédant un domaine CARD très impliqué dans la régulation de l'apoptose, notamment au niveau des caspases de l'apoptosome.

3-1-Les inhibiteurs de l'apoptose

XIAP est probablement le IAP qui possède l'activité anti-apoptotique la plus importante. Elle possède 3 domaines BIR et un domaine RING. La région *linker* entre le domaine BIR1 et BIR2 est impliquée dans l'inhibition des caspases 3 et 7. Le domaine BIR 3 est impliqué dans l'inhibition de l'activité de la caspase 9.

Cette dernière via son domaine *IAP-binding motif* (IBM) en N-terminale de la petite sous unité (IBM) va être séquestré au niveau de l'apoptosome sous la forme monomérique (Deveraux et Reed 1999; Shiozaki et al. 2003).

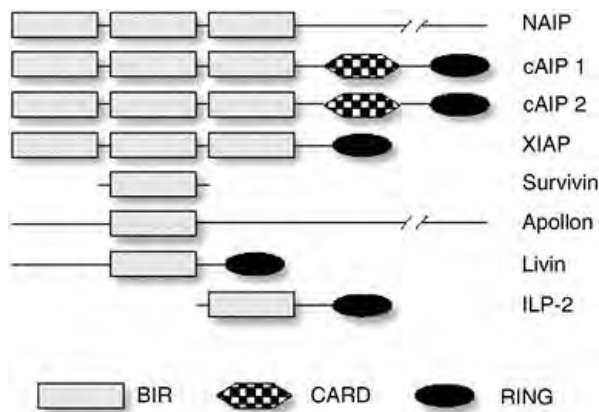


Figure 10- membres de la famille des IAP d'après Fulda (2009).

Les effets inhibiteurs de XIAP peuvent être levés par un certain nombre de protéines mitochondriales qui seront libérées dans le cytosol au cours de la perméabilisation de la membrane mitochondriale comme les protéines, Smac/Diablo et Omi/Htr2.

La protéine Smac (*Second mitochondria-derived activator caspase*) ou DIABLO (*Direct Inhibitor of Apoptosis Binding Protein with low pI*) est codée par le génome nucléaire. Cette protéine est synthétisée sous la forme d'un précurseur dont la partie N-terminale permet son adressage dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie.

En réponse aux stimuli pro-apoptotiques, la forme mature de Smac est libérée dans le cytosol et va se dimériser à XIAP via son domaine N-terminal IBM (AVPI motif) au domaine BIR3 de XIAP induisant un déplacement de la caspase 9 de ce domaine et son activation. Et la caspase 3 est libérée par l'interaction du domaine IBM de Smac avec le domaine BIR2 de XIAP.

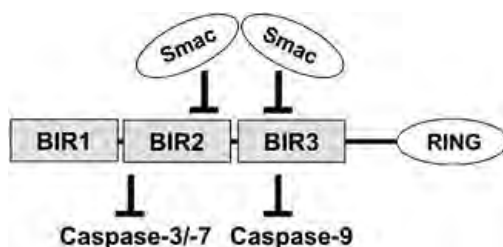


Figure 11- Interaction entre SMAC et les IAP d'après Fulda (2009).

La protéine mitochondriale Omi /HtrA2 est elle aussi capable d'inhiber l'action de XIAP. Il s'agit d'une protéine sérine protéase mitochondriale.

Tout comme pour Smac, elle est codée par le génome nucléaire et synthétisée sous la forme d'un précurseur.

La partie N-terminale qui permet la localisation dans l'espace inter-membranaire mitochondrial de la protéine sera ensuite clivée pour constituer la protéine mature de 37 Kda. C'est cette protéine qui sera libérée dans le cytosol après perméabilisation de la membrane mitochondriale. Elle possède un motif IBM (AVPS) qui va interagir avec les domaines BIR2 et BIR3 de XIAP tout comme Smac, mais à la différence que Omi/HtrA2 possède une affinité plus importante pour le domaine BIR2, induisant de manière prépondérante une levée de la séquestration de la caspase 3 au sein de l'apoptosome. Cette sérine protéase est aussi capable de cliver et d'inactiver les IAP (Srinivasula et al. 2003; Qi-Heng Yang et al. 2003).

Elle possède un domaine PDZ (*postsynaptic density protein disc large tumor suppressor and Zo-1*). Les données structurales de cristallographie (homotrimère) et biochimique suggèrent que Omi/HtrA2 doit s'associer via son domaine PDZ pour constituer des structures trimériques.

Elle doit interagir avec les récepteurs trimériques de mort cellulaire (TNF-R, FAS) et, par son activité protéolytique activer l'apoptose (voie extrinsèque) (Li, Yang et Ashwell 2002).

3-2- Apoptotic Inducing Factor (AIF) et Endonucléase:

Ces protéines mitochondriales sont libérées lors de la perméabilisation mitochondriale. L'AIF est une flavoprotéine codée par le génome nucléaire, de 57kDA, qui est localisée dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. Elle possède une séquence d'adressage nucléaire. Lors de l'activation de l'apoptose cette protéine va être libérée dans le cytosol puis transloquée dans l'espace nucléaire. Il s'agit d'une molécule possédant une double fonction. Sa première fonction est d'induire la condensation de la chromatine et la dégradation de l'ADN (taille de 50kb environ).

Sa deuxième fonction est une fonction d'oxydoréduction lui permettant d'éliminer les radicaux libres et, paradoxalement, de protéger les cellules contre le stress oxydatif (Miramar et al. 2001; Klein et al. 2002).

L'invalidation du gène AIF-/- dans des modèles de souris démontre que cette anomalie est létale et que les cellules embryonnaires ne présentent pas de résistance aux stimuli apoptotiques, indiquant un rôle non déterminant dans l'exécution du programme apoptotique (Joza et al. 2001).

L'endonucléase G est une nucléase homologue de cps 6 de *E. Elegans*. Cette protéine de 30 kDa possède un signal d'adressage mitochondriale et elle est localisée dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie et est identifiée comme impliquée dans la réplication de l'ADN mitochondrial.

Sous l'action des signaux de mort induits par le TNF, agoniste anti-FAS ligand, UV, cette protéine est transloquée du cytosol à l'espace nucléaire et participe à la dégradation de l'ADN (Li, Luo et Wang 2001).

L'apoptose peut- elle être exécuté indépendamment de l'activation des caspases comme le laisserait suggérer la présence de l'AIF et de l'endonucléase G dans le cytosol ?

La présence de AIF et de l'endonucléase G est-elle indépendante de l'activation des caspases ou bien est elle dépendante de l'activation des caspases et donc plus tardive (Arnoult et al. 2003) ? Le débat à ce jour n'est toujours pas tranché (Dumont et al. 2000; Seong-Woon Yu et al. 2002).

D-La régulation du programme apoptotique : les protéines de la famille Bcl2

1-Généralités

Des homologies de séquence et des fonctions entre CED9 et Bcl-2 semblent indiquer que les protéines de la famille Bcl2, tout comme CED9, joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'apoptose notamment en régulant la perméabilisation mitochondriale.

Le premier membre de cette famille, Bcl-2 a été identifié (Tsujimoto et al. 1984) initialement dans les lymphomes folliculaires par clonage de la translocation t (14 ; 11)

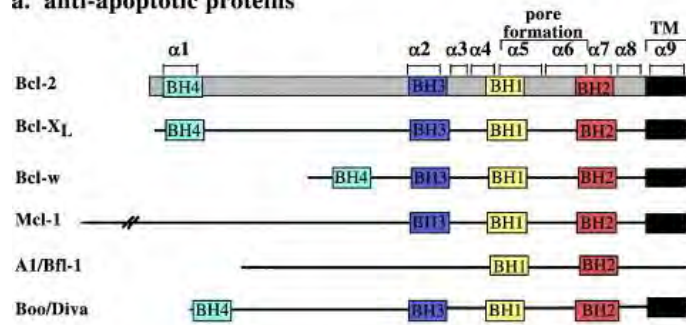
(q32 ; q21). Ce réarrangement chromosomique induit une surexpression de Bcl-2 en transposant ce gène au contact du site promoteur du segment J des chaînes lourdes des immunoglobulines.

Dans ce type de lymphomes 90% des cellules sont en phase G0/G1. Le gène BCL-2 contribue au développement tumoral en inhibant la mort cellulaire et non en augmentant la capacité proliférative.

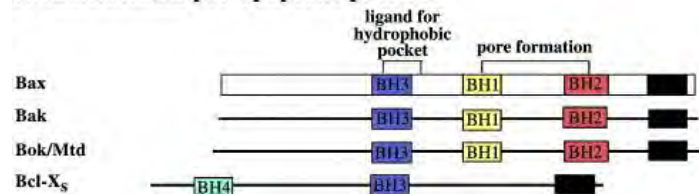
Actuellement pas moins de 15 membres de cette famille ont été identifiés et classés en trois classes selon leur fonction et leur structure. Tous les membres de cette famille possèdent au moins un des quatre domaines d'homologie Bcl-2 dénommé BH (BH1 à BH4). Le domaine BH4 est spécifique des membres de la famille anti-apoptotique.

Cette classification comprend les protéines de la famille Bcl-2 multidomaines anti-apoptotique (Bcl2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl1, A1/Bfl1), les protéines multidomaines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bok/mtd, Bcl-Xs) et les protéines avec un unique domaine BH3 dite BH3 *only* (Bik, Bid, Bim/Bod, Bad, Bmf, Hrk, Puma, Blk, BNIP3, BNIP3L). Ces domaines jouent un rôle prépondérant dans la régulation de l'apoptose (Reed 1998).

a. anti-apoptotic proteins



b. multidomain pro-apoptotic proteins



c. BH3-only proteins

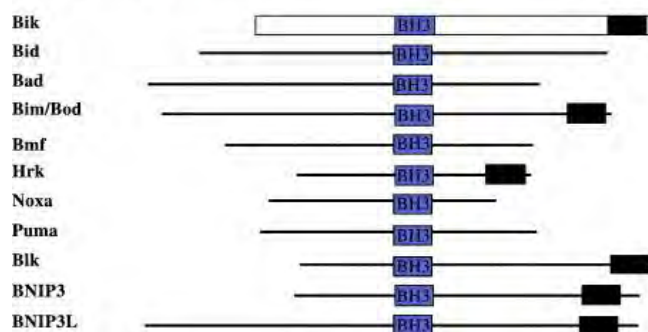


Figure 12- Représentaion des membres de la famille des protéines Bcl-2 selon Er et al.(2006).

2-Les protéines à mutidomains anti-apoptotiques

Les protéines de cette famille possèdent des caractéristiques communes à savoir quatre domaines d'homologie Bcl-2 (BH1 à BH4) à l'exception de la Mcl-1. Effectivement Mcl-1 ne possède pas de domaine BH4 en N-terminale mais une hélice- α (Day et al. 2005) qui, structurellement, est comparable au domaine BH4 de Bcl-xL. De même la protéine A1 /Bfl1 est dépourvue des domaines BH3 et BH4, mais elle possède, au niveau de la région N-terminale de son domaine BH1, des régions structurellement comparables aux domaines BH3 et BH4 des autres membres des protéines anti-apoptotiques (Zhang et al. 2000).

2-1-Fonction et structure

Les données expérimentales portant sur l'invalidation des gènes de la famille de ces protéines démontrent leur rôle prépondérant sur l'inhibition du programme de mort cellulaire spécifique des différents tissus.

Les études portant sur les souris dont les gènes ont été invalidés démontrent que les souris Bcl-2^{-/-} sont viables. Elles ne meurent que quelques semaines après leur naissance. Elles présentent des malformations polykystiques rénales, une hypopigmentation, une dégénération des motoneurones et neurones sensoriels liés à la levée de l'inhibition de la fonction anti-apoptotique de Bcl-2 au niveau de ces différents tissus (Veis et al. 1993; Kamada et al. 1995; Nakayama et al. 1995) et une impossibilité de maintenir l'homéostasie immunitaire avec une apoptose massive du thymus et de la rate. Bcl-2 joue un rôle central dans la survie des lymphocytes T matures plus que dans la différenciation des lymphocytes T.

Les souris Bcl-xL^{-/-} décèdent rapidement durant la vie embryonnaire par le déclenchement du programme apoptotique au niveau du système nerveux central et médullaire et au niveau des tissus hématopoïétique (Motoyama et al. 1995). La perte d'expression de Bcl-xL chez les souris adultes induit des anomalies de l'hématopoïèse au niveau de la lignée érythrocytaire et plaquettaire.

Les souris Bcl-W^{-/-} ne meurent pas, mais les mâles sont stériles par une entrée massive en apoptose des cellules des tubules séminifères (Print et al. 1998).

L'invalidation de Mcl-1 provoque chez les souris une mortalité précoce par un défaut d'implantation de l'embryon sur la paroi utérine (Rinkenberger et al. 2000). La mise sous silence induit une mort des cellules progénitrices hématopoïétiques (Opferman et al. 2005). Mais la fonction de ces protéines ne semble pas limitée uniquement à l'inhibition du programme apoptotique, des données expérimentales semblent démontrer qu'elles pourraient réguler la progression dans le cycle cellulaire en retardant l'entrée en phase S.

Mcl-1, en se fixant à la protéine PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) induit un arrêt du cycle cellulaire (Fujise et al. 2000). Bcl-2 et Bcl-xL exerceraient cette fonction via leur domaine BH4 au niveau de résidus spécifiques (Huang et al. 1997).

La conséquence de cette inhibition du cycle cellulaire serait de favoriser l'instabilité génétique, inhiber la réparation de l'ADN et ainsi de participer au processus de carcinogenèse (Liu, Naumovski et Hanawalt 1997; Youn et al. 2005).

Les études de cristallographie des protéines Bcl-2 et Bcl-xL démontrent qu'elles présentent une structure globulaire constituée de deux hélices- α amphiphiles (Muchmore et al. 1996; Petros et al. 2001). Entre les deux premières hélices- α , il existe une boucle non structurée impliquée dans la régulation de leur fonction. Les domaines BH1, BH2, BH3 vont constituer une poche hydrophobe en se regroupant tandis que le domaine BH4 va stabiliser la structure en masquant l'exposition de certains résidus. Cette poche hydrophobe va pouvoir se dimériser avec les protéines apoptotiques via leur domaine d'homologie BH3. La résultante est la séquestration des protéines pro-apoptotique sous la forme d'hétérodimère inactif.

Il a été démontré que le domaine BH3 de Bak, Bad ou Bim adopte alors une structure en hélice- α amphiphile qui va s'insérer dans la poche hydrophobe de Bcl-xL par des liaisons à la fois hydrophobes et électrostatiques (Sattler et al. 1997; Xinqi Liu et al. 2003; Akao et al. 1994). Les résidus situés dans la partie N-terminale de ces domaines BH3 interagissent avec ceux situés dans le domaine BH1 de Bcl-XL alors que les résidus situés dans la partie C-terminale de ces domaines BH3 entrent en contact avec ceux des domaines BH2 et BH3 de Bcl-xL.

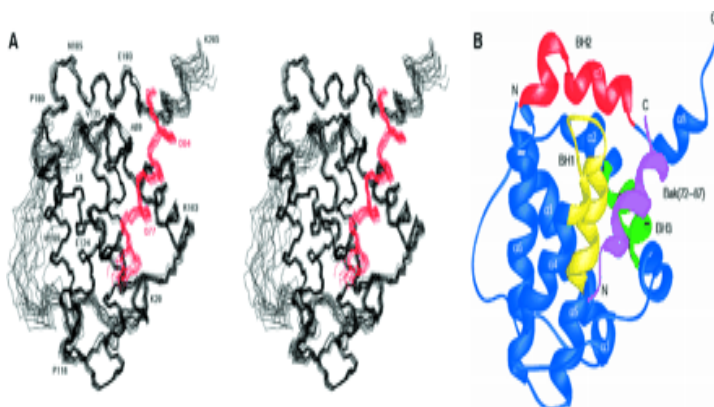


Figure 13- Représentation du domaine BH3 de Bak dans la poche hydrophobe de Bcl-xL ; d'après Sattler et al. (1997).

2-2-Mode de régulation de la fonction des protéines à multidomaines anti-apoptotiques

Les modes de régulations de l'activité des protéines à multidomaines anti-apoptiques sont multiples. Cette régulation peut être liée à leur localisation cellulaire, à des modifications transcriptionnelles ou traductionnelles.

2-2-1-Régulation par localisation subcellulaire

La localisation subcellulaire de ces protéines va conditionner leur fonction. Elles possèdent un domaine transmembranaire en C-terminale qui contient une hélice- α hydrophobe qui permet leur ancrage au sein des versants externes de certains organites comme la mitochondrie, point central de l'apoptose, l'enveloppe nucléaire ou bien le réticulum endoplasmique. Bcl-2 est localisée de manière constitutive au niveau de l'enveloppe nucléaire, du versant externe de la membrane mitochondriale et du réticulum endoplasmique (Lithgow et al. 1994; Akao et al. 1994). Qu'elle soit localisée au niveau mitochondrial ou au niveau du réticulum, sa fonction sera identique. Elle veillera à s'opposer à la redistribution vers le cytoplasme du cytochrome c (Häcki et al. 2000). Mais selon le type cellulaire le fait que Bcl-2 soit adressée au réticulum endoplasmique sera plus efficace (Zhu et al. 1996).

Mcl-1 est présente elle aussi au niveau de la membrane externe de la mitochondrie comme aussi de l'appareil de Golgi et des lysosomes (Yang, Kozopas et Craig 1995). Mais Mcl-1 peut avoir aussi une localisation cytosolique (Nijhawan et al. 2003).

Quant à Bcl-xL, elle est présente essentiellement dans le cytosol (Hsu et Youle 1997) sous la forme d'homodimère (Jeong et al. 2004) et faiblement associée à la membrane mitochondriale.

Après l'induction du message de mort cellulaire Bcl-xL va être transloquée du cytosol à la surface de la membrane mitochondriale par le fait que les domaines C-terminaux vont être déplacés des poches hydrophobes par les domaines BH3 des protéines pro-apoptotiques.

2-2-2-Modifications transcriptionnelles

Les protéines Bcl-xL et Mcl-1 possèdent des isoformes courtes Bcl-xS et Mcl-1S produites par épissage alternatif et qui sont pro-apoptotiques. Il a été démontré que les formes longues et courtes pouvaient se dimériser entre elles et s'inhiber réciproquement (Boise et al. 1993; Bingle et al. 2000; Bae et al. 2000).

L'expression de Bcl-2 est sous la dépendance de différents facteurs de transcription comme CREB (Riccio et al. 1999; Pugazhenthir et al. 2000) et STAT3 (Real et al. 2002).

L'expression de Bcl-2 peut être réprimée par la présence de micro-ARNs (Cimmino et al. 2005). Les auteurs constatent que le niveau d'expression de Bcl-2 était inversement corrélé au niveau d'expression de micro-ARNs dans des lignées cellulaires de leucémie chronique.

L'engagement des signaux de mort cellulaire par les récepteurs de mort cellulaire vont activer le facteur de transcription NF κ B qui va contrôler le niveau de transcription de Bcl-xL (Lee et al. 1999; Chen, Edelstein et Gélinas 2000).

2-2-3-Modification post traductionnelles

Elles regroupent des mécanismes de phosphorylation, de déamination, de protéolyse-clivage, d'interaction protéine-protéine.

Il a été décrit des réactions de phosphorylation pouvant réguler négativement ou positivement les fonctions de Bcl-2 ou Bcl-xL.

Ces réactions se produisant préférentiellement au niveau de la boucle présente entre les domaines BH3 et BH4. La protéine kinase C ou la kinase JNK peuvent phosphoryler Bcl-2 au niveau des résidus T69, S70 et S87.

Quant aux conséquences fonctionnelles sur l'inactivation de Bcl-2, elles sont débattues (Deng et al. 2004).

La fonction anti-apoptotique de Bcl-xL peut être inhibée après que cette dernière ait subi une déamidation au niveau des résidus asparagines (N52 et N66) convertissant ces résidus en iso-aspartate au niveau de boucle séparant les domaines BH3 et BH4 (Deverman et al. 2002). Cette forme de Bcl-xL est incapable alors de séquestrer les protéines pro-apoptotiques.

Le clivage par les caspases au niveau de la boucle reliant les domaines BH3 et BH4 permet de convertir les protéines multidomaines anti-apoptotiques en protéines pro-apoptotiques (Cheng et al. 1997; Clem et al. 1998; Michels et al. 2004; Jonas et al. 2004) ont décrit une forme tronquée de Bcl-xL en N-terminale qui était capable de constituer des canaux dans des mitochondries isolées.

Il a été démontré le rôle du protéosome dans la dégradation rapide de la protéine Mcl-1 en régulant ainsi la durée de vie de cette protéine (Nijhawan et al. 2003).

L'interaction du récepteur nucléaire aux hormones Nur 77 avec la boucle reliant les domaines BH3 et BH4 de Bcl-2 et convertir, cette dernière, en une protéine qui va perdre ses propriétés inhibitrices de l'apoptose. Cette interaction va démasquer le domaine BH3 en désorganisant la poche hydrophobe.

A travers tous ces exemples on comprend bien le rôle prépondérant que joue la boucle reliant les domaines BH3 et BH4. Toute modification de cette structure va induire des modifications de conformation et de fonctionnalité.

3- Les protéines à multidomaines pro-apoptotiques :

Cette famille de protéine est représentée par Bax (*Bcl-2 Associated protein*), Bak et Bok ou Mtd. L'expression de Bax et Bak est assez ubiquitaire alors que l'expression de Bok est restreinte aux tissus liés à la reproduction (Hsu et al. 1997). Elles possèdent des caractéristiques communes tant aux niveaux fonctionnels que structurels. Elles possèdent trois domaines d'homologie à Bcl-2, BH1, BH2 et BH3.

Bax a été identifiée comme une protéine co-précipitée avec Bcl-2 (Oltvai, Millman et Korsmeyer 1993) et qui s'oppose à la fonction inhibitrice de cette dernière selon le modèle dit du « rhéostat ». Cette théorie définit la résistance ou la sensibilité aux signaux de mort par la concentration relative des protéines pro et anti-apoptotique (Oltvai, Millman et Korsmeyer 1993 ; Korsmeyer et al. 1993).

3-1-Fonctionnalité et structure

Bak a été identifiée comme une protéine interagissant avec la protéine virale E1B19K anti-apoptotique (Kiefer et al. 1995) et, tout comme Bax, possède des domaines d'homologie avec Bcl-2 (Farrow et al. 1995; Chittenden et al. 1995).

Les expériences d'invalidation de ces gènes conduites chez la souris démontrent que les souris Bax^{-/-} sont viables (Knudson et al. 1995). Les souris mâles sont infertiles par défaut de la spermatogenèse.

Elles présentent par ailleurs une hyperplasie lymphocytaire. Les souris présentant une invalidation à la fois de Bax et de Bak meurent peu après la naissance.

Elles présentent une hyperplasie cellulaire au niveau du système nerveux central et médullaire, la persistance des membranes interdigitales et une occlusion vaginale (Lindsten et al. 2000).

Ces deux protéines constituent un point fondamental de convergence des voies régulatrices de l'apoptose comme l'indiquent des travaux conduits sur des lignées cellulaires murines (Wei et al. 2001; Zong et al. 2001) et humaines (Cartron et al. 2003). Ces lignées déficientes à la fois pour Bax et Bak deviennent résistantes aux signaux de mort cellulaire.

Les données de RMN ont pu définir que la structure de Bax était proche de ses homologues multidomaines anti-apoptotiques (Suzuki, Youle, et Tjandra 2000). Elle consiste en deux hélice- α hydrophobes, les hélices- $\alpha 5$ et $\alpha 6$ masquées au cœur de la protéine et enveloppées de 7 hélice- α amphiphiles (les hélices- $\alpha 1$, $-\alpha 2$, $-\alpha 3$, $-\alpha 4$ d'un côté et $-\alpha 7$, $-\alpha 8$ de l'autre). Les domaines BH1, BH2 et BH3 sont regroupés pour former une poche hydrophobe.

Cette poche hydrophobe est occupée par le domaine C-terminale de Bax (hélice- $\alpha 9$) d'une manière similaire au domaine des protéines multidomaines anti-apoptotiques. Il a été aussi démontré que l'hélice- $\alpha 1$ est située à proximité de l'hélice- $\alpha 2$, (Lalier et al. 2007) qui contient le domaine BH3 via des interactions électrostatiques intramoléculaires entre un résidu aspartate (hélice- $\alpha 1$, D33) et un résidu lysine (hélice- $\alpha 2$, K64).

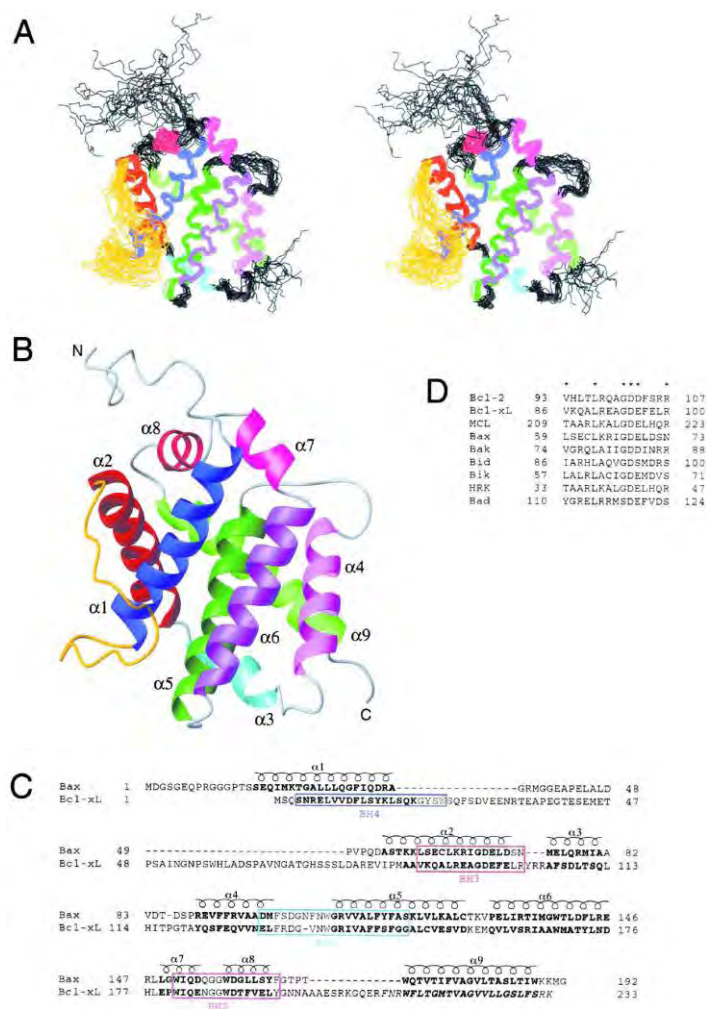


Figure 14- Structure de Bax d'après Suzuki et al. (2000).

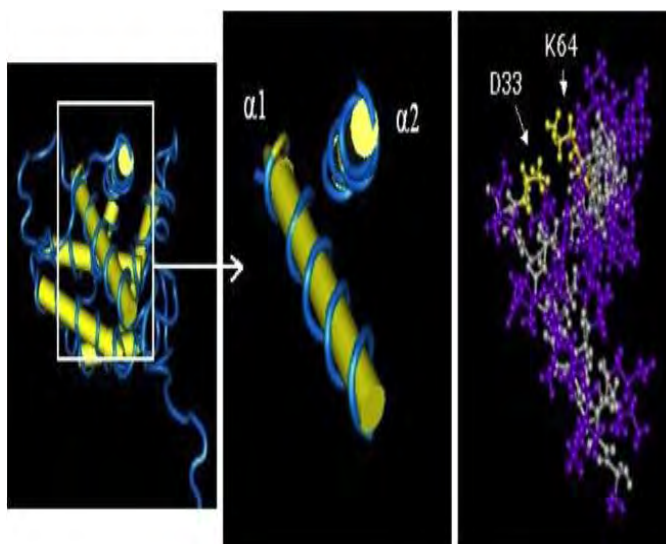


Figure 15- Représentation de l'interaction moléculaire entre hélice 1 et hélice 2 d'après Lalier et al. (2007).

L'étude de la structure de Bak a mis en évidence une poche hydrophobe formée par les domaines BH1 et BH2 d'un côté et BH3 de l'autre (Moldoveanu et al. 2006). Compte tenu de l'étroitesse de cette poche elle ne permet pas l'interaction du domaine BH3 avec une autre protéine. Au niveau de l'hélice- $\alpha 6$ qui correspond à la face opposée à celle où se situe la poche hydrophobe, il a été mis en évidence un domaine de liaison au zinc. La fonctionnalité de ce domaine zinc serait de permettre la constitution d'homodimère inactif.

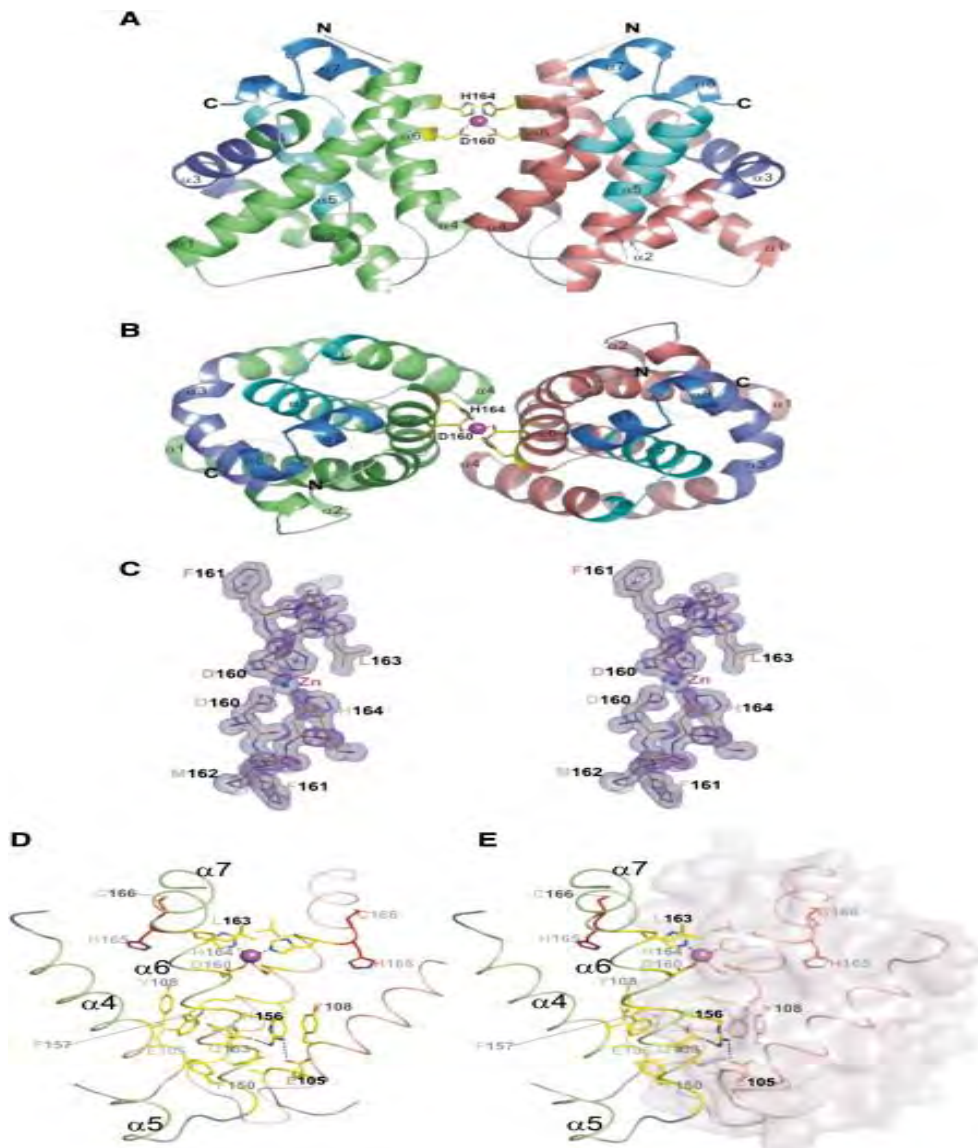


Figure 16- structure de Bak a mis en évidence une poche hydrophobe formée par les domaines BH1 et BH2 d'un côté et BH3 de l'autre d'après Moldoveanu et al. (2006).

3-2-Les modes de régulation de la fonctionnalité des protéines à multidomaines pro-apoptotiques :

3-2-1-Sublocalisation :

a-Du cytosol à la face externe de la mitochondrie

A l'inverse de Bak ou de Bok, Bax est présente essentiellement dans le cytosol sous sa forme monomérique, en une conformation fermée et inactive et peu associée à la face externe de la mitochondrie. En réponse aux signaux de mort, Bax doit subir des modifications de conformation pour être active.

La première modification va consister à d'un désengagement du domaine C-terminale de la poche hydrophobe (Nechushtan et al. 1999). Puis le domaine N-terminale subit également un réarrangement et devient exposé dans sa conformation active.

Le domaine BH3 (hélice- $\alpha 2$), puis les hélices- $\alpha 5$ et - $\alpha 6$ (qui forment le cœur de la protéine, en conformation inactive) sont alors exposées en conformation active (Cartron et al. 2005). Ces hélices sont des domaines transmembranaires (Annis et al. 2005; García-Sáez et al. 2006) qui sont primordiaux pour l'ancrage de Bax dans la membrane externe de la mitochondrie (Cartron et al. 2005). Lors de l'activation de Bax tout se déroule comme si que l'on passe d'une structure globulaire à une structure dépliée. Ce qui implique que les interactions entre l'hélice- $\alpha 1$ (K64) et - $\alpha 2$ (D33) soient rompues lors de l'activation de la protéine. Une mutation ponctuelle portant sur les résidus D33 ou K64 va induire un dépliement partiel de Bax (Cartron et al. 2005).

L'adressage de Bax à la face externe de la mitochondrie est médié par l'hélice- $\alpha 1$. Ce domaine, constitué de 20 à 37 résidus, est suffisant pour diriger la protéine RFP vers la mitochondrie. Une délétion de ce domaine inhibe la translocation de Bax à la mitochondrie lors de l'induction des signaux de mort cellulaire (Cartron et al. 2003).

Le domaine ART (*Apoptosis Regulating Target*), localisé au niveau des 19 premiers acides aminés en N-terminale de l'hélice- $\alpha 1$, est un domaine inhibiteur de l'adressage de Bax à la mitochondrie. La délétion de ce domaine est suffisant pour induire la translocation de Bax à la mitochondrie (Goping et al. 1998). Le variant Bax φ ne possède pas de domaine ART.

L'expression de ce variant chez les patients présentant un glioblastome est corrélé à une meilleur survie (Cartron et al. 2002).

Le rôle de l'hélice hydrophobe- $\alpha 9$ n'est pas bien défini. Pour les uns, il pourrait être un domaine d'ancrage dans la membrane mitochondriale (Nechushtan et al. 1999) mais cela est contredit par d'autres (Tremblais et al. 1999; Cartron et al. 2003).

Pour d'autres, ce domaine régulerait, comme un second domaine ART, l'exposition des autres domaines de Bax (Arokium et al. 2004).

Après l'induction de l'apoptose, Bax va s'insérer sur le versant externe de la membrane mitochondriale sous la forme d'un complexe homo-oligomérique qui correspond alors à la forme active de la molécule (Nechushtan et al. 2001; Antonsson et al. 2001).

L'étape d'insertion implique à la fois la forme monomérique de Bax et une protéine d'importation mitochondriale TOM22 (Bellot et al. 2007). L'étape d'insertion de Bax semble précéder son étape d'oligomérisation (Annis et al. 2005). L'inhibition de TOM22 induit une inhibition de l'apoptose par inhibition de la translocation de Bax sur la mitochondrie.

En somme, l'activation de Bax est la résultante de nombreux réarrangements intramoléculaires, conduisant à l'exposition des différents domaines indispensable à sa fonction. L'hélice- $\alpha 1$ est responsable de l'adressage de Bax à la mitochondrie, l'hélice- $\alpha 2$ (domaine BH3) assure son oligomérisation et les hélices- $\alpha 5$ et - $\alpha 6$ son insertion à la mitochondrie. Selon le modèle proposé par Lalier et al. (2007), Bax peut adopter plusieurs conformations. La première conformation dite CLIC (*Cytosolic Locked In conformation*) correspondant à la forme inactive et cytosolique de Bax.

La deuxième conformation de Bax est caractérisé par le fait qu'il est faiblement associée à la membrane mitochondriale, et peut se dimériser avec les protéines multidomaines anti-apoptotiques mais ne peut s'oligodémiriser. Dans cette conformation, l'hélice- $\alpha 1$ et le domaine BH3 sont exposés mais les hélices- $\alpha 5$ et - $\alpha 6$ sont masquées. La troisième conformation ou CLAC (*Cytochrome c Liberation Associated Conformation*) correspond à la forme active de Bax est fonctionnelle.

Bax est insérée sur la membrane de la mitochondrie par ses les hélices- $\alpha 5$ et - $\alpha 6$. Il peut s'hétérodimériser avec les protéines anti-apoptotiques et s'homo-oligodimériser.

Une fois que Bax est insérée sur la membrane mitochondriale et qu'elle acquiert sa conformation active, elle induit alors la perméabilisation de la membrane mitochondriale.

La manière donc Bax active induit cette perméabilisation fait l'objet de controverses et plusieurs modèles ont été proposés comme les modèles de rupture de la membrane mitochondriale, la formation de canaux protéiques, de canaux lipidiques ou la perturbation de l'équilibre fusion/fission mitochondriale.

Le modèle de la rupture de la membrane mitochondriale mettrait en jeu l'ouverture d'un pore de perméabilité transitoire (PTP).

Ce complexe protéique est constitué à la face externe de la membrane mitochondriale, de la protéine VDAC (*Voltage Dependante Anion*), et à la face interne de la protéine ANT (*adenine nucleotide translocation*). Bax va s'associer aux sous unités VDAC et ANT entraînant alors une chute du potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_m$) et une libération des protéines contenues dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Shimizu, Narita et Tsujimoto 1999; Marzo et al. 1998).

L'addition de formes recombinantes de Bax sur des mitochondries isolées induit une libération du cytochrome c et une chute du $\Delta\Psi_m$. Libération inhiber par d'adjonction de la cyclosporine A et l'acide bongkrétique qui sont des inhibiteurs du PTP (Narita et al. 1998).

Dans des modèles de levure il a été démontré que VDAC est essentielle à Bax pour induire la perméabilisation mitochondriale (Shimizu, Narita et Tsujimoto 1999). Cependant des travaux semblent démontrer que l'ouverture du PTP soit un événement tardif de l'apoptose et non nécessaire à la perméabilisation mitochondriale.

La perméabilisation par Bax peut avoir lieu en absence du PTP (Jürgensmeier et al. 1998; De Giorgi et al. 2002) et le relargage du cytochrome c indépendamment de la chute du $\Delta\Psi_m$ (Bossy-Wetzel, Newmeyer et Green 1998; Goldstein et al. 2000).

Le modèle des canaux protéiques mettrait en jeu l'ouverture de canaux Bax sous sa forme oligodimérique. Les hélices- $\alpha 5$ et - $\alpha 6$ de Bax, comme d'ailleurs Bcl-2 et Bcl-wL, présentent des homologies de structure avec les toxines de la colchicine et de la diphtérie (Suzuki et al. 2000).

Les données expérimentales démontrent que Bax est capable de constituer des pores transmembranaires sur des membranes artificielles (Saito, Korsmeyer et Schlesinger 2000) et de libérer du cytochrome c. De même sur des vésicules mitochondriales reconstituées il a été observé que Bax après activation tBid pouvait former des pores en interagissant avec un phospholipide mitochondrial, la cardiolipine (Kuwana et al. 2005). Ce processus est inhibé par Bcl-xL.

Il a été décrit aussi la formation d'un canal de grande taille dénommé MAC (*Mitochondrial Apoptotic Channel*) constitué non seulement de Bax mais de Bak (Dejean et al. 2006). La formation de ce canal serait un événement tardif et postérieur à l'activation des caspases (Guihard et al. 2004).

Le modèle des canaux lipidiques repose sur le fait que l'insertion de Bax sur la membrane mitochondriale induirait une modification dans le réarrangement des lipides mitochondriaux de la membrane et la constitution de pores.

Des données expérimentales, démontrent sur des vésicules lipidiques, que la composition lipidique (lipides ayant un fort ou faible potentiel de courbure) de ces vésicules va influencer la capacité de Bax à induire la perméabilisation mitochondriale (Gorka Basañez et al. 2002; García-Sáez et al. 2006).

Le modèle de l'équilibre fusion/fission mitochondriale repose sur l'observation que l'expression d'un mutant dominant-négatif de la protéine Drp1 (composant de la machinerie de fission mitochondriale) va retarder l'apoptose (Frank et al. 2001).

La fission mitochondriale pourrait participer à la libération du cytochrome c (Desagher et Martinou 2000). Il a été observé que la formation d'oligomères de Bax et de Bak au niveau de la membrane mitochondriale avait lieu au niveau des sites de fission mitochondriale (Karbowski et al. 2002).

Tout comme dans les différents modèles il a été observé que la translocation de la protéine Drp1 était un événement tardif et postérieur à la perméabilisation mitochondriale (Arnoult et al. 2005).

Pour Martinou et Youle (2006) la fission mitochondriale est un facteur de sensibilisation à la perméabilisation mitochondriale. Karbowski et al. (2006) démontre que Bax et Bak induisent et sont requis pour que le processus de fission ait lieu dans les cellules normales.

b-Au niveau du réticulum endoplasmique

Il a été démontré que Bax et Bak jouent un rôle non seulement dans la perméabilisation mitochondriale, mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique.

La concentration en calcium du réticulum endoplasmique est faible dans un modèle de cellules de fibroblaste murin invalidé pour les gènes Bax et Bak par rapport à des cellules normales (Scorrano et al. 2003). L'expression de la pompe calcique SERCA (*Sarcoplasmic -Endoplasmic reticulum calcium Adenosine triphosphate*) restaure la concentration en calcium du réticulum endoplasmique et leur sensibilité à des agents induisant la libération du calcium des stocks intracellulaires (acide arachidonique, C_2 -ceramide).

L'expression d'une forme mitochondriale de Bax ne restaure que partiellement ces cellules aux stimuli apoptotiques. Une réponse complète est obtenue par la co-expression de Bax et de SERCA. En somme Bax joue un rôle dans le déclenchement de l'apoptose à la fois au niveau mitochondrial et au niveau du réticulum endoplasmique

3-2-2-Modifications post-traductionnelles

Elles regroupent des mécanismes de phosphorylation, de protéolyse-clivage, d'interaction protéine-protéine qui vont réguler l'activité de Bax.

a-Modification post-traductionnelle par phosphorylation

Il a été décrit des réactions de phosphorylation de Bax par les kinases JNK et p38 activant l'apoptose (Kim, Ryu, et Song 2006). La phosphorylation du résidu S184 de l'hélice- α 9 de Bax par la kinase AKT va abroger sa fonction en maintenant Bax dans une conformation inactive (Gardai et al. 2004) et va inhiber la translocation de Bax à la mitochondrie.

Il a été reporté que la conformation de Bax était sensible au métabolisme du glucose. En favorisant la glycolyse par la voie PI3K, Akt va phosphoryler Bax et la maintenir sous une conformation inactive. La phosphorylation de la Ser 164 au contraire induit une activation de Bax au niveau des neurones (Linseman et al. 2004).

En somme en fonction de la nature du signal et/ou du site de phosphorylation Bax peut acquérir une conformation active ou inactive.

b-Modification post-traductionnelle par protéolyse

La réaction de clivage protéolytique de Bax par la calpaïne, au décours de l'apoptose, sur le résidu D33, va aboutir à la constitution d'une forme tronquée de Bax (p-18 Bax). Cette protéine a perdu sa partie N-terminale (Cao, Deng et May 2003) et par conséquent, une perte du signal d'adressage mitochondrial sans perte de sa fonction pro-apoptotique. Elle se comporte comme une protéine BH3 *only*. Elle se dimérise avec les protéines à multidomaines anti-apoptotique et inhibe leur fonction (Cartron et al. 2004).

c-Modification post-traductionnelle par interaction avec des inhibiteurs

Un autre mode de régulation de la fonction de Bax et Bak est lié à leur capacité d'établir des interactions (protéine-protéine) avec des partenaires dit inhibiteurs. Les partenaires inhibiteurs privilégiés de Bax et Bak sont représentés par les protéines à multidomaines anti-apoptotiques.

Ses interactions se réalisent au niveau du domaine BH3 (forme active et exposée) des protéines pro-apoptotiques.

Bax et Bak ont une affinité relative pour leurs homologues anti-apoptotiques (Willis et al. 2005). La protéine Bax interagit avec les protéines Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 et A1/Bfl-1 alors que la protéine Bak n'interagit qu'avec les protéines Mcl-1 et Bcl-xL. Cette différence d'affinité explique la spécificité d'activité entre Bax et Bak.

D'autres partenaires inhibiteurs ont été identifiés par la méthode de double-hydrure. La protéine Humanin (Hn) est un peptide de 3kDa qui a été identifié initialement comme un peptide anti-apoptotique (Hashimoto et al. 2001).

Cette protéine inhibe la translocation de Bax à la mitochondrie en s'opposant au stimuli de mort cellulaire transduit par la voie mitochondriale (Guo et al. 2003).

Deux études ont démontré que Hn avait la capacité de se lier à la forme longue de Bim (Bim EL) et de Bid en inhibant leur fonction activatrice de Bax et Bak (Luciano et al. 2005; Zhai et al. 2005).

La protéine Ku 70 est une protéine inhibitrice de Bax. Il s'agit d'une protéine ubiquitine présente dans le noyau et dans le cytoplasme.

Elle est impliquée dans la réparation de l'ADN double-brin (Kim et al. 1999) mais de manière indépendante, elle est capable d'inhiber Bax. Cette inhibition est médiée par une interaction directe entre le domaine N-terminale de Ku70 et la partie N-terminale de Bax ce qui va induire une séquestration de Bax dans le cytosol (Sawada et al. 2003; Sawada, Hayes et Matsuyama 2003).

Une autre protéine est capable d'interagir avec Bax, il s'agit de la protéine 14-3-3. Cette protéine, qui existe sous différentes isoformes, est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme le trafic intracellulaire, le cycle cellulaire et l'apoptose. Cette protéine va interagir avec Bax en favorisant sa séquestration dans le cytosol (Nomura et al. 2003). Cette interaction requiert les domaines N et C-terminale de Bax. Cette interaction est inhibée sous l'action des caspases induisant une libération de Bax de 14-3-3 et sa translocation à la membrane mitochondriale.

La Clusterin qui est une glycoprotéine qui est impliquée dans différentes fonctions cellulaires et possède la capacité d'interagir avec Bax et d'inhiber son oligomérisation (Zhang et al. 2005).

d-Modification post-traductionnelle par interaction avec des activateurs

Des activateurs de Bax et de Bak ont été aussi identifiés. Les partenaires privilégiés d'activation sont représentés par les protéines pro-apoptotiques dites BH3 *only*. Nous évoquerons leur structure et leur fonction dans un chapitre à part.

Les autres partenaires sont représentés par la protéine, Bif-1, la protéine ASC, la prostaglandine E2, la protéine p53 et c-Myc.

•La protéine Bif-1 :

La protéine Bif 1 appartient à la famille des *endophilin* B. Cette famille de protéine est impliquée dans la transduction du signal. Il a été démontré que Bif1 (*Bax interacting factor 1*) était capable d'interagir avec Bax via son domaine N-terminale au niveau du cytosol (Cuddeback et al. 2001). Cette interaction va induire une modification de la configuration de Bax et sa translocation à la membrane de la mitochondrie. Il est aussi démontré que Bif pouvait interagir avec Bak (Takahashi et al. 2005) .

•La protéine ASC

La protéine ASC ou *Apoptosis associated spek-like Protein*, interagit avec Bax et Bak en réponse à des signaux de mort cellulaire induit par un dommage à l'ADN (Ohtsuka et al. 2004). Cette protéine possède un domaine CARD dans sa partie C-terminale. Ce domaine peut activer certaines caspases.

•La prostaglandine E2 :

Une étude rapporte qu'une molécule non protéique, la prostaglandine E2, est capable de s'associer avec Bax et de l'activer (Lalier et al. 2007).

Des modifications physico-chimiques de l'environnement peuvent induire une activation de Bax. Il a été ainsi démontré qu'une variation de pH acide ou basique induisait une modification de conformation de Bax et sa translocation à la membrane mitochondriale (Cartron et al. 2004). De même que la chaleur peut activer Bax. Il a été démontré que dans un système acellulaire, Bax s'oligodimérise à une température de 43°C, induisant alors la perméabilisation mitochondriale (Pagliari et al. 2005).

•Le facteur de transcription p53

Le gène suppresseur de tumeur p53 est essentiel à la réponse d'un stress génomique. Ce « gardien » veille à l'intégrité du génome (Green et Kroemer 2009).

Le gène p53 est muté dans les cancers, dans environ 50% des cas. L'expression de p53 est sous la dépendance d'un certain nombre de kinases liées aux dommages de l'ADN : ATM, ATR, DNA-PK. La kinase MDM2 va favoriser la dégradation de p53 par le protéosome. En réponse à un certain nombre de stimuli, p53 va induire l'expression de protéines impliquées dans l'exécution du programme apoptotique et dans l'arrêt du cycle cellulaire. Il exerce son activité pro-apoptotique selon deux modes : un mode dépendant de sa fonction transcriptionnelle et un mode non dépendant de sa fonction transcriptionnelle.

Selon le mode transcription-dépendant, la protéine p53 va induire la transcription des gènes essentiellement impliqués dans la voie mitochondriale de l'apoptose (Michalak et al. 2005).

L'induction des gènes des récepteurs de mort, comme Fas a été rapportée sans être déterminante dans l'apoptose induite par p53 (Bennett et al. 1998).

p53 va favoriser la transduction des gènes pro-apoptotiques comme BAX (Miyashita et Reed 1995), en sachant que cette question est encore débattue (Michalak et al. 2005), mais surtout Puma (Nakano et Vousden 2001; Yu et al. 2001; Han et al. 2001), Noxa (Villunger et al. 2003) et Bid (Sax et al. 2002; Kaufmann et al. 2007). p53 réprime l'expression des gènes anti-apoptotique comme Bcl-2 et Bcl-xL.

p 53 en induisant l'expression de p21^{waf1}, inhibiteur de cdk, va favoriser l'arrêt du cycle cellulaire. Les cellules déficientes en p21 continuent à proliférer (Deng et al. 1995; Brugarolas et al. 1995). En induisant l'expression de la protéine 14-3-3σ, p53 va favoriser la séquestration cytosolique des complexes cycline/cdk (Chan et al. 1999). p53 joue également un rôle dans l'autophagie en induisant l'expression de la protéine DRAM pour *Damage Regulated Autophagy Modulator* (Crichton et al. 2006). L'induction de l'expression de la protéine TIGAR (*TP 53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*) impliquée dans le métabolisme énergétique, aurait un effet anti-apoptotique (Bensaad et al. 2006).

Le mode de l'activité non transcriptionnel-dépendant de p53 est lié aux interactions protéines-protéines générées entre les différents domaines de p53 (domaine ADN et domaine N-terminale) et ses différents partenaires.

Ces interactions sont possibles du fait que la protéine p53 est transloquée du noyau au cytosol puis à la mitochondrie où elle pourra induire et activer la perméabilisation mitochondriale (Motohiro Mihara et al. 2003).

Cette translocation du noyau au cytosol est sous la dépendance de facteurs nucléaires comme la protéine Foxo 3 ou de modifications post-traductionnelles comme la mono-ubiquitylation de p53. Il a été démontré que p53 était capable d'interagir via son domaine ADN avec les protéines Bak, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL via son domaine N-terminale avec Bax.

Pour expliquer l'activation des protéines à multidomaines pro-apoptotiques il a été proposé différents modèles.

Le premier modèle est lié à la capacité de p53 d'inhiber l'interaction entre Bak et Mcl-1 et de favoriser l'oligomérisation de Bak et son activation (Leu et al. 2004).

Dans le deuxième modèle (démontré dans un système acellulaire), p53 cytosolique est capable d'interagir directement avec Bax de manière similaire à une protéine BH3 *only*, de l'activer et de permettre à Bax de se transloquer à la mitochondrie et de s'oligomériser (Chipuk et al. 2004).

Dans le troisième modèle, p53 est cumulée dans le cytosol après l'induction d'un stress puis séquestrée par Bcl-xL. Pour exercer sa fonction pro-apoptotique p53/Bax, p53 est libérée après interaction entre Bcl-xL et Puma.

Le quatrième modèle est à l'opposé du troisième modèle. La fonction pro-apoptotique de Bax est inhibée par l'interaction avec Bcl-2 et Bcl-xL. La présence de p53 dans le cytosol va induire des interactions p53/Bcl-2 et p53/Bcl-xL et permettre à Bax de s'activer, de se transloquer à la surface membranaire mitochondriale et de s'oligodimériser.

Le cinquième modèle fait intervenir la protéine Ku70, inhibitrice de Bax. Après réaction d'acétylation, p53 va se fixer à Ku70 et permettre l'activation de Bax.

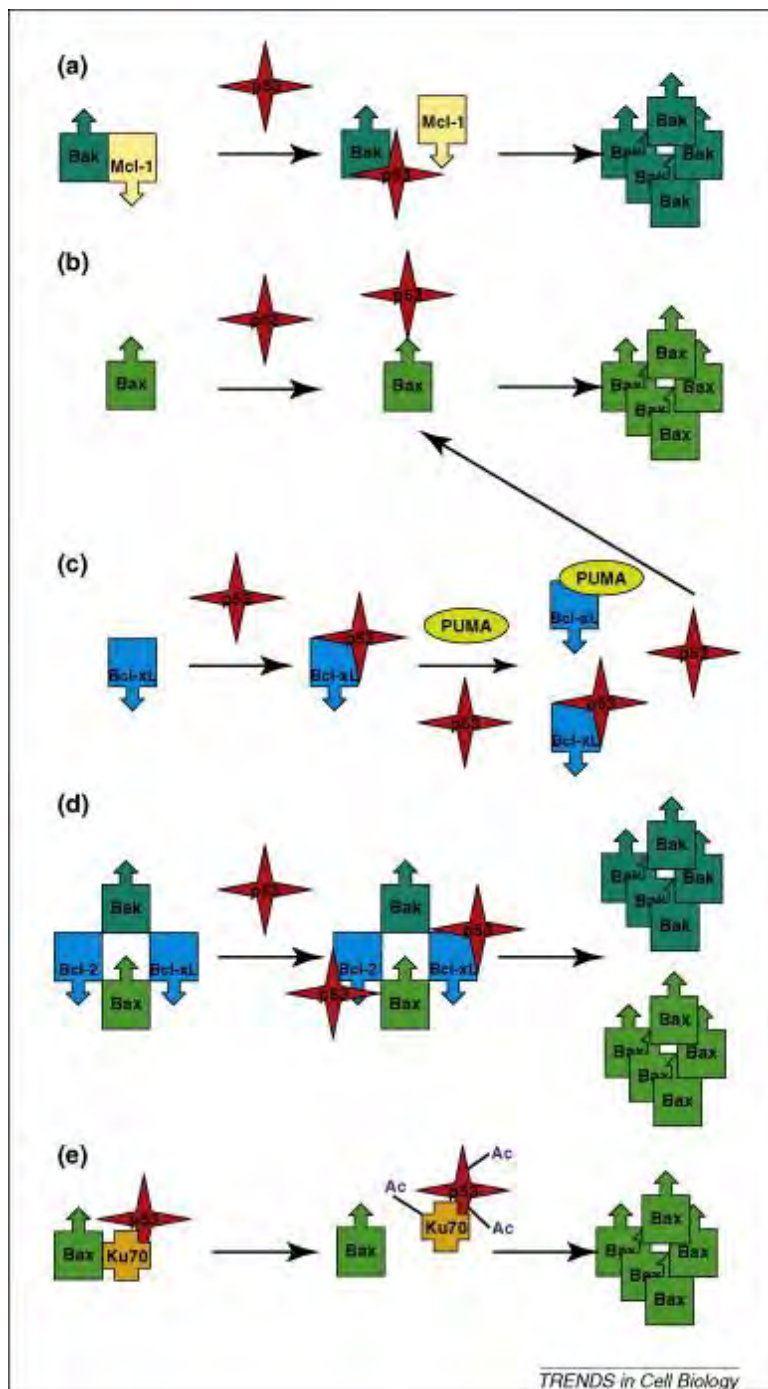


Figure 17- Modèle expliquant l'activation de l'apoptose médiée par p53 selon le mode non transcriptionnel d'après Speidel (2010).

4- Les protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 ou BH3 only .

Les membres de cette famille pro-apoptotique se caractérisent et ont en commun de ne posséder qu'un seul domaine d'homologie Bcl-2, un domaine BH3 (hélice- α amphiphile). Ils sont dénommés pour cette raison les protéines à domaine BH3 ou BH3 only. Les membres de cette famille regroupent les protéines, Bik, Bim, Bid, Noxa, Puma, Bad, Bmf, BNIP3, Beclin-1 mais aussi les isoformes Mcl-1s et Bcl-Gs.

4-1-Structure et fonction des protéines à domaine BH3 only :

Une analyse phylogénique du domaine BH3 des membres de cette famille suggère que le corps de ce domaine est constitué d'un motif d'une séquence de 7 acides aminés, LXXXGDE, où X est représenté par n'importe quel acide aminé (Lanave, Santamaria et Saccone 2004). Récemment les données structurales semblent définir une séquence conservée de 13 acides aminés (Day et al. 2005; Day et al. 2008).

consensus	$\Phi_1\Sigma XX\Phi_2XX\Phi_3\Sigma'DZ\Phi_4\Gamma$	
mmBim	DLRPEIRIAQELRRIGDEFNETYTRRVFAN	168
hsBim	DMRPEIWIQAQELRRIGDEFNAYYARRVFLN	170
mmPuma	EE EW AREITGAQLRRMADDLNAQYERRRQEE	159
mmNoxaA	RAELPPEFAAQLRKIGDKVYCTWSAPDITV	45
mmNoxaB	VPADLKDECAQLRRIGDKVNLROKLLNLIS	96
hsNoxa	PAELEVECATQLRRFGDKLNFRQKLLNLIS	47
mmBmf	QHR AEVQ IARKKLQCIADQFHRLHTQQHQQN	156
mmBad	NLWAAQRYGRELRRMSDEFEGSFKGLPRPK	169
mmBid	QEETITHNIARH LAQ IGDEM DHNI QPTLVVRQ	108
mmBak	PNS IL GQVGRQLALIGDDINRRYDTEFQNL	93
hsBak	PSSTMGQVGRQLATIGDDINRRYDSEFQTM	96
mmMule	PGGTTQEVGQLLQDMGDDVYQQYRSLTRQS	1998
mmBeclin	DG GT MENLSRRLKVTGDLFDIMSGQTDVDH	132

Figure 18- analyse phylogénique du domaine BH3 des membres de la famille des protéines BH3 only d'après Day et al. (2008).

Les résidus leucine et acide aspartique présents dans le corps du domaine BH3 ont un rôle déterminant dans les interactions avec les protéines à multidomaines pro-apoptotiques et anti-apoptiques. L'étude de la structure de la protéine Bid a démontré qu'elle était très proche des protéines anti-apoptotiques. Bid est constitué de deux hélices- α hydrophobes (les hélices- $\alpha 5$ et - $\alpha 6$) entourées de six hélices- α amphiphiles (Chou et al. 1999; McDonnell et al. 1999). Dans cette conformation non active, le domaine BH3 est masqué. En cas de clivage, la protéine change de conformation et le domaine est alors démasqué et actif. Une étude a montré que les protéines Bim, Bad et Bmf sont quant à elles intrinsèquement non structurées et que leur domaine BH3 acquiert une structure α hélice après interaction avec un membre des protéines multidomaines anti-apoptotiques (Hinds et al. 2007).

Au regard de toutes les données expérimentales qui ont défini la structure des protéines BH3 *only* et étudié leurs interactions, on a pu établir que le domaine BH3 représente le domaine « minimum de mort » (Kelekar et Thompson 1998).

Une mutation induite dans ce domaine BH3 des protéines BH3 *only* est suffisante pour inhiber leur interaction avec les protéines anti-apoptotiques et de leur faire perdre leur activité pro-apoptotique (Boyd et al. 1995; Inohara et al. 1997; Zha et al. 1997; O'Connor et al. 1998; Puthalakath et al. 2001).

La fonction pro-apoptotique des ces protéines se résume-elle uniquement à leur capacité à interagir avec les protéines anti-apoptotiques ?

Des données expérimentales suggèrent que ces protéines à domaine BH3 *only* sont capables d'induire la perméabilisation mitochondriale et de libérer le cytochrome c (Letai et al. 2002a). Certains auteurs ont défini deux classes de protéines à domaine BH3 *only*. Les protéines dites activatrices et les protéines sensibilisatrices. Les protéines activatrices (Bid, Bim) sont capables d'interagir avec la forme oligomérique de Bak et d'induire une libération mitochondriale du cytochrome c. Les protéines sensibilisatrices (Bad, Bik, Noxa) induisent la libération du cytochrome c après interaction avec les protéines anti-apoptotiques en favorisant la translocation de Bid à la membrane mitochondriale (Wang et al. 1996).

4-2-Mode de régulation de l'activité des protéines BH3 only :

Le mode de régulation des protéines à domaine BH3 *only* peut avoir lieu au niveau transcriptionnelle, traductionnelle ou post traductionnelle.

4-2-1-Au niveau transcriptionnelle :

En absence de signaux de mort cellulaire, le niveau d'expression des protéines à domaine BH3 *only* est faible, voir indétectable. Les signaux de mort cellulaire vont induire la transcription d'un certains nombre de facteur de transcription activateur, comme E2F1 (Hershko et Ginsberg 2004; Real et al. 2006; Subramanian et al. 2007), FOXO3a (Gilley, Coffey et Ham 2003; Dijkers et al. 2000; Sunter et al. 2003), p53, c-Myc. Mais d'autres vont au contraire réprimer l'expression de protéines BH3 *only* comme DREAM (Sanz et al. 2001) ou NFkB (Shaw et al. 2008).

Il a été aussi démontré pour Bnip3 (Okami, Simeone et Logsdon 2004), Noxa (Yamashita et al. 2008) et Bik (Pompeia et al. 2004; Zunyan Dai et al. 2006), que leur expression pouvait être réprimée par des mécanismes épigénétiques (méthylation ou histone acétylation de leur site promoteur).

4-2-2-Au niveau traductionnelle : stabilité et inhibition de l'ARNm

La protéine Bim existe sous trois isoformes issues d'épissage alternatif : Bim_{EL} (23 kDa), Bim_L (19 kDa), et Bim_S (15 kDa), qui possèdent un domaine BH3 (O'Connor et al, 1998). Elles diffèrent par leur potentiel pro-apoptotique. Bim_S étant le plus apoptogène (Bouillet et al. 2001). Des données expérimentales suggèrent que la privation de facteurs de croissance conduit, selon le type cellulaire, à l'expression de Bim (Putcha et al. 2001; Whitfield et al. 2001; Shinjyo et al. 2001) et à une seule isoforme (Putcha et al. 2001; Whitfield et al. 2001). La prépondérance d'une seule isoforme indique l'existence de mécanisme de régulation au niveau de l'épissage du pré-ARN (Puthalakath et Strasser 2002). La stabilité de l'ARNm de Bim a été rapportée. Il serait lié à la présence d'une séquence riche en AU présente à l'extrémité 3' non transcrite (Matsui, Asou et Inaba 2007). L'ARNm de Bim peut être inhibé par le micro ARN-17-92 (Xiao et al. 2008).

4-2-3- Au niveau post-traductionnelle:

Cette régulation va reposer sur des réactions de phosphorylation, de protéolyse (clivage), de localisation subcellulaire et de séquestration.

a-Phosphorylation :

Les réactions de phosphorylation peuvent être activatrices ou inhibitrices des protéines à domaine BH3 *only*. La phosphorylation de Bad induit une perte de ses propriétés pro-apoptotiques (Zhou et al. 2000).

Cette phosphorylation sur les résidus S112 et S136 est induite par Akt (Datta et al. 1996) et va favoriser sa séquestration dans le cytoplasme par liaison avec la protéine 14-3-3 (Zha et al. 1996a). Alors que sa déphosphorylation par calcineurine (phosphatase) va activer sa fonction pro-apoptotique (Wang et al. 1999).

Il a été démontré que la phosphorylation par la kinase PKA du résidu S155 de Bad diminue l'affinité de cette dernière pour les protéines anti-apoptotiques (Harada et al. 1999). La phosphorylation de Bik, à l'inverse, augmente son activité pro-apoptotique sans perte de ses propriétés d'interaction avec les membres de la famille des protéines anti-apoptotiques (Verma, Zhao et Chinnadurai 2001).

Concernant Bim, sa phosphorylation est nécessaire à son activité pro-apoptotique. La mutation de Thr 112 induit une perte d'affinité d'interaction entre Bim et Bcl-2 et favorise la survie cellulaire. Au contraire des mutations portant sur la Ser 55, 66 et 73 de Bim induisent une réponse apoptotique et une diminution de sa dégradation par le protéosome (Hübner et al. 2008).

b-Protéolyse ou clivage

Le clivage protéolytique est un mécanisme d'activation possible des protéines à domaines BH3 *only*. A l'état basal, Bid (22kDa) est sous sa conformation inactive (domaine BH3 masqué) et cytosolique. Les signaux de mort cellulaire transduits par les récepteurs de mort vont activer la procaspase 8 en caspase 8.

Cette dernière va cliver Bid (15kDa, p15-tBid) (Luo et al. 1998; Li et al. 1998). Ce clivage va induire une modification de la conformation de Bid. Le domaine BH3 est démasqué et activé.

Cette forme tronquée de Bid a une plus grande affinité à la fois pour les protéines à multidomaines anti et pro-apoptotique (Wei et al. 2000; Desagher et al. 1999) et favorise ainsi la perméabilité mitochondriale (X Luo et al. 1998; Li et al. 1998). Bid peut être aussi clivée par Granzyme B (Barry et al. 2000; Heibein et al. 2000). Il s'agit d'une protéase des lymphocytes T cytotoxique qui génère une forme tronquée de Bid de 13kDa (p13-tBid).

Il semblerait que la forme tronquée p15tBid/caspase 8 a une affinité pour Bak et la forme p13tBid/Granzyme B une affinité pour Bax (Cartron et al. 2003). Bax et Bak ont une fonction non redondante dans l'apoptose induite par Bid.

c-Localisation subcellulaire et séquestration

L'activité des protéines à domaine BH3 *only* peut être régulée par une relocalisation subcellulaire et une séquestration.

Les protéines Bim et Bif sont séquestrées dans le cytosol au sein de complexe moléculaire. Dans ces complexes leur conformation est inactive. Pour exercer leur fonction elles doivent être libérées de ces complexes.

Bim-L et Bim-EL, dans une cellule normale, sont associées à la protéine LC8 qui est un des composants du complexe moteur de la dynéine (Puthalakath et al. 1999).

Quant à la forme Bim-s, elle ne possède pas de domaine d'interaction avec LC8.

Après induction des signaux de mort (privation de facteurs de croissance ou chimiothérapie par paclitaxel) les interactions entre LCP8 et les isoformes L et EL de Bim sont rompues et ces deux isoformes se retrouvent localisées dans le cytosol.

Dans les cellules tumorales Bim a une localisation essentiellement mitochondriale (Certo et al. 2006). La protéine Bim-L est, quant à elle, séquestrée après interaction avec la chaîne légère de la dynéine (DLC2) au niveau du cytosquelette d'actine, constituant du complexe moteur de la myosine (Puthalakath et al. 2001). Les agents qui provoquent une dépolymérisation de l'actine vont induire sa relocalisation dans le cytosol.

Nous avons vu que Bid était séquestrée par le complexe 14-3-3 et que son clivage par la caspase 8 permettait alors son activation et sa translocation à la membrane mitochondriale. Cette translocation à la mitochondrie est possible car Bid va subir un processus de N-myristylation (Zha et al. 2000).

d-Facteurs de transcriptions

•Le facteur de transcription c-Myc :

Le pro-oncogène c-Myc joue un rôle déterminant dans le contrôle de la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Ce gène est le gène le plus souvent dysrégulé au décours de la carcinogenèse. Il est surexprimé dans un certain nombre de pathologies néoplasiques comme, les lymphomes, les tumeurs mésenchymateuses et épithéliales (Evan et Littlewood 1993; Henriksson et Lüscher 1996). Les mécanismes impliqués dans la dysrégulation de c-Myc sont multiples (Vervoorts, Lüscher-Firzlaff et Lüscher 2006).

Il a été décrit au niveau chromosomique des translocations et des amplifications, des modifications post traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination, acétylation) et son expression peut être modulée par l'activation des voies oncogéniques médiées par les cascades de transduction HER2/Ras/MAPK/ERK et PI3/Akt/mTor.

Ce facteur de transcription va orchestrer l'activation ou la répression de la transcription de 10 à 15% de l'ensemble des gènes d'une cellule par différents mécanismes : recrutement des histones acétylase, protéines du remodelage de la chromatine, facteurs co-activateurs et co-répresseurs de la transcription et ADN méthyltransférase (Dang et al. 2006).

Les gènes cibles sont impliqués dans le cycle cellulaire, la survie, la synthèse protéique, l'adhésion, l'angiogenèse, le métabolisme et l'expression des micro-ARN cellulaires.

La protéine c-Myc possède dans sa région C-terminale deux domaines (Hoffman et Liebermann 1998; Nilsson et Cleveland 2003), un domaine d'interaction protéique et un domaine de liaison avec l'ADN. Au niveau de la région N-terminale, il est décrit quatre domaines MYC box (Myc box I, II, III, IV) impliqués dans la stabilité protéique et la fonction activatrice ou répressible de la transcription des gènes cibles (Oster et al. 2002; Oster et al. 2003). Il ne peut exercer sa fonction régulatrice de la transcription qu'après interaction avec Max. Il a été identifié par la suite d'autres partenaires comme Mxi et Mad. Les complexes Myc-Max auraient un rôle activateur dans la transcription, en association avec des co-activateurs (TRRAP, BAF53), et les complexes Mnt-Max et Mad-Max un rôle répresseur association avec des co-répresseurs (mSin3A et mSin3B) (Nilsson et Cleveland 2003; Eisenman 2000; Baudino et Cleveland 2001; Lüscher 2001; Hurlin et Huang 2006; Rottmann et Lüscher 2006).

Comme « Dr Jekyll et Mr Hyde » c-Myc va favoriser soit un arrêt du cycle cellulaire/mort cellulaire ou bien une progression dans le cycle cellulaire/survie cellulaire (Evan 2006b).

L'implication de c-Myc dans l'apoptose s'exerce selon deux modes fonctionnels, un mode p53 dépendant et p53 indépendant.

Le modèle p53 dépendant met en jeu les protéines ARF et ATM en réponse à l'induction de signaux de stress. La protéine ARF va inhiber la fonction régulatrice négative de la protéine Mdm2 (Zindy et al. 1998).

L'expression de la protéine ARF est FoxO dépendante qui est elle même induite par c-Myc (Bouchard et al. 2007). En réponse à des doubles cassures sur l'ADN c-Myc va induire la transcription de la protéine ATM qui va réguler positivement le niveau d'expression de p53.

Il existe une coopération entre la voie ARF et la voie ATM pour activer l'apoptose.

p53, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, va aussi induire un arrêt du cycle cellulaire en G1 par l'expression de la protéine p21. Cette expression est induite par un rétrocontrôle négatif de l'expression de c-Myc (Guillouf et al. 1995).

Il a été démontré que c-Myc était capable de réguler négativement p21 en se fixant sur le domaine Miz1 de son site promoteur (Vousden et Lu 2002).

De toute évidence, le niveau d'expression de p53 et de c-Myc devrait déterminer si l'expressoin de p21 est induite ou réprimée, et par conséquent si la cellule entre en apoptose ou arrête son cycle cellulaire.

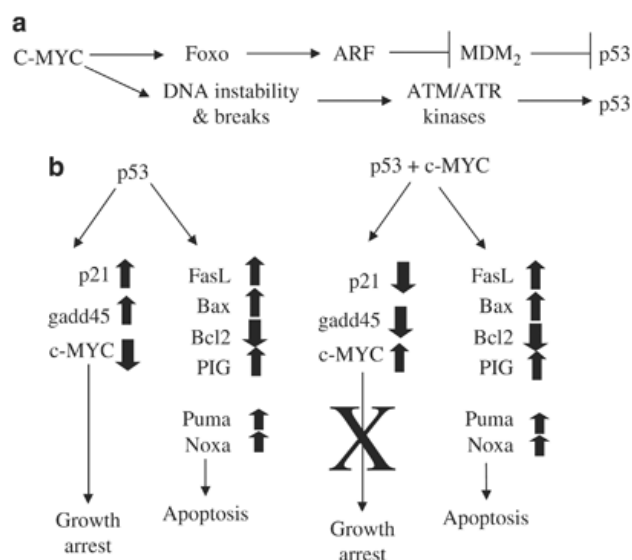


Figure 19- Implication de c-Myc dans l'apoptose selon un mode p53 dépendant et indépendant d'après Hoffman et Liebermann (2008).

Les travaux de Hemann et al.(2005) ont démontré que c-Myc peut induire l'expression de Bim de manière p53 indépendante.

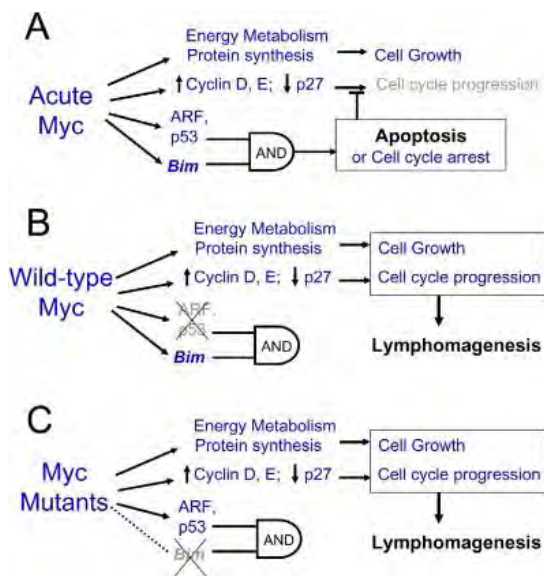


Figure 20- implication de c-Myc dans la carcinogenèse selon Dang, O'donnell, et Juopperi (2005).

D'autres travaux ont permis de définir que c-Myc pouvait amplifier la voie mitochondriale de l'apoptose. Il induit l'expression de Bax soit au niveau transcriptionnel soit post-traductionnel (Mitchell et al. 2000; Juin et al. 2002), possiblement via la coopération avec la caspase 2 (Cao, Bennett et May 2008).

Il réprime l'expression de Bcl-2 (Hoffman et Liebermann 1998; Nilsson et Cleveland 2003), de Mcl-1 (Hoffman et Liebermann 1998; Nilsson et Cleveland 2003), de Bcl-xL (Eischen et al. 2001a). Il induit aussi l'expression de NOXA (Nikiforov et al. 2007b) et de Bid (Iaccarino et al. 2003). c-Myc peut aussi promouvoir l'apoptose médiée par les récepteurs de la mort cellulaire.

Il va réprimer l'expression de FLIP (Ricci et al. 2004), de NFκB (Ricci et al. 2007) et induire la transcription de FasL (Amanullah, Liebermann et Hoffman 2002; Kasibhatla et al. 2000; Brunner et Martin 2004).

•*Le facteur de transcription E2F1 :*

La famille des facteurs de transcription E2F joue un rôle déterminant dans la progression du cycle cellulaire. E2F régule l'expression de nombreux gènes impliquée dans dans la réplication, la réparation de l'ADN, la différenciation cellulaire et l'autophagie (Polager et Doron Ginsberg 2009). E2F1 peut induire l'apoptose selon un mode p53 dépendant et indépendant.

Cette famille est constituée de 8 gènes (E2F1-8) qui codent pour 9 protéines. Selon leur capacité à interagir avec Rb, leur structure et leur activité transcriptionnelle, les membres de cette famille sont subdivisés en deux sous catégories. E2F1, E2F2, E2F3A interagissent avec la protéine Rb et ont une activité transcriptionnelle activatrice et sont dénommés les membres E2F activateurs. Quant aux membres E2F4-8, ils ont une activité répressive de la transcription (E2F répresseurs). Les activateurs sont impliqués dans la prolifération alors que les répresseurs dans la différenciation.

Cependant E2F1 peut avoir une activité dichotomique, à savoir une action oncogénique et anti-oncogénique, agissant alors comme un gène suppresseur de tumeur. Toute dysrégulation de E2F1 (mutation de Rb, amplification de CCND1, perte d'expression de INK4) va induire une activité d'hyperprolifération qui va être contrecarrée par une induction de l'apoptose. Des données laissent supposer qu'il existe des interactions entre la voie ARF-MDM2-p53 et la voie INK4A-Rb-E2F et en particulier entre les facteurs de transcription E2F1 et p53. Cette coopération va induire des signaux de mort. E2F1 va induire une stabilisation de p53, son activation et induire, comme nous l'avons décrit plus haut, des signaux de mort cellulaire.

E2F1 peut aussi par son action activatrice induire l'expression de gènes pro-apoptotiques comme les caspases, Apaf-1, SIVA (Fortin et al. 2004; Moroni et al. 2001) ou bien les protéines à domaines BH3 comme NOXA, PUMA (Wu et al. 2001; Nakano et Vousden 2001). E2F1 et p53 vont réguler négativement l'expression de protéines à multi-domaines anti-apoptotiques comme Mcl-1 (Croxtton et al. 2002; Leu et al. 2004).

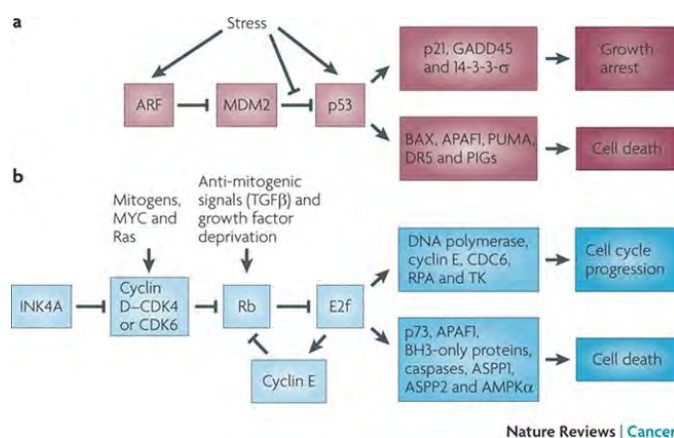


Figure 21- activité régulée par p53 (a) et E2F (b) d'après Polager et Ginsberg(2009).

Cependant le mode exacte d'action de ces protéines reste très débattu. Deux modèles s'opposent. Le modèle activation/interaction et le modèle de déplacement/neutralisation.

4-3-1-Le modèle d'activation directe/interaction

Le modèle d'activation/interaction est basé sur les données expérimentales obtenues en milieu acellulaire testant la capacité de Bax recombinante d'induire la libération du cytochrome c de mitochondries isolées ou de liposomes artificiels, en présence de peptide BH3. Cette théorie a été développée par Letai et al. (2002a)

Avant de réaliser la perméabilisation de la mitochondrie Bax et Bak doivent être activés et les protéines à multidomaines anti-apoptotiques doivent être neutralisées par les protéines à domaines BH3 *only*.

Il est alors défini des protéines à domaine BH3 *only* activatrice, comme Bim, tBid et Puma par leur capacité d'interagir directement avec Bax et Bak (Letai et al. 2002 ; Kuwana et al. 2005 ; Cartron et al. 2004).

Les protéines dites sensibilisatrices comme les protéines Bad, Noxa, vont interagir avec les protéines à multidomaines anti-apoptotiques induisant une libération des protéines pro-apoptotiques (Willis et al. 2005; Willis et al. 2007).

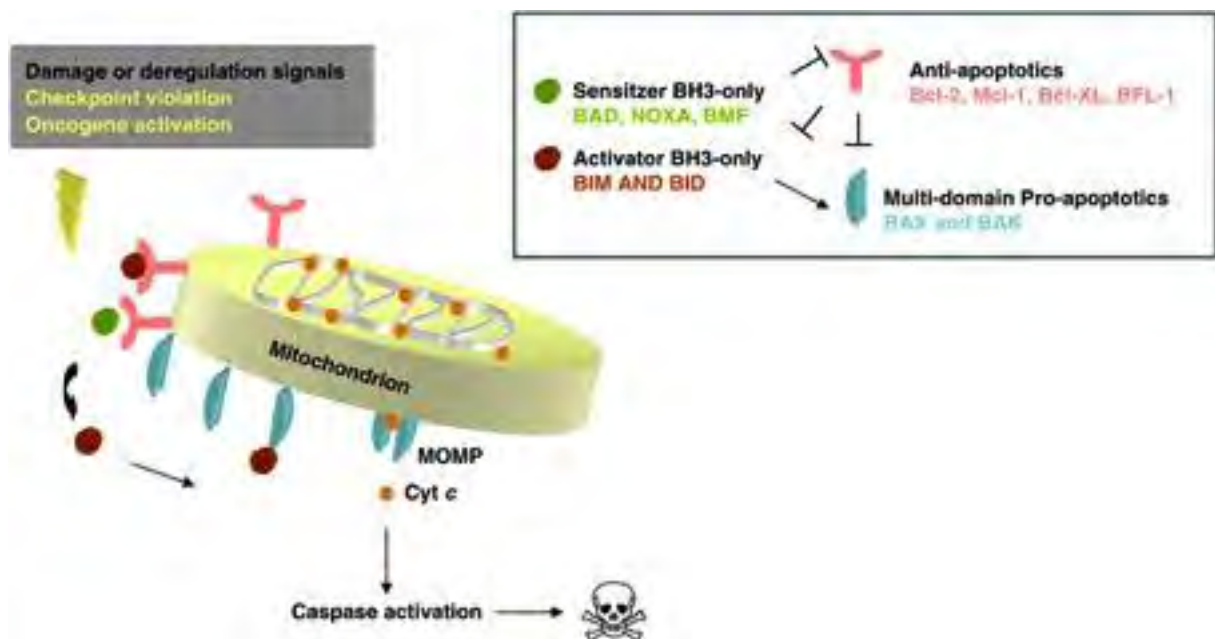


Figure 24- Modèle activation/interaction défini selon Chonghaile et Letai (2008a)

4-3-2-Le modèle de déplacement/neutralisation

Ce modèle a été proposé par les groupes d'Andreas et de David Huang. Ce modèle est basé sur les données expérimentales qui ont défini un gradient d'affinité entre les différentes protéines à domaine BH3 *only* pour les protéines à multidomaines anti-apoptotique.

Bid, Bim et Puma sont capable d'interagir avec toutes les protéines à multi-domaines anti-apoptotiques alors que Bad ne peut interagir qu'avec Bcl-2, Bcl-xL et Noxa, et Bcl-W qu'avec Mcl-1 et A1/Bfl-1 (Chen et al. 2005; Deng et al. 2007).

	Activators		Sensitizers					
	BIM	BID	BAD	BIK	NOXA	HRK	PUMA	BMF
BCL-2								
BCL-XL								
BCL-w								
MCL-1								
BFL-1								

Tableau 2: affinité des protéines à domaine BH3 only avec les protéines à multidomaines anti-apoptotiques. Rouge haute affinité, orange faible affinité, vert aucune affinité d'après Deng et al. (2007).

Dans ce modèle les protéines à multidomaines anti-apoptotique inhibent l'activation de Bax/Bak. Des données récentes démontrent du moins pour Bak que cette inactivation serait liée à une interaction directe entre Bak et les protéines de survie (Willis et al. 2005; Willis et al. 2007).

Dans les cellules saines, Bak constitue des complexes avec Mcl-1 ou Bcl-xL (Willis et al. 2005). Sous l'effet de stimuli pro-apoptotique les protéines BH3 *only* vont déplacer Bak de ces protéines de survie. Noxa et Bad vont activer Bak en le libérant de ses interactions avec Mcl-1 et Bcl-xL. Au sein du complexe Bak/Mcl-1, le domaine BH3 est masqué et donc Bak est dans une conformation inactive. Le déplacement de Bak par Noxa et Bad va induire un changement de conformation et son activation.

Ce modèle semble être transposable à Bax. Il a été démontré dans des cellules vivantes que Bax pouvait interagir avec des protéines de survie (Oltvai, Millman et Korsmeyer 1993; Sedlak et al. 1995; Zha et al. 1996b; Wang et al. 1998). Cependant, la majorité des protéines de Bax sont cytosoliques et sous une forme monomérique et donc dans une conformation inactive. Pour être active Bax doit être transloquée au niveau de la membrane mitochondriale.

Pour Chonghaile et Letai (2008a) les protéines à domaine BH3 *only* seraient capables d'interagir avec Bax sous sa forme monomérique et inactive ; puis induire son activation par un mécanisme d'agrégation.

Cette hypothèse n'est cependant étayée par aucune donnée expérimentale et la nature des signaux de mort qui induisent l'activation n'est pas connue.

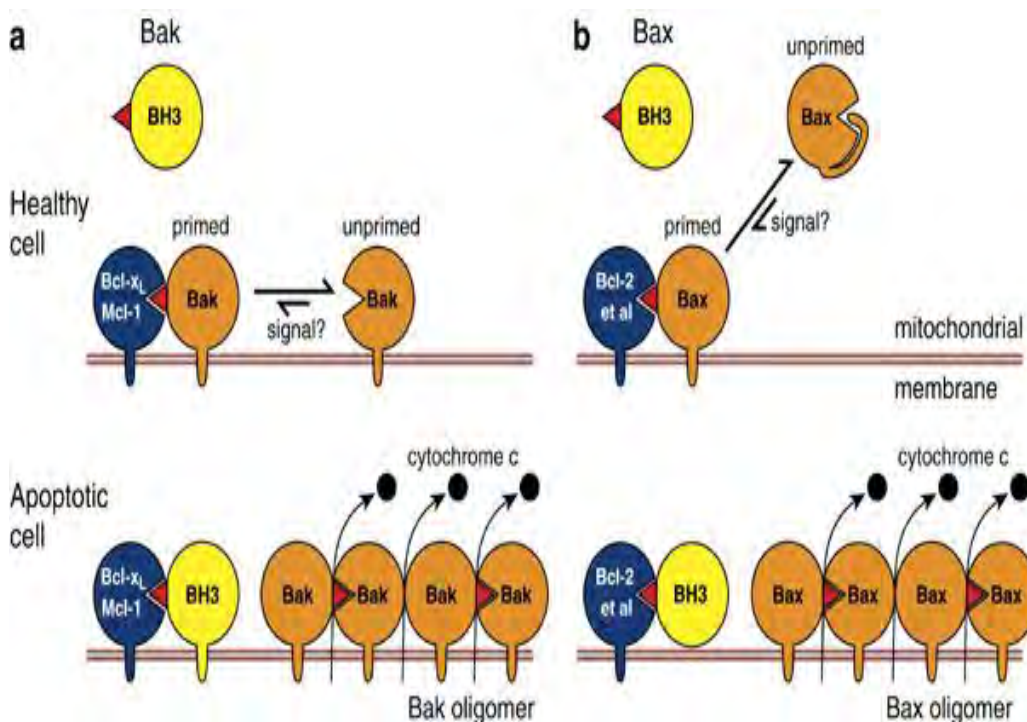


Figure 25 activation de Bak et Bax selon le modèle de déplacement d'après Adams et Cory (2007).-

En somme, ces deux modèles ont leurs partisans et leurs détracteurs. Mais pour certains points ils arrivent aux mêmes conclusions. Les protéines à domaine BH3 *only* Bid, Bim et Puma sont les protéines les plus efficaces à induire la mort cellulaire. Ce qui oppose ces deux modèles de manière plus fondamentale, c'est la fonction attribuée aux protéines de la famille de Bcl-2.

Dans le modèle de déplacement, la mort cellulaire est constamment inhibée par les protéines multidomaines anti-apoptotiques, par conséquent l'option par défaut pour la cellule est la mort. Alors que dans le domaine de l'activation, c'est la vie qui est l'option par défaut de la cellule. Sa mort est induite par l'activation de certaines protéines à domaine BH3 *only*, induisant l'activation de Bax de manière indépendante des protéines de survie. Dans le cadre des cellules tumorales les protéines à domaine BH3 activatrices seraient séquestrées par des protéines de survie. Ce type de cellule serait sensibilisé à la mort *prone to death* avant que la protéine BH3 de type dé-répresseur ne libère les protéines à domaine BH3 et ne leur permette d'activer Bax (Certo et al. 2006).

De ces constations le groupe de Letai (Deng et al.2007) a pu définir trois niveaux ou bloc (A, B, C) de résistance à l'apoptose.

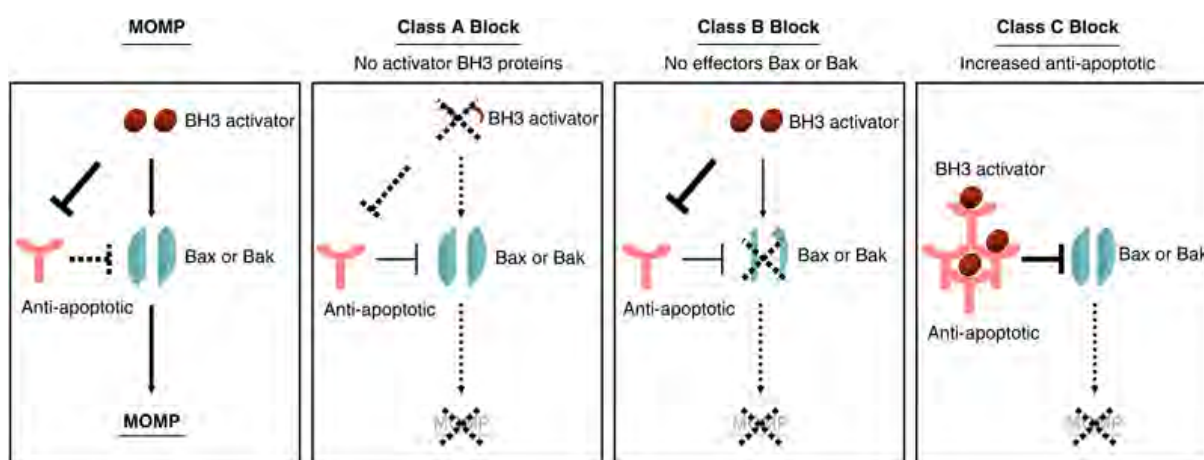


Figure 26- modélisation de l'échappement tumoral à l'apoptose selon le modèle de Chonghaile et Letai (2008a).

- Le bloc A : correspond à l'absence de BH3 activateur mais Bax et Bak sont exprimées.
- Le bloc B : correspond à l'absence d'expression de Bax et Bak mais les protéines BH3 activatrices sont exprimées.
- Le bloc C : correspond à une surexpression des protéines de survie alors que Bax et Bak ainsi que les protéines BH3 activatrice sont exprimées.

E-Le ciblage thérapeutique des protéines anti-apoptotiques.

La manipulation pharmacologique à visée thérapeutique des protéines à multidomaines anti-apoptotiques ainsi que des IAPs est donc intéressante. Nous avons vu le rôle primordial des interactions entre les protéines à domaines BH3 avec les protéines à multidomaines pro ou anti-apoptotiques. Cette interaction constitue donc une cible thérapeutique potentielle. La synthèse de protéines dites BH3 mimétiques aura pour finalité de favoriser les interactions entre les protéines à domaines BH3 *only* et les protéines à multidomaines pro-apoptiques tout en neutralisant les protéines à multidomaines anti-apoptotiques (Lindsten et al. 2000). Cette approche a conduit à la recherche, par criblage ou par modélisation moléculaire, de la constitution de molécules dénommées BH3 mimétiques.

Ces peptides se caractérisent par leurs capacités d'interagir avec le domaine BH3 des protéines à multidomaines anti-apoptotiques (dissociation du complexe BH3 *only*/Bcl-xL) et d'induire l'apoptose (Bettaieb et al. 2003; Shing-Leng Chan et Yu 2004). Ces molécules vont reproduire la structure tridimensionnelle du domaine BH3.

Il est actuellement décrit deux grandes familles. Les peptides BH3-mimétiques et les molécules naturelles ou de synthèse.

Les peptides BH3 mimétiques sont constitués des séquences peptidiques du domaine BH3 des protéines à multidomaines pro-apoptotiques tels que Bax, ou Bak. D'un point de vue expérimental, elles sont capables de dissocier Bcl-xL de ses partenaires.

Afin d'améliorer la diffusion de ces agents à travers la membrane cytoplasmique, ils sont couplés soit à une molécule de type peptide, *penetratrine-homodomain* d'*Antennapedia* (Ant), ou lipidique (BioPORTER@).

Il existe actuellement deux molécules BH3 mimétiques, Atn-Bax et Atn-Bak, homologue respectivement de Bax et de Bak. Les modèles in vitro ont démontré que ces molécules étaient capables, en agent simple, de dissocier les complexes constitués par les

partenaires des protéines à multidomaines Bcl-2/Bcl-xL et d'induire un message de mort cellulaire pro-apoptotique.

L'Atn-Bax en libérant Bax du complexe Bax/Bcl-xL va induire une libération de Bax, une modification de sa conformation et par conséquent son activation (Moreau et al. 2003). L'association avec la doxorubicine, dans des modèles cellulaires de cancer de l'ovaire induit un message de mort cellulaire et prévient l'apparition de mécanismes de résistance (Minko, Dharap et Fabbriatore 2003).

Pour améliorer soit l'index thérapeutique des peptides BH3 mimétiques ou leur diffusion, il a été développé des analogues. L'équipe de Letai (Letai et al. 2002b) a mis au point des peptides uniquement constitués de l'hélice- α des domaines BH3 de Bid et Bim.

Ces molécules vont s'oligomériser avec Bax et Bak et induire un message de mort cellulaire avec libération du cytochrome c par la mitochondrie. Les peptides correspondant aux domaines BH3 de Bad et Bik vont interagir avec Bcl-xL.

Cette interaction va inhiber la séquestration de Bax et Bak par Bcl-xL. De ces résultats, il est décrit des molécules *Bid-like* molécules capables d'activer Bax et Bak et des molécules dites *Bad-like* qui sensibilisent la cellule en interagissant avec les protéines à multidomaines anti-apoptotiques.

L'équipe de Walensky a développé des peptides constitués d'une hélice hydrocarbonée stabilisée du domaine BH3 de Bid (SABH : *Stabilized alpha-helix of Bcl-2 domain*) et de groupes methyl et alkyl, afin d'augmenter la stabilité de ces agents thérapeutiques (Walensky 2006; Walensky et al. 2004). Ces molécules sont résistantes à l'action des protéases, diffusent facilement à travers la membrane cytoplasmique et ont une grande affinité pour la poche hydrophobe des protéines à multidomaine anti-apoptotiques Bcl-2.

C'est pour ces raisons en autres, que des molécules dites de synthèse ont été développées. Leur fonctionnalité pharmacologique est d'inhiber la fonction des protéines à multidomaine anti-apoptotiques par encombrement de leur poche hydrophobe.

Parmi les 9 composés décrits un certain nombre d'entre eux sont en développement pré-clinique les dérivés BH3 inhibiteurs (Degterev et al. 2001 ; Xing et al. 2007 ; J Wang et al. 2000), antimycine (Enyedy et al. 2001; Piskernik et al. 2008; Tzung et al. 2001),

TW37 (Mohammad et al. 2007; Zeitlin et al. 2006; Karl et al. 2007), chélérythrine (Chan et al. 2003; Zhang et al. 2006), tétrocarcine A et d'autres en phase précoce clinique comme le gossypol et son dérivé apogossypolone (Oliver et al. 2005; Arnold et al. 2008; Etxebarria et al. 2008; Zhan et al. 2009; Banerjee et al. 2010), l'obatoclax (Trudel et al. 2007; Pérez-Galán et al. 2007; Jiang et al. 2009; Paik et al. 2010), l'HA 14-4 (Oliver et al. 2007; Pei, Yun Dai et Grant 2004; Doshi, Tian et Xing 2006; Lickliter et al. 2003) et l' ABT-737 et son dérivé oral ABT-263. Ce sont des molécules de faible poids moléculaire (<750 Da) organiques, naturelles ou de synthèse. Dans la suite de notre exposé nous n'évoquerons que l'ABT-737.

Composé	Affinité	cibles
Dérivés BH3 Is	μM	Bcl-2; Bcl-xL, Bcl-w
Antimycine A	μM	Bcl-2; Bcl-xL,
Chélérythrine	μM	Bcl-2; Bcl-xL,
Tétrocarcine A	μM	Bcl-2; Bcl-xL,
TW-37	sub-μM	Bcl-2; Bcl-xL, Bcl-w, A1,

		Mcl-1
HA14-1	μM	Bcl-2; Bcl-xL, Bcl-w?
Gossypol Apogossypolone	sub- μM	Bcl-2; Bcl-xL, Mcl-1
Obatoclax	sub- μM	Bcl-2; Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1
ABT-743 et son derivate orale ABT-263	nM	Bcl-2 ; Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-B

Tableau 3: molécules naturelles ou de synthèse BH3 en développement pré-clinique et clinique.

L'ABT-737 interagit avec une forte affinité (nM) avec les protéines à multidomaines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w (Oltersdorf et al. 2005). L'induction du message de mort cellulaire s'accompagne par une activation des caspases 3 et 9 après diminution du potentiel mitochondrial (Chauhan et al. 2007; Konopleva et al. 2006).

Il semblerait que la capacité de cet agent à induire un signal de mort soit spécifique du type cellulaire, mais surtout du profil d'expression des protéines à multidomaines pro et anti-apoptotiques. L'effet tumoral de l'ABT-737 est dépendant de la présence de Bcl-2 et de Bax (Chen et al. 2007).

Des études ont démontré qu'une forte expression de Mcl-1 réduit la réponse en agent simple à l'ABT-737 (Chauhan et al. 2007; Konopleva et al. 2006; Wesarg et al. 2007; Tahir et al. 2007). Mcl-1 serait alors considéré comme un marqueur de résistance à cet agent (Kang et al. 2008).

Il a été démontré que l'ABT-737 était capable aussi d'induire de l'autophagie en interagissant avec Beclin-1 (Maiuri et al. 2007) et par inhibition de l'interaction Beclin-1/Bcl-xL/Bcl-2 (complexe inhibant l'autophagie).

L'ABT-737 potentialise l'action pro-apoptotique des agents cytotoxiques (paclitaxel, agents alkylant, fludarabine) comme le démontre certaines données pré-cliniques (Campàs et al. 2006; Chauhan et al. 2007) y compris sur des lignées cellulaires dites résistantes (Kutuk et Letai 2008; Bray et al. 2009). Il sensibilise aussi l'action d'agents agissant sur la voie des récepteurs de mort.

L'association de TRAIL ou de Fas ligand à l'ABT-737 induit une modification de conformation de Bax par dissociation du complexe Bim/Bcl-xL (Huang et Sinicrope 2008). La libération de Smac de la mitochondrie va favoriser la mort cellulaire en levant l'inhibition des caspases par les IAPs.

En somme, l'ensemble de ces agents est capable d'induire la mort cellulaire par apoptose en agent simple. Leur action est dépendante du contexte cellulaire et du profil d'expression des protéines à multidomaines pro et anti-apoptotiques.

Les cellules tumorales sont alors dans un état *primed to death* résultant de l'inhibition des protéines à multidomaines pro-apoptotique par les protéines à multidomaines anti-apoptotiques (Chonghaile et Letai 2008b).

En présence des agents BH3 mimétiques ces protéines à multidomaines pro-apoptotiques vont être activées soit directement (Zimmermann et al. 2005), par interaction directe entre ces agents et Bax/Bak, (BH3 activateur) ou indirectement en interagissant avec les protéines à multidomaines anti-apoptotiques (BH3 sensibilisateur).

Réguler négativement les inhibiteurs des caspases est une deuxième option thérapeutique. Nous avons vu plus haut qu'il existait des inhibiteurs endogènes des IAPs, comme les protéines mitochondriales Smac. La stratégie thérapeutique est basée sur le développement de Smac mimétique, de XIAP-BIR2 inhibiteurs, des sondes anti-messagers oligonucléotidiques anti-XIAP et anti-survivine. Les effets de ces agents induisent une auto-ubiquitination des IAP et une activation de la voie NF- κ B. L'activation de la voie NF- κ B va induire une production du TNF (Wu, Tschopp et Lin 2007). Certaines de ces molécules sont en cours de développement clinique (Fulda 2009b).

IV- Application au cancer du sein

A- Introduction

La classification moléculaire de Perou et al. (2000) actualisée par Lim et al. (2009), des tumeurs mammaires a permis de rationaliser, de systématiser et de rendre efficace l'usage des thérapies ciblées contre certains sous-types moléculaires. Cette classification a permis de définir 5 sous classes moléculaires.

Les tumeurs dites *claudin-low*, *basal like normal like*, *luminal A*, *luminal B* et *HER2*. Les tumeurs luminal A et B regroupent schématiquement les tumeurs du sein présentant un phénotype ER (voie oncogénique dominante).

Les travaux récents, rapportés par Gatza et al. (2010), définissent une classification transcriptomique basée sur la dysrégulation des voies oncogéniques.

Par cette approche, il identifie 17 sous-groupes de cancer du sein. La distinction entre les sous-groupes reflète le statut des voies de signalisation.

Seules les thérapies ciblées dirigées contre les sous-types moléculaires luminaux (les antiestrogènes : SERM, SERD, antiaromatases) et HER2 (trastuzumab, lapatinib) ont démontré leur efficacité.

Des données expérimentales et cliniques démontrent que pour les tumeurs du sein HER2 et luminal, amplification de HER2 et expression de ER, représentent des voies oncogénique addictive de ces tumeurs et par conséquent leur «talon d'Achille ».

Quels sont les signaux de survie qui sont mis en jeu dans les tumeurs du sein HER2 et luminal après « un choc oncogénique » ?

B-La voie oncogénique addictive HER2 :

1-Signaux induits par l'activation de la voie oncogénique HER2

1-1-Généralités :

Le gène HER2 est l'homologue humain du gène *neu* découvert chez le rat dans des modèles de carcinogenèse gliale (Shih et al. 1981).

Il a été démontré que ce gène possédait des homologies (Schechter et al. 1984; Schechter et al. 1985) avec l'oncogène viral *v-erbB* (*avian erythroblastosis virus*) et l'oncogène EGF-R (*epidermal growth factor receptor*).

Des données expérimentales obtenues à partir de lignées humaines de cancer du sein, ont permis de déterminer que HER2 était amplifié (King, Kraus et Aaronson 1985) et que ce gène codait pour une protéine transmembranaire de 185kDa.

Cette protéine, comme HER1, possède une activité tyrosine kinase (Akiyama et al. 1986). Par la suite deux autres membres de cette famille ont été décrits et caractérisés, HER3 et HER4 (Kraus et al. 1989; Plowman et al. 1993; Manning et al. 2002).

Les quatre membres de cette famille possèdent des caractéristiques communes (Mendelsohn et Baselga 2000), à savoir un domaine extra-membranaire, site de fixation du ligand (N-terminale), un domaine intra-cellulaire (site d'ancrage dans la membrane cytoplasmique), et un domaine intra-cellulaire riche en résidu tyrosine, possédant une activité Tyrosine Kinase (TK, C-terminale).

Le site extra-membranaire est constitué de quatre sous domaines. Les domaines I et III correspondant aux sites de fixation du ligand, le domaine II au domaine de dimérisation et le domaine IV au site d'activation.

Le mode de fonctionnement de ces récepteurs est complexe. Il peut être résumé de manière schématique de la manière suivante. A son état basal le récepteur est sous sa forme monomérique et sous une conformation inactive.

La fixation du ligand, sur les sites extra-membranaires, induit une modification de conformation du récepteur et son activation. Il va pouvoir se dimériser (homodimère ou hétérodimère) et induire une transphosphorylation des résidus tyrosines du domaine C-terminale Burgess et al. (2003).

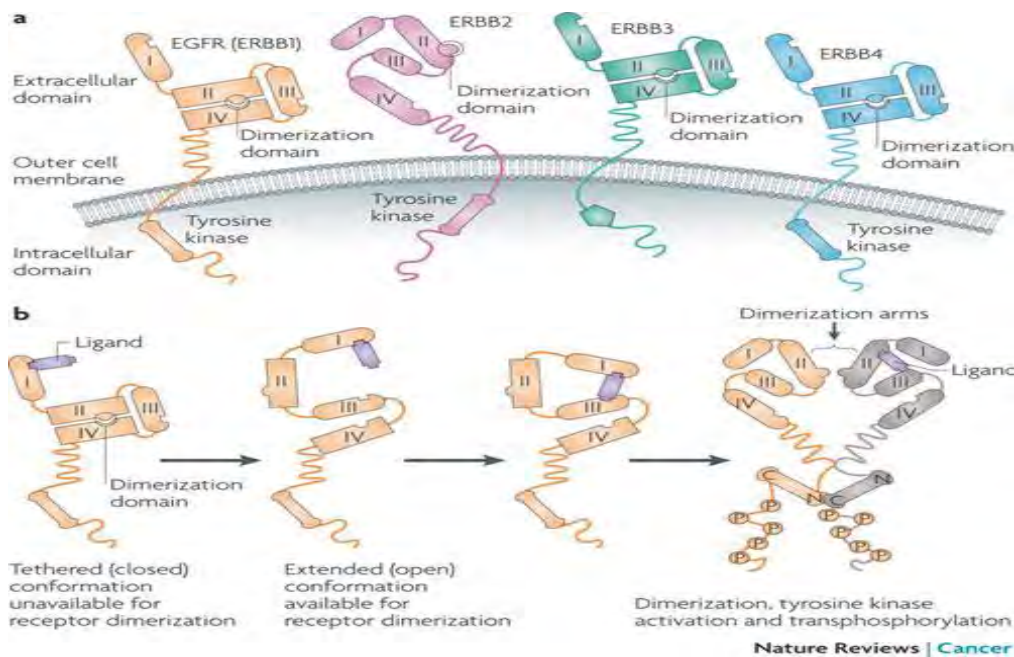


Figure 27-représentation des quatre membres de la famille HER selon leur conformation non active et active, d'après Baselga et Swain (2009).

Cette trans-activation va permettre à son tour l'activation de protéines adaptatrices nécessaire à la poursuite de la cascade de la transduction du signal (Prenzel et al. 2001).

Les signaux transduits sont des signaux de prolifération, de survie et d'invasion cellulaire via les voies Ras/Raf/MAKK-MEK/ERK, phospho-inositol/PI3-Kinase/Akt/mTor, phospholipase C et la voie STAT (PAK-JNKK-JNK).

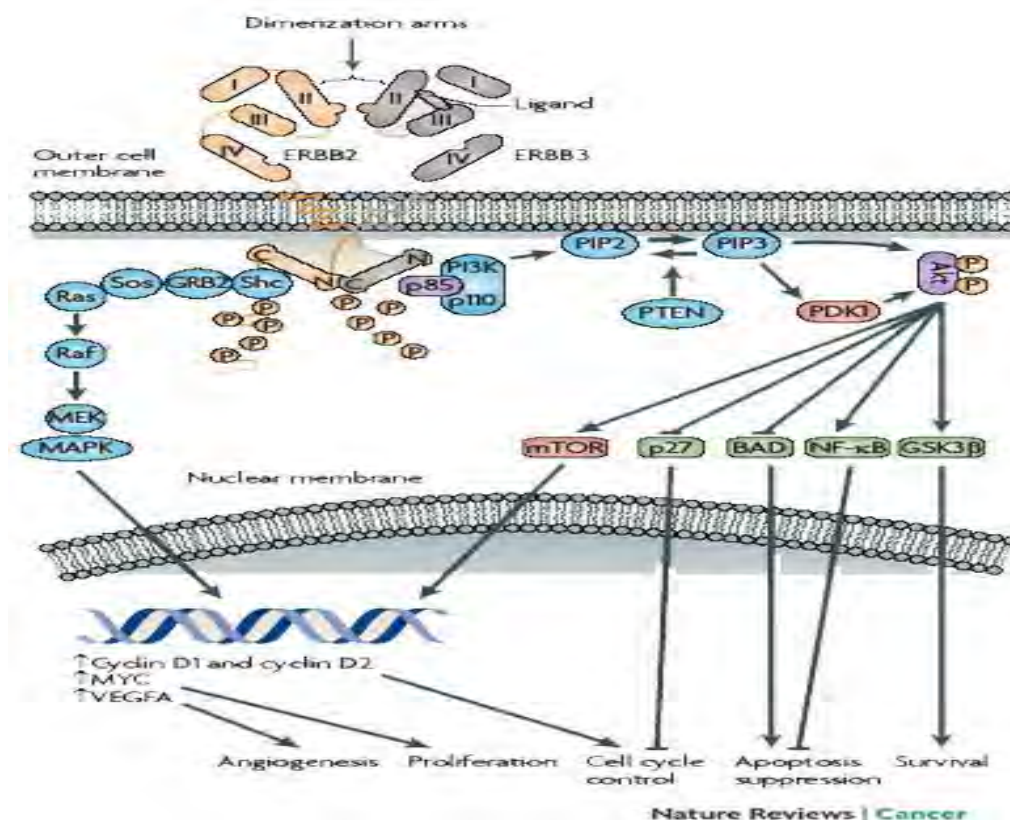


Figure 28- Représentation des voies de signalisation induites par l'activation de la voie oncogénique addictive HER2 d'après Baselga et Swain (2009).

La fonctionnalité de ces récepteurs dépendra de la constitution d'homodimères ou d'hétérodimères. Cette dimérisation est liée à l'environnement péri-tumoral et aux ligands (Slichenmyer et Fry 2001).

La protéine HER2 est spontanément sous une conformation active (Cho et al. 2003 ; Garrett et al. 2003), ce qui n'est pas le cas des autres membres de cette famille. Dans le cas de HER1, 3 et 4 le domaine II est masqué, associé au domaine IV, donc en position *off*, puis, après fixation du ligand (domaine I et III) le domaine II va être démasqué, donc actif en position *on*. HER2 est spontanément en position *on*. Il a perdu sa capacité à fixer les ligands et sa fonctionnalité dépendra de son partenaire de dimérisation (Sliwkowski 2003). HER3 ne possède pas d'activité catalytique TK, par perte de son domaine de fixation de l'ATP. La fonctionnalité de HER3 dépendra totalement de l'activité de son partenaire (Kim et al. 1998; Berger, Mendrola et Lemmon 2004).

HER3 est donc un partenaire obligé avec les autres membres de la famille HER et notamment HER2.

Il est à noter que HER3 possède la capacité d'activer directement la PI3 kinase via son site de fixation pour la sous unité p85. HER2 ne possède pas d'un tel site de fixation mais peut activer la voie PI3K indirectement après interaction avec des protéines adaptatrices comme GRB2 et GAB1.

1-2-HER2 impliqué dans la carcinogenèse mammaire

1-2-1- Les données expérimentales

L'implication de l'oncogène HER2 dans la carcinogenèse mammaire a été confirmée par de nombreux travaux, soit à partir de modèle de souris HER2 constitutivement activé ou son équivalent chez les rongeurs *neu* (Muller et al. 1988 ; Bouchard et al. 1989; Guy et al. 1992; Andrechek et al. 2000 ; Weinstein , Kitsberg et Leder 2000; Moody et al. 2002) ainsi qu' à partir de modèles de lignées cellulaires humaines ou de xénogreffe (Di Fiore et al. 1987; Hudziak , Schlessinger et Ullrich 1987 ; Chazin et al. 1992).

Il s'avère que la mise sous silence de HER2 dans des modèles humains surexprimant HER2 par sonde anti-messager ou par ARN interférant induit l'entrée en apoptose des cellules et la régression des tumeurs. Les mêmes constatations ont été faites en bloquant l'activité TK intracellulaire avec un anticorps monoclonal (Beerli, Wels et Hynes 1994).

L'amplification de HER2 n'est pas uniquement impliquée dans les étapes d'initiation ou de promotion de la carcinogenèse mammaire mais aussi dans la progression (Moody et al. 2002). Dans ce modèle de souris transgéniques, l'expression continue (au niveau des cellules épithéliales mammaires) inducible de *neu* par les tétracyclines (MMTV-rtTA/TetO-NeuNT) induit un cancer mammaire qui évolue secondairement au niveau pulmonaire.

La répression de l'expression de *neu* conduit à une régression de la tumeur primitive et des localisations secondaires pulmonaires (Weigelt et al. 2005).

1-2-2-Les données cliniques

La fréquence en pathologie humaine de l'amplification et/ou de la surexpression de HER2 a été reportée dans entre 18 et 25% des cancers du sein (Ross et al. 2003). Cette

grande variabilité est liée aux différentes techniques diagnostiques (IHC, Western Blot, FISH).

Une surexpression de HER2 a été aussi décrite dans les cancers de l'ovaire, de l'estomac et des glandes salivaires (Mimura et al. 2005; Morrison et al. 2006; Yano et al. 2006; Hirsch et al. 2002; Khan et al. 2002; Latif et al. 2003). Il a été constaté que l'amplification de HER2 était conservée tout au long des étapes de la carcinogenèse (Perou et al. 2000; Weigelt et al. 2005). Il est présent dans environ 50% des carcinomes *in situ*. Son statut est maintenu tout au long de la progression, envahissement ganglionnaire et localisation secondaire. Cette amplification est associée à un mauvais pronostic en clinique par rapport aux cancers du sein ER. Il a été aussi décrit des mutations ponctuelles au niveau du domaine TK, mais chez des patients présentant un cancer bronchopulmonaire et dans de rares cas chez des patients présentant un cancer colorectal, gastrique ou du sein (Stephens et al. 2004; Shigematsu et al. 2005; Lee et al. 2006).

De même il a été décrit un polymorphisme de la région transmembranaire de HER2 (Fleishman, Schlessinger et Ben-Tal 2002). L'implication de ces mutations et de ce polymorphisme reste débattue.

Par conséquent, seule l'amplification de HER2 est impliquée dans la carcinogenèse mammaire. Une fois cette voie oncogénique activée quelles en sont les conséquences pour la tumeur?

1-3-Signaux induits par l'activation de la voie oncogénique HER2

L'amplification de HER2 va conférer à la tumeur des avantages en terme de signaux de prolifération, d'invasion et de survie cellulaire.

1-3-1- Les signaux de prolifération

L'amplification des signaux de prolifération est médiée par la stabilisation et l'augmentation du nombre de dimères (HER2/HER2 ; HER2/HER3 ; HER1/HER1) présents.

Ils vont conférer une inhibition de la dégradation par le protéosome (inhibition de Cbl-E ligase) et permettre leur recyclage au niveau la membrane cytoplasmique. Anido et al.

(2006) démontre que le fragment C-terminale de HER2 peut être présent dans le cytosol.

Cette forme du récepteur est obtenue lors de l'initiation de la translation de la protéine et se comporterait comme un facteur de transcription. L'inhibition de l'activité tyrosine kinase de ce fragment induit un arrêt de la prolifération.

La résultante de ces mécanismes est une augmentation de la durée d'exposition de l'intensité du signal.

On constate aussi une dérégulation du cycle cellulaire par une augmentation de l'activité cycline D1/cdk4 et par inhibition de la protéine p27 (Timms et al. 2002; Loden et al. 2003; Ahnstrom et al. 2005; Yang et al. 2004). Cette inhibition peut être liée soit à sa translocation du noyau au cytoplasme, voie Akt dépendante (Liang et al. 2002 ; Shin et al. 2002; Viglietto G et al. 2002), soit à sa dégradation, voie MAPK dépendant (Yang et al. 2000; Donovan, Milic et Slingerland 2001; Lenferink et al. 2001).

1-3-2-Les signaux d'invasion

Nous avons vu plus haut que HER2 est impliqué dans les étapes de progression. Les signaux d'invasion sont liés essentiellement à l'activation de l'oncogène src. Il interagit directement avec HER2 via son domaine SH2. Src joue un rôle central dans les processus d'invasion en interagissant avec FAK, les intégrines et les protéines régulant le cytosquelette (Ottenhoff-Kalff et al. 1992).

Src exerce aussi un rétrocontrôle positif sur HER2 en amplifiant le signal par augmentation du nombre de dimères HER2-HER3 (Ishizawar, Miyake, et Parsons 2006). Les autres signaux d'invasion sont médiés par l'activation de la voie PI3K (Ignatoski et al. 2000), la PKC- α (Ignatoski et al. 2000; Benlimame et al. 2005), l'induction de l'expression du TGF α (Seton-Rogers et al. 2004), de l'intégrine β 4 (Gambaletta et al. 2000) et de la répression de l'expression de l'intégrine α 4 (Woods Ignatoski et al. 2003). L'invasion implique aussi une modification des propriétés d'adhésion et de la polarité cellulaire. HER2 va interagir avec un complexe protéique (*par polarity complex*) comprenant PAR6 et α -PKC (Aranda et al. 2006).

Les dimères HER1-HER2 vont promouvoir les phénotypes d'invasion en activant les voies PI3K, Ras et PLC γ (phospholipase C γ) (Zhan, Xiang et Muthuswamy 2006).

1-3-3- Les signaux de survie

La voie HER2 induit l'activité de la kinase PI3K/Akt qui exerce ces effets anti-apoptotiques en inhibant l'expression des protéines pro-apoptotiques Bim et Bad et en induisant une addiction non-oncogénique de survie cellulaire en régulant positivement Mcl-1 (Henson, Hu et Gibson 2006). La survivine est impliquée car son inhibition par le trastuzumab induit une perte de son expression et une entrée des cellules en apoptose.

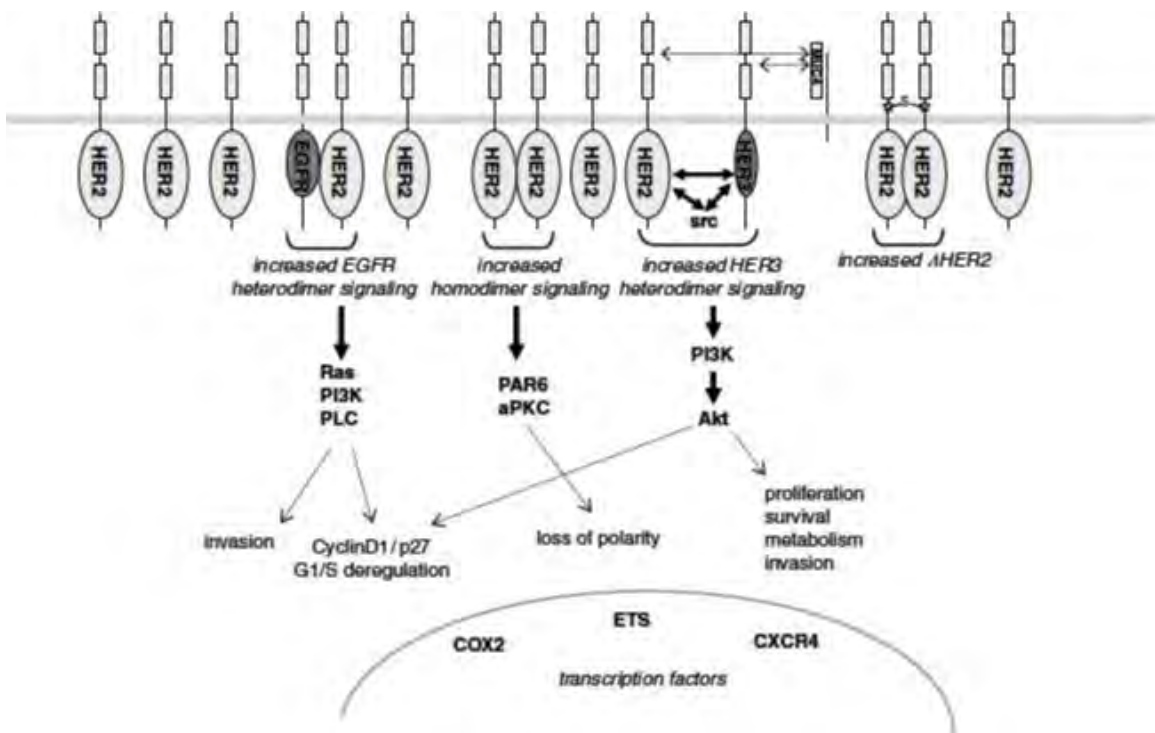


Figure 29- représentation schématique des conséquences induites par l'amplification de HER2 d'après Moasser (2007).

2- Signaux induits par l'inactivation de la voie oncogénique HER2

2-1- Mécanismes d'action du trastuzumab

Le trastuzumab est un anticorps monoclonal recombinant de type IgG1 humanisé dirigé contre le domaine extra-cellulaire de HER2.

Les modèles pré-cliniques démontrent que le trastuzumab possède des propriétés cytostatiques et qu'il interagit de façon additive ou synergique avec certains agents

cytotoxiques, notamment les sels de platines et les taxanes (Merlin, Barberi-Heyob, et Bachmann 2002; Pegram et al. 2004).

Les données expérimentales semblent démontrer que le trastuzumab inhiberait les signaux de prolifération, de survie cellulaire ainsi que d'invasion. Le trastuzumab n'inhibe pas la constitution d'hétérodimère (Cuello et al. 2001), mais l'homodimérisation de HER2 (Diermeier et al. 2005), favorisant ainsi l'internalisation du complexe anticorps-récepteur, puis sa dégradation par le protéosome par la voie Cbl-E3 ligase (Valabrega et al. 2005).

Il induit l'inhibition du clivage du domaine extra-membranaire (Molina et al. 2001) et un arrêt du cycle cellulaire par l'induction de la protéine p27^{KIP1} (Lane et al. 2000; Marches et Uhr 2004; Xiao-Feng Le, Pruefer et Bast 2005).

L'inhibition des signaux de survie cellulaire est liée à la perte d'expression de la survivine (Asanuma et al. 2005a) et de Mcl-1 (Henson, Hu et Gibson 2006).

L'inhibition de Src va permettre de diminuer les signaux d'invasion cellulaire. Le trastuzumab permet le recrutement des cellules NK, favorisant une réponse immunologique via la fonction ADCC (Carter et al. 1992 ; Clynes et al. 2000).

2-2-Les mécanismes de résistance au trastuzumab.

Il est actuellement décrit différents mécanismes de résistance. Ils peuvent être induits par l'interaction entre l'environnement péri-tumoral et le complexe trastuzumab-récepteur, par la constitution d'hétérodimères entre différents membres de la famille HER2 ou bien avec d'autres récepteurs (IGF-R, c-MET), ou bien par un défaut de transduction du signal.

2-2-1-Défaut d'internalisation du complexe trastuzumab-récepteur

Nous avons vu que l'amplification de HER2 induisait un défaut d'internalisation du récepteur. Le trastuzumab en se fixant sur HER2 va induire un complexe (complexe trastuzumab-récepteur) qui sera internalisé puis dégradé au niveau du protéasome.

Nagy et al. (2005) démontre que sur la lignée cellulaire JIMT-1, l'épitope qui permet au trastuzumab de reconnaître le domaine extra-membranaire de HER2 est masqué par

MUC4. L'inhibition de l'expression de ce protéoglycane (siARM) permet de rétablir la sensibilité au trastuzumab.

Il semble aussi que la co-expression de CD44 (lignée JIMT1) diminue l'action du trastuzumab par un défaut d'internalisation du récepteur et du trastuzumab.

L'inhibition de l'expression du CD44 (siARN) lève la résistance au trastuzumab (Pályi-Krekk et al. 2007).

Sous l'action de métalloprotéases, le domaine extra-membranaire peut être clivé. Il en résulte une forme tronquée du récepteur (p95/HER2) qui est active de manière constitutive (Di Fiore et al. 1987; Segatto et al. 1988).

Il a été démontré que le trastuzumab ne peut se fixer à cette protéine tronquée, mais semble être inhibé par le lapatinib (Xia et al. 2004).

Anido et al. (2006) démontre que le fragment C-terminal de HER2 peut être présent dans le cytosol. Cette forme du récepteur est obtenue lors de l'initiation de la translation de la protéine et se comporterait comme un facteur de transcription. L'inhibition de l'activité tyrosine kinase de ce fragment induit un arrêt de la prolifération.

2-2-2-Constitution d'hétérodimères entre les membres de la famille HER

Nous savons que HER2 est le seul membre de cette famille à être spontanément en position *on*. Il est donc le partenaire privilégié d'hétérodimérisation de HER1 et HER3. La constitution de ces hétérodimères dépend des ligands présents dans le stroma. Agus et al. (2002) démontre sur les cellules SKBR3 exposées à l'*hereguline* (HN) ne sont pas sensibles au trastuzumab, mais au pertuzumab (anticorps qui est capable d'inhiber la constitution de des hétérodimères). Il démontre que l'adjonction de HN a induit la constitution d'hétérodimère HER2/HER3 par rapport aux cellules parentales expliquant leur sensibilité au pertuzumab.

Valabrega et al. (2005) démontre qu'une expression autocrine du TGF γ sur des cellules de la lignée SKBR3 (transfecté par le gène codant pour le TGF, SKBR3/pANDcTGF) induit l'expression d'hétérodimères HER1/HER2, par rapport aux lignées parentales.

La constitution des ces hétérodimères va induire une inhibition de la dégradation complexe trastuzumab-récepteur par le protéosome (inhibition de Cbl-E ligase) et permettre son recyclage au niveau la membrane cytoplasmique.

Ritter et al. (2007) démontre des résultats similaires à partir d'une lignée BT474 résistante (BT474/R).

Elles surexpriment plus d' hétérodimères HER1/HER2 et de facteurs de croissance par rapport aux cellules parentales sensibles au trastuzumab. Les inhibiteurs tyrosine kinase HER1 sont capables d'inhiber la croissance tumorale des lignées BT474/R.

2-2-3-Interaction entre HER2 et autres récepteurs : IGF-R et c-Met.

Les premiers travaux démontrant une interconnexion entre HER2 et IGF-R ont été rapportés par (Lu et al. 2001) à partir des cellules SKBR3 transfectées par le gène codant pour le récepteur à IGF-R (SKBR3/cADN IGF-R).

Ces cellules en présence de l'IGF-1 prolifèrent même en présence du trastuzumab. L'adjonction dans le milieu de culture *l'IGF-binding protéine 3* rétablit la sensibilité au trastuzumab. Les travaux de Nahta et al. (2005) confirment ces premiers résultats. Il a réalisé ses travaux à partir d'une lignée SKBR 3 résistante au trastuzumab (SKBR3-R).

Il démontre que l'expression de l'IGF-R n'est pas présente sur les cellules SKBR3 parentales, mais uniquement sur la lignée SKBR3-R.

L'association d'un inhibiteur de l'IGF-R au trastuzumab a une action modeste sur la lignée parentale mais permet sur la lignée SKBR3-R de rétablir la sensibilité au trastuzumab.

Shattuck et al. (2008) démontre que les lignées SKBR3 et BT474 co-expriment HER2 et c-Met.

Le trastuzumab induit sur ces deux lignées une diminution de la prolifération qui est augmentée par l'inhibition de c-MET (siARN ou inhibiteur cMET).

2-2-4-Les seconds messagers

Ce mode de résistance au trastuzumab implique la phosphatase PTEN et les protéines du choc thermique, HSP 27 (Se Hun Kang et al. 2008; Zsebik et al. 2006).

Nagata et al. (2004) démontre que le trastuzumab induit l'activation de PTEN en inhibant la fonction de Src. Si l'expression de PTEN est absente, le trastuzumab est inefficace. La résistance est levée en inhibant l'activité de la PI3 kinase.

La grande majorité de ces mécanismes vont aboutir à la dysrégulation activatrice, de la voie mTor.

3- La voie mTor :

3-1-Structure et fonction

mTOR, pour *mammalian target of rapamycin*, a été identifiée initialement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme une cible thérapeutique à un antibiotique de la famille des macrolides, la rapamycine (Heitman, Movva et Hall 1991). mTOR est une sérine thréonine kinase qui appartient à la famille des *Phosphoinositide Kinase related Kinase* (PIKK).

Cette famille comprend entre autres, les kinases ATM, ATR, DNA-PK impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (Bosotti, Isacchi et Sonhammer 2000). Elle joue un rôle central dans la régulation des processus cellulaires critiques comme la croissance, la prolifération, l'organisation du cytosquelette, la transcription, la synthèse des protéines, la biogenèse des ribosomes et l'autophagie (Guertin et Sabatini 2007). Cette protéine est constituée de 2549 acides aminés et elle est constituée de différents domaines. Elle possède en position N-terminale, un domaine de 20 tandem HEAT (*Huntington, EF3*) qui est impliqué dans les interactions protéines-protéines (Andrade et Bork 1995). Le domaine catalytique, kinase, est localisé en position C-terminale.

Il possède une séquence similaire au domaine catalytique de la phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) (Bosotti, Isacchi et Sonhammer 2000). En amont du domaine catalytique il est décrit un domaine FRB, mais aussi des domaines FAT (FRAP, ATM, TRAP) communs aux kinases de la famille PIKK. Il est décrit un domaine FATC, en C-terminale, qui est indispensable à l'activité de mTOR (Peterson et al. 2000; Takahashi et al. 2000). Une délétion de cette région induit une perte de son activité.

Il est proposé que les domaines FAT et FACT interagissent pour induire un changement de configuration et permettre l'exposition du domaine catalytique.

Il est décrit un domaine de régulation dit domaine NRD situé entre le domaine catalytique et FATC (Sekulić et al. 2000).

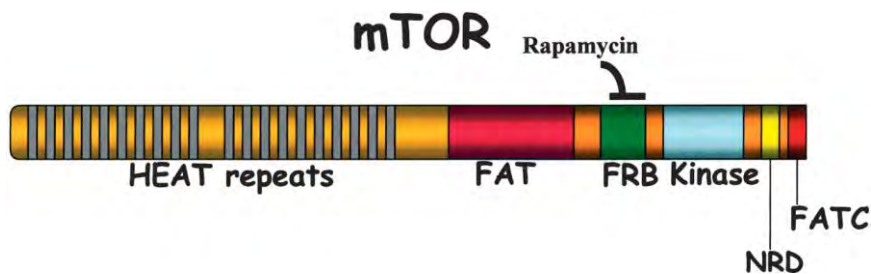


Figure 30- structure de mTOR d'après Hay et Sonenberg (2004).

La rapamycine se lie à la protéine FKBP12 constituant un complexe qui va inhiber l'activité catalytique de mTOR (Choi et al. 1996 ; Chen et al. 1995). Cependant toutes les fonctions induites par mTOR ne seront pas inhibées par la rapamycine. Les données expérimentales ont défini que les fonctions médiées par mTOR étaient liées à la constitution de deux complexes protéines-protéines distincts. Un complexe dit sensible à la rapamycine ou mTORC1 et un complexe mTORC2 dit non sensible à la rapamycine.

3-1-1- Le complexe mTORC1 ou le complexe RAPTOR-mTOR

Le complexe mTORC1 est constitué de la protéine mTOR, de la protéine RAPTOR (*regulatory associated proteine of mTOR*), de la protéine mLST8 (la sous unité β GTPase), de la protéine PRAS 40 (*prolin-rich AKT substrat 40kDa*) et la protéine DEPTOR (*disheveled, Egl-10, pleckstrin DEP domain containing mTOR interacting protein*) (Vander Haar et al. 2007; Hara et al. 2002; Do-Hyung Kim et al. 2002; Loewith et al. 2002; Sancak et al. 2007; Peterson et al. 2009). RAPTOR a une fonction activatrice et de recrutement des substrats de mTOR (Hara et al. 2002 ; Do-Hyung Kim et al. 2002; Schalm et al. 2003). PRAS à l'opposé a une fonction régulatrice négative de la fonction de mTOR (Vander Haar et al. 2007; Sancak et al. 2007). Le rôle de mLST88 demeure controversé.

DEPTOR interagit avec mTOR et sa surexpression dans des lignées de myélôme permet l'activation de la voie PI3K/AKT et induit la survie cellulaire (Peterson et al. 2009).

mTORC1 va induire la phosphorylation de différents substrats qui pour la plupart sont impliqués dans le processus de traduction des ARNm et tout particulièrement dans le recrutement des ribosomes (Martin, Soulard et Hall 2004).

La croissance et la prolifération cellulaire mTORC1 dépendante, sont liées à une augmentation de la phase d'initiation de la traduction cap-dépendante (Gingras, Raught et Sonenberg 1999).

Cette phase d'initiation est sous la dépendance de facteurs d'initiation d'élongation, notamment eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4 E*), mais aussi de la protéine S6 kinase. Le facteur eIF4E va de fixer sur la région 5' cap-end de ARNm en constituant un complexe avec les protéines eIF4GI et eIF4GII et ARN hélicase eIF4A (Gingras, Raught et Sonenberg 1999; Raught et al. 2000). Puis un certain nombre de facteurs notamment eIF4F, eIF4B vont permettre le recrutement de la sous unité 40s du ribosome au niveau du complexe initiale. Le complexe eIF4E et eIF4G est régulé négativement par une famille de protéines des répresseurs dites 4E-BP (*eIF4E binding proteins*). Cette famille comprend trois membres, 4E-BP1, 4E-BP2 et 4E -BP3 (Lin et al. 1994; Pause et al. 1994; Poulin et al. 1998; Bernal et Kimbrell 2000; Miron et al. 2001). Elles entrent en compétition avec le facteur eIF4G pour la liaison avec eIF4E (Haghighat et al. 1995; Mader et al. 1995; Marcotrigiano et al. 1999).

Lors de l'activation de mTORC1, la phosphorylation de la protéine 4E-BP va induire la libération de eIF4E et permettre sa liaison avec eIF4G pour initier la traduction. mTor peut aussi induire directement une phosphorylation de cette dernière (Brunn et al. 1997; Burnett et al. 1998; Gingras, Raught et Sonenberg 2001).

La protéine S6 kinase (S6K1 et S6K2) régule aussi la traduction des ARNm (Shima et al. 1998). Il est généralement admis que S6K1 augmente la translation des ARNms en 5' TOP (*terminal oligopyrimidin tract*) (Radimerski et al. 2002; Montagne et al. 1999 ; Jefferies et al. 1997).

Ces ARNms codent pour des protéines impliquées exclusivement dans la machinerie traductionnelle comme les protéines ribosomiales, facteurs d'élongation et la *protéine poly (A) binding protein* (PABP).

Les substrats phosphorylés par la protéine S6K, sont la protéine ribosomiale S6 mais aussi le facteur d'élongation eIF4B (Raught et al. 2004).

Il semble mTORC1 induit la traduction de protéines indirectement, par l'activation de TIF-1A (Mayer et al. 2004 ; Hannan et al. 2003).

TIF-1A va induire la biogenèse et la transcription ribosomiale. mTOR, en favorisant la phosphorylation de la phosphatase de type 2 ou de la phosphatase TAP42, va induire une inhibition de 4 E-BP et une activation de S6Kinase (Jacinto et Hall 2003).

Nous l'avons vu plus haut, les fonctions de mTORC1 sont diverses. mTORC1 peut inhiber un processus de mort cellulaire qu'est l'autophagie.

mTORC1 va induire une répression de l'autophagie en induisant la phosphorylation de protéines impliquées dans ce processus comme la protéine *UNC-51-like-kinase* ou ULK1 (Ganley et al. 2009), et *autophagy-related gene13* ou ATG13 (Nao Hosokawa et al. 2009; Chang Hwa Jung et al. 2009).

Elle favorise aussi l'inhibition de la mort cellulaire par apoptose en favorisant la transcription de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Mills et al. 2008). Un ensemble de données laisse suggérer que mTORC1 serait aussi impliqué dans la régulation de la synthèse des lipides, le métabolisme mitochondriale et la biogenèse. Les substrats cibles de mTORC1 dépendant dans la synthèse lipidiques seraient des facteurs de transcription « lipogénique » comme les facteurs SREBP1 ou *sterol element regulator binding protein 1* (Porstmann et al. 2008), PPAR γ ou *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (Kim et Chen 2004) et *phosphatase acide phosphatidique* et *lipin-1* (Huffman, Mothe-Satney et Lawrence 2002). mTORC1 induit la biogenèse mitochondriale et le métabolisme oxydatif possiblement en modulant l'interaction entre le PPAR γ -coactivator et le facteur de transcription *yin-yang* (Schieke et al. 2006; Cunningham et al. 2007). mTORC1 pourrait agir aussi sur le cytosquelette en induisant la phosphorylation de la protéine *CLIP-1/Restin* qui est une protéine associée aux microtubules (Choi et al. 2002). mTORC1 pourrait aussi avoir un rôle dans la régulation de l'hypoxie et l'inflammation via HIF-1 α (Land et Tee 2007) et STAT3 (Yokogami et al. 2000).

3-1-2-Le complexe mTORC2 ou le complexe RIPTOR-mTOR

mTORC2 comme mTORC1 est constitué de la protéine mLST8, de la protéine RICTOR (*rapamycin insensitive companion of mTOR*), de la protéine mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein*) et de la protéine PROTOR (*protein observed with RICTOR*) (Frias et al. 2006; Jacinto et al. 2004; Jacinto et al. 2006; Sarbassov et al. 2004; Qian Yang et al. 2006).

Les données expérimentales semblent démontrer que mTORC2 est impliqué dans l'activation de l'AKT en induisant la phosphorylation de la sérine 473 située sur le domaine hydrophobe C-terminale (Alessi et al. 1996).

Une perte de fonction de RICTOR ou de mSIM1 est suffisante pour induire une diminution de la phosphorylation de AKT (Hresko et Mueckler 2005; Lee et al. 2005; Sarbassov et al. 2005).

Le complexe mTORC2 induit la phosphorylation d'autres membres de la famille des kinases AGC, dont SGK1 et PKC, impliquées comme AKT dans la survie et l'organisation du cytosquelette (Alessi, Pearce et García-Martínez 2009; García-Martínez et Alessi 2008).

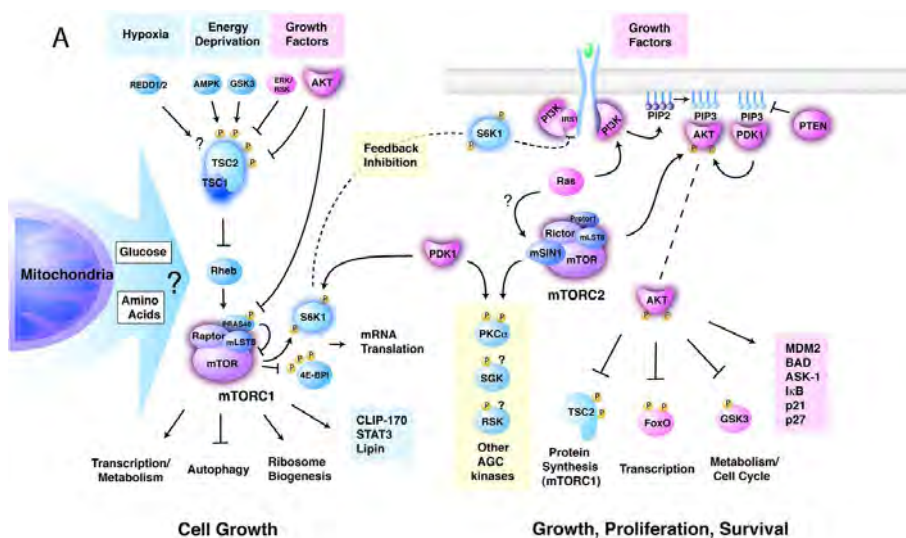


Figure 31- voie de signalisation activant et médiée par les voies mTORC1 et mTORC2 d'après Guertin et. Sabatini (2007).

3-2-Mode de régulation

Le mode de régulation de la voie mTOR est essentiellement post-traductionnelle par des mécanismes de phosphorylation. De nombreuses voies peuvent induire un signal mTORC1 dépendant, comme les voies médiées par les facteurs de croissance (IGF/IGFR ; HER), les facteurs nutritionnels (acides aminés) et énergétiques (ATP) (Dowling et al. 2010; Efeyan et Sabatini 2010). Alors qu'il a été identifié des molécules régulatrices, de nombreuses questions demeurent, notamment sur les mécanismes de régulation moléculaire.

3-2-1-Les voies des facteurs de croissance :

Il semblerait que le gène suppresseur de tumeur TSC impliqué dans la sclérose tubéreuse de Bourneville constitue un élément clef de cette régulation (Kandt et al. 1992).

La sclérose de Bourneville est une maladie autosomique dominante qui associe des lésions du système nerveux central (crise d'épilepsie, retard mental, lésions rétiniennes) ainsi que des tumeurs de type hamartomes (peau, cœur, rein) et, est souvent associée à des angiomyolipomes du rein et lymphangio-leiomyomatoses pulmonaires (Crino, Nathanson et Henske 2006).

En réalité il s'agit de deux gènes le gène TSC1 qui code pour l'hamartine et le gène TSC2 qui code pour la tubérine (Jingxiang Huang et Manning 2008).

Le produit de ces deux gènes va constituer un complexe protéique TSC1-TSC2. Le rôle de TSC1 serait de stabiliser le complexe alors que TSC2 possède une activité régulatrice négative indirecte, via son domaine GAP (*GTPase activating domain*) sur mTORC1 (Crino, Nathanson et Henske 2006). Cette fonction régulatrice va s'exercer par l'intermédiaire de la protéine Rheb (Parthive Patel et al. 2003; Stocker et al. 2003).

Cette protéine appartient à la famille de la superfamille Ras. C'est sous sa forme GTP qu'elle va pouvoir activer le complexe mTORC1.

TSC2, en se liant à Rheb par son domaine GAP, va induire la conversion, par stimulation de son activité GTPase, de sa forme Rheb-GTP active à sa forme Rheb-GDP inactive (Yong Zhang et al. 2003; Inoki et al. 2003; Tee et al. 2003). Cependant le mécanisme qui explique l'activation de mTORC1 par Rheb-GTP est très mal défini.

La transduction des signaux de prolifération médiée par la voie IGF/IGF-R et HER va inhiber la fonction régulatrice de TSC2 et par conséquent activer mTORC1. La voie IGF/IGFR -IRS-1 (*Insulin receptor substrate 1*) va induire l'activation de la voie PI3K et activer mTORC1. La PI3K conduit à la production du *phosphatidylinositol-(3,4, 5)-P3* au niveau de la membrane cytoplasmique permettant l'activation et le recrutement d'un certain nombre d'effecteurs. Il s'agit d'une famille enzymatique (classe I, II, II) constituée d'une sous unité catalytique (p110) et une sous unité régulatrice (p85). L'inactivation de la PI3K induit une inhibition de S6K1 et 4E-BP.

Cette activation est régulée négativement par le gène suppresseur de tumeur PTEN (*Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on chromosome Ten*) qui code pour une phosphatase. Inversement une surexpression ou une mutation de la sous unité catalytique induit une phosphorylation de la voie mTORC1 en absence de facteur de croissance.

Les mêmes observations sont décrites en cas de perte de PTEN. Alors qu'une mutation de la sous unité régulatrice abolit cette activation.

Le principal effecteur de la PI3K est la kinase Akt (Franke 2008; Yuan et Cantley 2008). Il s'agit d'une sérine/Thréonine kinase qui appartient à la famille des kinases AGC. Elle existe sous trois isoformes Akt-1, 2, 3 codées par 3 gènes différents.

Elles possèdent une structure commune, à savoir en position N-terminal un domaine PH (*pleckstrin-homology*) nécessaire aux interactions protéine-protéine ou protéine-lipide, un domaine kinase en position centrale, et en position C-terminale un domaine nécessaire à l'induction et au maintien de son activité kinase.

L'activation complète de AKT est liée à plusieurs modifications post-traductionnelles de type phosphorylation. Les seconds messagers engendrés par la PI3K vont se fixer au domaine PH de Akt entraînant une délocalisation de l'enzyme du cytoplasme à la face interne de la membrane cellulaire.

La fixation du complexe kinase PDK1/PRK2 (*3 phospho inositol dependent protein kinase*) engendre une modification de conformation de l'Akt et par la suite une phosphorylation (thréonine 308) par la PDK1 seule. Mais elle va être aussi phosphorylée par le complexe mTORC2 sur la sérine 473 (Sarbasov et al. 2005; Alessi et al. 1996). Des données expérimentales démontrent qu'en absence de facteur de croissance une surexpression de Akt induit une phosphorylation de 4E-BP.

Un des modèles qui pourrait expliquer l'activation de mTORC1 par Akt serait lié à une phosphorylation à la fois sur TSC2 (Ser 939, Thr 1462) et PRAS40. La résultante étant l'activation de mTORC1 (Guertin et Sabatini 2007).

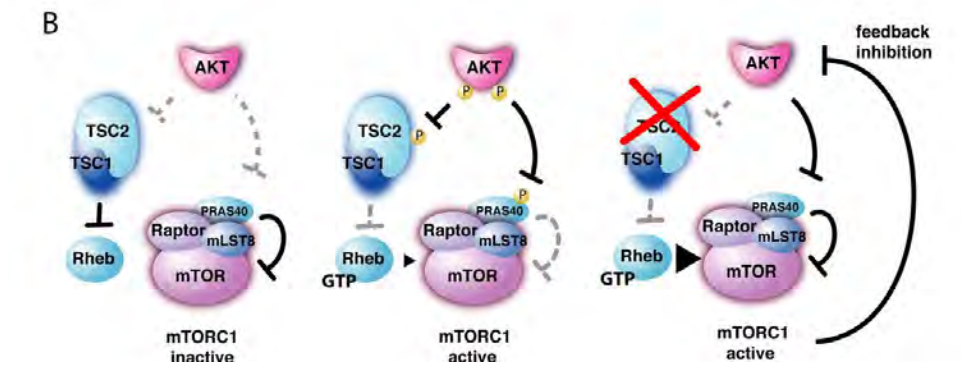


Figure 32- modèle qui pourrait expliquer l'activation de mTORC1 par AKT selon Guertin et Sabatini (2007).

La voie de transduction médiée par HER/RAS/RAF/MAPK/ERK peut elle aussi réguler et activer la voie mTORC1 notamment par la kinase RSK qui est un substrat de ERK. Il a été démontré que RSK (*p90RSK* ou *MAPKAP kinase-Kinase-1*) pouvait réguler négativement TSC2 en induisant sa phosphorylation sur la sérine 1798 (Roux et al. 2004; Tee et al. 2003). D'autres travaux ont démontré que ERK pouvaient directement dissocier le complexe TSC1-TSC2 (Li Ma et al. 2005).

3-2-2-La voie LKB1-AMPK

L'activité de mTORC1 peut être régulée par des signaux mitogènes, mais elle est aussi dépendante du statut nutritionnel (acides aminés, glucose) et énergétique (ATP, oxygène) de la cellule. Dans des conditions de déplétion énergétique mTORC1 est inhibé.

Cette inhibition est médiée par l'*AMP-activated protein kinase* ou AMPK (Chiharu Tokunaga, Ken-ichi Yoshino et Kazuyoshi Yonezawa 2004).

AMPK est activée en amont par deux kinases qui sont la kinase LKB1 (Hawley et al. 2003; Shaw et al. 2004; Woods et al. 2003) et la kinase CaMKK β (Hawley et al. 2005; Hurley et al. 2005; Woods et al. 2005). La kinase LKB1 est un gène suppresseur de tumeur, qui lorsqu'elle est mutée, est responsable du syndrome de Peutz-Jeghers (Hemminki et al. 1998). En réponse à une diminution de l'ATP intracellulaire (hypoglycémie, hypoxie), les kinases LKB1 et CaMKK β vont phosphoryler (T172) le complexe AMP-AMPK. AMPK activée va phosphoryler le complexe TSC1-TSC2 (activateur) et inhiber de manière PI3K-Akt indépendant mTORC1 (Inoki, Tianqing Zhu et Kun-Liang Guan 2003; Kimura et al. 2003).

En réponse à l'hypoxie, la voie mTORC1 est aussi inhibée de manière REDD dépendante (Brugarolas et al. 2004). De manière indirecte, l'hypoxie induira, via une déplétion énergétique, une activation de l'AMPK. L'inhibition induite par REDD est médiée par le complexe TSC1-TSC2 (Sofer et al. 2005 ; Corradetti, Inoki et Guan 2005; DeYoung et al. 2008). Le complexe REDD/TSC1-TSC2 va favoriser la liaison mTORC1 et la protéine 14-3-3 (Brugarolas et al. 2004).

3-2-3-La boucle de rétrocontrôle négative

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe des voies d'activation et d'inhibition de la voie mTORC1 en amont du complexe, mais il est décrit aussi une boucle de rétro-contrôle négatif dont la finalité est d'inhiber la voie PI3K/Akt. Il a été observé que les patients présentant une mutation de TSC ne développent pas de tumeur maligne en l'absence d'une inactivation de PTEN.

Une perte de la fonction de TSC1-TSC2 induit une diminution de la phosphorylation de Akt. Cette boucle de rétro-contrôle négatif semble induite par la forme activée de S6K1.

Il est démontré que S6K1 en induisant la phosphorylation de IRS-1 va aboutir à sa dégradation et *in fine* à une diminution de l'activation du couple PI3K/Akt (Harrington et al. 2004; Hartley et Cooper 2002; Haruta et al. 2000; Takano et al. 2001). De même manière, S6K1 peut inhiber le récepteur du PDGF induisant comme précédemment une inactivation de la PI3K (Zhang et al. 2007). S6K1 peut induire aussi un contrôle sur mTORC2 en phosphorylant RICTOR (Treins et al. 2010).

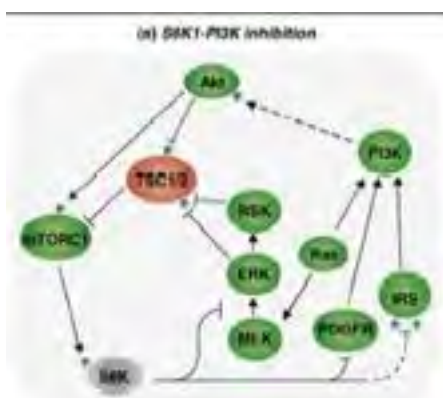


Figure 33- mTOR régulant la voie PI3K/AKT selon Efeyan et Sabatini (2010).

Il a été décrit par le groupe de Pandolfi que S6K1 pouvait inhiber l'activité de la voie de transduction ERK dépendante (Carracedo et al. 2008). Il démontre que l'inhibition de mTORC1 par l'evorilimus (RAD001) induit une expression de ERK et que l'adjonction d'un inhibiteur de ERK permet de lever cette résistance.

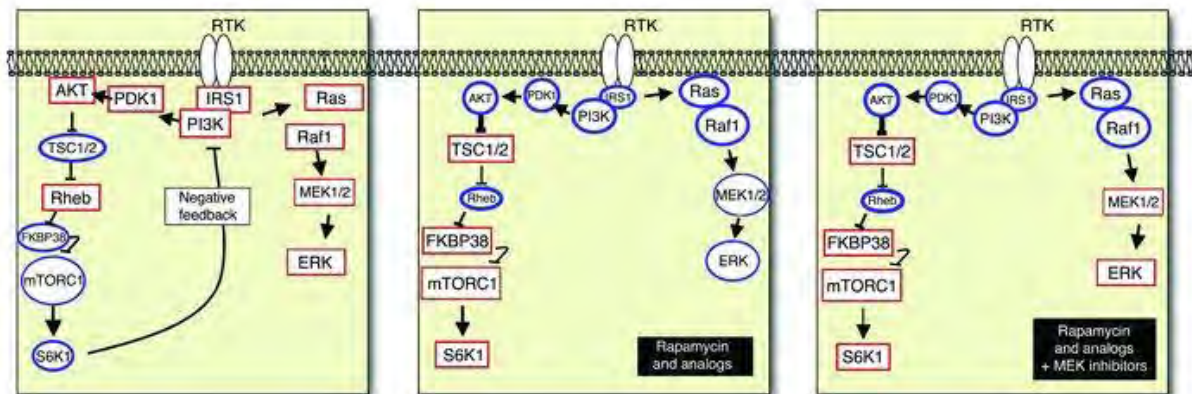


Figure 34- d'après Carracedo et al. (2008) mise en évidence du rétrocontrôle négatif de mTOR sur AKT.

Le facteur de transcription p53 qui est activé lors de stress cellulaire, de dommage à l'ADN ou d'activation d'oncogène, peut réguler mTORC1 par activation de la transcription de TSC2 et AMPK (Feng et al. 2007).

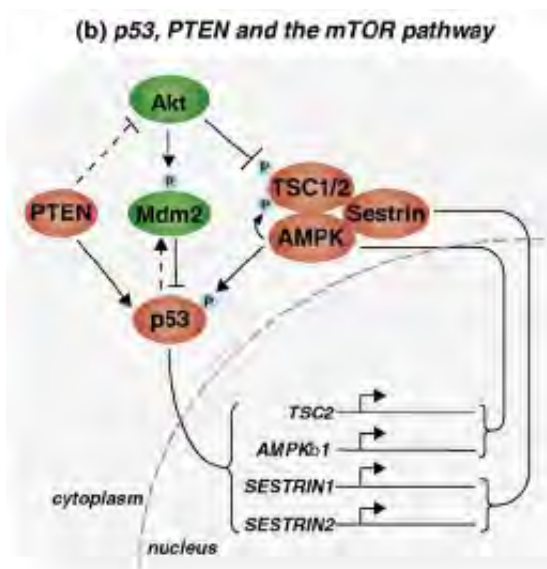


Figure 35- p53 et PTEN régulant la voie mTOR selon Efeyan et Sabatini (2010).

Nous avons vu que le complexe mTORC1 est constitué de plusieurs protéines dont la protéine PRAS40 et DEPTOR. PRAS40 inhibe intrinsèquement la fonction de mTOR (Guertin et Sabatini 2007).

La phosphorylation de PRAS40 par Akt va lever cette inhibition. Par conséquent toute diminution de l'activation d'Akt va renforcer la fonction de PRAS40.

Le groupe de Sabatini (Peterson et al. 2009) a décrit le rôle de DEPTOR dans la régulation de mTORC1 et mTORC 2. L'activation de mTORC1/2 inhibe l'expression de DEPTOR au niveau ARN et protéine. Dans des modèles cellulaires, *in vitro*, DEPTOR inhibe mTORC1/2.

Cette inhibition va activer indirectement Akt, levant le rétrocontrôle négatif sur PI3K induit par l'activation de S6K1. Il semblerait alors que DEPTOR ait une fonction double, à la fois anti et pro-oncogénique.

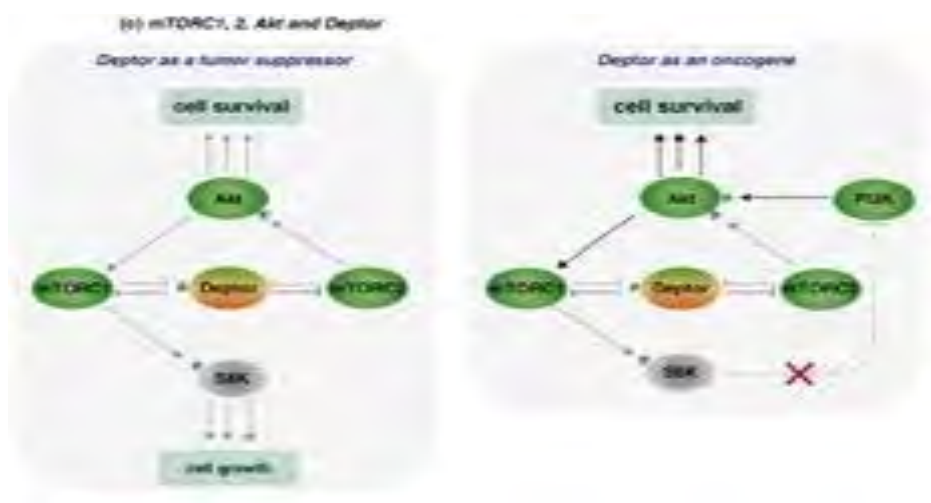


Figure 36- DEPTOR régulant la voie mTOR selon Efeyan et Sabatini (2010).

3-3-Implication de mTORC1 dans la carcinogénèse

mTORC1 est souvent dérégulé au cours de la carcinogénèse. La promotion de la carcinogénèse induite par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs qui ont une fonction de rétrocontrôle négatif de la fonction de mTORC1, en inhibant la voie PI3K/Akt dépendante, comme les gènes codant pour la p53, LKB1, PTEN, TSC1/2, vont renforcer l'addiction à cette voie de transduction.

L'activation des substrats mTORC1 dépendant sont pour certains lié à un facteur de mauvais pronostic dans un certains nombre de cancer. Il est rapporté dans le cancer du sein une surexpression de S6K1, une diminution de l'expression et/ou une hyperphosphorylation de 4E-BP et une hyperexpression ou hyperactivité du facteur d'élongation eIF4E (Zhou et al. 2004). Par ailleurs, Zhou et al. (2004) a établi une corrélation entre l'activation de mTOR à la surexpression de HER2.

Des niveaux élevés de phosphorylation de Akt, de mTOR et de 4EBP1 sont associés un mauvais pronostic et à l'expression de HER2.

La rapamycine, un inhibiteur de mTOR, diminue la prolifération d'un certain nombre de lignées cellulaires épithéliales mammaires, tout particulièrement les lignées HER2 positives.

La prédictivité de la réponse à la rapamycine est liée soit à une surexpression de S6K1, soit à l'expression de pAkt, mais pas au statut p4E-BP1, ni au rapport 4E-BP1/eIF4E (Noh et al. 2004).

Dans des lignées transfectées pour le gène ErbB2 (MCF-7), la rapamycine inhibe l'envahissement et la formation de colonies cellulaires. Chez les souris qui développent des tumeurs mammaires en réponse à la surexpression de ErbB2 rat (c-Neu), le RAD 001 (analogue de la rapamycine) inhibe la prolifération des cellules tumorales (Mosley et al. 2007), mais aussi les étapes de promotion et de progression de la carcinogenèse tumorale des tumeurs HER2 positives.

C -La voie oncogénique addictive ER :

L'implication des hormones ovariennes dans la carcinogenèse des cancers du sein a été démontrés il y a plus de 100 ans par Beatson. Il a constaté chez des patientes présentant un cancer du sein inopérable des régressions de la maladie après ovariectomie bilatérale. Depuis, des thérapies anti-estrogéniques ont été développées telles que les SERM (tamoxifène), SERD (fluvestrant) et anti-aromatase. La voie de signalisation transduite par ER et ses ligands (œstrogènes) est considérée comme un facteur clef dans l'étiologie et la progression tumorale des cancers du sein luminal.

Il existe deux types de récepteurs aux estrogènes, ER α et ER β , qui sont produits par des gènes distincts. Le rôle de ER β dans le cancer du sein est controversé (Speirs, Carder et Lansdown 2002). Néanmoins, des études indiquent que ER β peut avoir une fonction antagoniste de l'activité ER (Hall et McDonnell 1999), suggérant qu'un niveau faible d'expression de ER β serait associé à une moindre efficacité du tamoxifène (Hopp et al. 2004).

Quels sont les signaux médiés par l'activation et l'inactivation de la voie oncogénique ER ?

1- Signaux induits par l'activation de la voie oncogénique ER

Le mécanisme classique d'activation de la voie estrogénique (E) est médiée par les récepteurs estrogéniques. Le complexe ER/E qui agit comme facteur de transcription, va induire l'expression de gènes cible. Ces gènes cibles sont impliqués dans la prolifération, la différenciation, l'invasion et la survie cellulaire. Il est décrit deux voies d'activation.

Une voie classique dite transcriptionnelle ou génomique directe et une voie non classique membranaire ou génomique indirecte.

1-1-La voie transcriptionnelle génomique directe ou initiation nucléaire du signal stéroïdien (NISS) :

ER est une protéine nucléaire qui partage une organisation commune structurelle et fonctionnelle avec de nombreux autres récepteurs nucléaires (Osborne et al. 2001).

La structure de cette protéine est constituée de différents domaines : un domaine de liaison hormonal situé dans la région E, un premier domaine d'activation de transcription estrogène-inductible dénommé AF-2 et un deuxième domaine d'activation de la transcription dit AF-1 situé entre la région A/B . Cette activité transcriptionnelle, qui est ligand-dépendant (au niveau cytoplasmique interaction entre les estrogènes et son récepteur : complexe ER/E) induit l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la progression et la survie des tumeurs du sein luminal. Ce complexe transcriptionnel va induire par exemple l'expression du récepteur de l'IGF-I (IGFR), la cycline D1 régulateur du cycle cellulaire, le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Lee, Cui et Oesterreich 2001; Klinge et al. 2001; Rocio Sanchez et al. 2002), et les facteurs de croissance endothéliale pro-angiogéniques (Schiff et al. 2004; Klinge et al. 2001). Il peut aussi induire l'expression de différents facteurs de croissance comme TGF α et *amphiregulin* (Saeki et al. 1991), qui vont de se lier et activer HER1 (Salomon et al. 1995).

Des données pré-cliniques laissent supposer que le complexe transcriptionnel ER/E est également capable de réprimer l'expression de gènes impliqués dans l'inhibition de la prolifération et l'apoptose.

La liaison du ligand sur son récepteur ER va induire une modification de conformation de ce dernier. Ce changement de conformation va inhiber l'interaction entre ER et ses protéines chaperonnes inhibitrices.

Cette modification facilite en outre la liaison des protéines de corégulation (Shiau et al. 1998) qui modifient l'activité transcriptionnelle ER sur les éléments spécifiques de l'ADN consensus aussi connu sous le nom d'éléments de réponse aux œstrogènes (ERE), qui sont présents dans les régions promotrices des gènes cibles.

En particulier, l'activité transcriptionnelle de ER est renforcée par la fixation de co-activateurs tels que les membres de la famille des co-activateurs p160 récepteurs nucléaires [par exemple, co-activateur des récepteurs nucléaires 1 (NCoA1 ou SRC-1), NCoA2 (SRC-2), et NCoA3 (AIB1, SRC-3, TRAM1, RAC3, p / CIP ou CCRT) [(McKenna, Lanz et O'Malley 1999 ;Leo et Chen 2000)]. Ces protéines conduisent à la formation de complexes qui renforcent l'activité transcriptionnelle de ER en recrutant les histone-acétyltransférases qui vont moduler la structure de la chromatine au site promoteur (McKenna, Lanz et O'Malley 1999). Outre le mode d'action "classique"(régulation de l'expression des gènes qui abritent des éléments ERE dans leur région promotrice), ER peut également réguler la transcription de gène sur des sites promoteurs non ERE spécifiques, en interagissant avec d'autres facteurs de transcription (Kushner et al. 2000). On parle alors de voie « génomique non classique ». Par exemple ER peut interagir en constituant des complexes avec les facteurs de transcriptions tels que *protein specific-1* (SP-1) et les membres de la famille *Fos / Jun activating protein 1* (AP-1) [(Kushner et al. 2000; Ray et al. 1997; Safe 2001)].

Il est important de noter que les récepteurs à tyrosine kinase vont induire la phosphorylation de ER, mais aussi d'un certain nombre de kinases impliquées dans la signalisation induite par ER. La conséquence est l'amplification du signal de transcription induit par ER.

A titre d'exemple, la phosphorylation de ER sur la sérine 305, (Balasenthil et al. 2004; Rayala et al. 2006; Zwart et al. 2007) augmente la transcription de la cycline D1.

De même que la phosphorylation de ER sur les sérine 118 et 167, par les kinases dépendant de la signalisation de la p42/44 MAPK (ERK 1/2) et de la PI3K/ Akt augmente l'activité transcriptionnel de ER (Kato et al. 1995; Simak Ali et Coombes 2002; Campbell et al. 2001). Il est évident que le niveau de phosphorylation de ER par les kinases impliquées dans la transduction du signal a un rôle déterminant dans la régulation de l'activité génomique de ER.

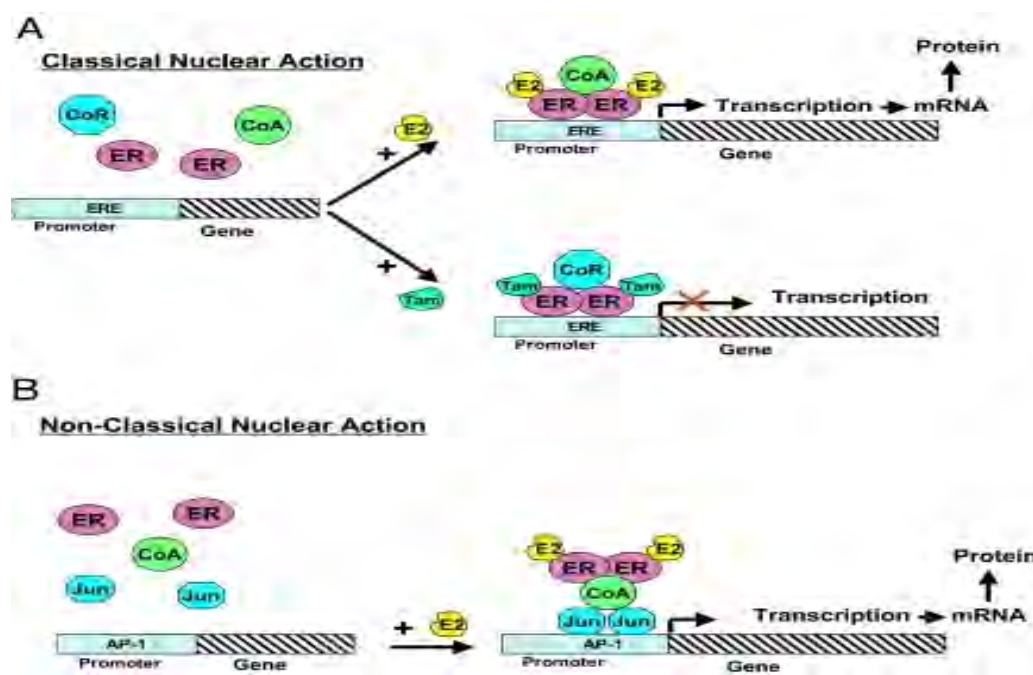


Figure 37- réponse génomique directe et indirecte selon Arpino et al. (2008).

1-2-La voie non génomique ou signalisation membranaire du signal stéroïdien : MISS:

Les estrogènes, ont démontré qu'ils pouvaient exercer des effets biologiques rapides en stimulant des voies de transduction du signal. Ce mode d'action rapide non génomique se déroule en dehors du noyau et il est indépendant de la fonction de transcription ER (Nemere, Pietras et Blackmore 2003). L'identité et le mode de fonctionnement des récepteurs responsables de cette réponse non génomique ne nous sont pas encore totalement connus.

Dans le cas de l'œstrogène, cependant, il a été démontré que cette activité est médiée, au moins en partie, par une forme particulière de ER (Wang et al. 2006; Figtree et al. 2003) qui est localisée à proximité ou au niveau de la membrane plasmique.

L'expression de cette forme particulière de ER peut être augmentée par des kinases impliquées dans la signalisation cytoplasmiques des récepteurs des facteurs de croissance comme la protéine « du gène associé métastase 1 » (Kumar et al. 2002) et le modulateur de l'action non génomique des récepteurs des oestrogènes (MNAR) (Chi-Wai Wong et al. 2002).

Des données moléculaires, suggèrent plusieurs mécanismes par lesquels cette forme non nucléaire de ER interagit avec d'autres éléments pour constituer un complexe (Levin et Pietras 2008). La forme cytoplasmique de ER existe sous la forme d'un pool qui va se lier à la face interne de la membrane cytoplasmique.

Elle se lie aux protéines membranaires des radeaux lipidiques tels que la *caveolin-1* (Razandi et al. 2002; Ali Pedram et al. 2007), *Flotillin-2* (Márquez et al. 2006), ou la protéine de liaison à la *caveoline striatin* (Qing Lu et al. 2004), ou éventuellement par association avec d'autres récepteurs de la membrane [par exemple, IGFR (Song et al. 2004), HER1 (Márquez et Pietras 2001; Márquez et al. 2001), ou HER2 (Márquez et al. 2006; Pietras et al. 1995)], ou avec des molécules de signalisation comme la protéine adaptatrice Shc (Song et al. 2004). Des données suggèrent que la protéine ER présente dans des vésicules isolées cavéolaires se propage généralement à travers la membrane cellulaire de manière similaire aux récepteurs des facteurs de croissance (Razandi et al. 2002; Razandi, Pedram et Levin 2000; Razandi et al. 2004; Pedram et al. 2002) et s'assemble dans le cadre d'un vaste complexe aux récepteurs à tyrosine kinase (EGFR, IGFR, récepteurs HER2), aux récepteurs non tyrosine kinases comme Src (Razandi, Pedram et Levin 2000), et aux protéines G (Razandi, , et al. 2004 ; Razandi et al. 1999 ; Pedram, Razandi et Levin 2006).

Ces interactions déclenchent en aval les voies de signalisation, y compris les effecteurs de p21Ras, conduisant à l'activation de Raf / MEK / MAPK et de la voie de modulation PI3K/ Akt/mTor (voir ce que nous avons décrit plus haut).

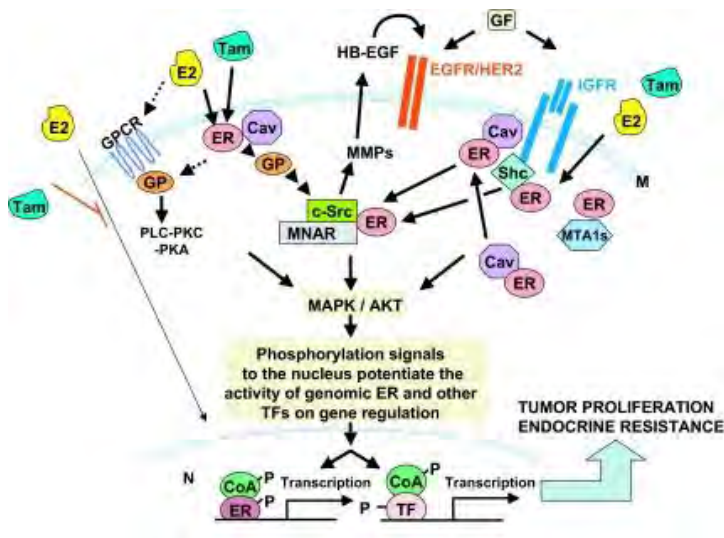


Figure 38- réponse génomique et non génomique selon Arpino et al. (2008).

2-Signaux induits par l'inactivation de la voie oncogénique ER

Comme nous venons de le voir la régulation de la voie génomique et non génomique est modulée par la transduction du signal médié par les facteurs de croissances. L'interaction entre ces deux voies est continue et bidirectionnelle. Cette interaction va participer aux mécanismes de résistance intrinsèques ou acquis aux thérapies endocriniennes.

Il a été démontré que ER peut être phosphorylé et activé par plusieurs kinases intracellulaires (Schiff et al. 2003 ; Johnston 2005) p42/44 MAPK, PI3K-Akt, P90RSK, *p21-activated kinase 1* ,Pak1, la protéine kinase A, ou p38 MAPK.

En particulier, ER est phosphorylé au niveau des résidus clés (y compris la sérine 106/107, 118, 167, 305, et la thréonine 311) localisés principalement dans le domaine AF-1. Ces kinases sont impliquées dans la transduction du signal médié par les cytokines, les facteurs de croissance y compris les ligands de l'EGFR ou IGFR (Balasenthil et al. 2004; Bunone et al. 1996; Rayala et al. 2006; Zwart et al. 2007; Kato et al. 1995; Campbell et al. 2001).

La phosphorylation de ER induit un changement de conformation de ER et son activation même en absence de son ligand (Weigel et Zhang 1998).

La phosphorylation des co-activateurs, va augmenter la réponse génomique ER même en l'absence de son ligand ou en présence d'anti-œstrogènes (Ray-Chang Wu et al. 2002).

Cette phosphorylation potentialise la capacité des œstrogènes et des SERM pour interagir et recruter d'autres co-régulateurs transcriptionnels au sein du complexe de transcription (Font de Mora et Brown 2000).

La phosphorylation de co-répresseurs, d'autre part, peut entraîner leur exportation hors du noyau, empêchant ainsi leur accès et l'inhibition des complexes ER transcriptionnelles dans le noyau (Hong et Privalsky 2000).

Le co-activateur ER AIB1 peut être phosphorylé et activé par MAPK et d'autres kinases cellulaires (Ray-Chang Wu et al. 2004).

Deux études récentes rétrospectives indépendantes montrent que les tumeurs avec des niveaux élevés de récepteurs à la fois AIB1 et HER (HER2 ou HER3) sont moins sensibles au tamoxifène, probablement en raison de l'activité agoniste du tamoxifène sur les ER (Osborne et al. 2003; Kirkegaard et al. 2007). Ces résultats soutiennent l'hypothèse que l'augmentation de la signalisation de la famille HER (amplification de HER2) favorise la phosphorylation de ER et AIB1. Il en découle une augmentation de la réponse génomique ER y compris en présence de tamoxifène.

Enfin, les fonctions de la membrane du réticulum endoplasmique semblent dépendre non seulement de ER, mais aussi des récepteurs de facteurs de croissance et de leurs ligands (Shou et al. 2004). Ce mode de signalisation ER pourrait donc être prédominant dans les cellules du cancer du sein qui expriment des niveaux élevés de récepteurs à tyrosine kinase EGFR , comme HER2.

Surtout, il a également été suggéré que les SERM, comme le tamoxifène, peuvent se comporter comme des agonistes des estrogènes sur membrane du réticulum endoplasmique (Schiff et al. 2004). La participation de la voie addictive HER2 dans la résistance *de novo* des cellules cancéreuses du sein au tamoxifène a longtemps été supposée (Benz et al. 1992).

Dans le modèle BT474, lignée de cancer du sein surexprimant HER2, il a été démontré que la résistance au tamoxifène était liée à la perte de ses propriétés apoptotiques (Yih-Lin Chung et al. 2002).

Plus récemment, en utilisant le modèle MCF7/HER2-18, qui est une lignée dérivée de cellules MCF7 qui surexprime HER2/ AIB1, Shou et al. (2004) a démontré que dans un environnement faible en estrogènes, le tamoxifène favorisait la croissance tumorale (action agoniste du tamoxifène).

Dans ces deux lignées exprimant la voie addictive oncogénique HER2 et ER, que se soit les estrogènes ou le tamoxifène, ils induisent une réponse non génomique dépendante qui va mettre en jeu la voie de transduction HER1/HER2 qui conduit à l'activation de p42/44 MAPK et de l'Akt. Ces kinases intracellulaires vont activer ER et le coactivateur AIB1. Fait intéressant, tous ces phénomènes sont inhibés par un traitement avec l'inhibiteur sélectif de la kinase HER1, le gefitinib, qui peut bloquer la signalisation des hétérodimères HER1/HER2, (Jiang Shou et al. 2004).

Les résultats mentionnés ci-dessus sont en accord avec les observations cliniques notées plus haut indiquant que les tumeurs HER2 qui coexpriment AIB1 sont résistantes au tamoxifène. Des données expérimentales établies par Nicholson et al. (2004) et le groupe Gee et al. (2003) démontrent que la voie de transduction HER1/HER2 est impliquée dans l'acquisition de résistance au tamoxifène sur des modèles de lignées de cancers du sein mises en culture à long terme. Au cours du temps, l'exposition aux tamoxifène de ces lignées induit une augmentation du niveau d'expression des hétérodimères HER1/HER2, ainsi que du niveau de phosphorylation de MAPK p42/44, Akt, et ER nucléaires sur les résidus sérine 118 et 167 (Jordan et al. 2004). Cette résistance est levée par le gefitinib ou le trastuzumab (Knowlden et al. 2003; Gee et al. 2003). Un autre récepteur à tyrosine kinase, l'IGFR, a également été associé à la résistance au tamoxifène. Il a été récemment rapporté que le traitement de l'IGF-II active à la fois IGFR et HER1/HER2 dans les cellules devenues résistantes au tamoxifène (Knowlden et al. 2005).

V-Problématique :

A-« Chocs oncogéniques » dans le cancer du sein HER2 et Luminal

Ces données illustrent bien le fait que la mise sous silence d'une voie additive oncogénique (récepteurs à tyrosine kinase), va induire des signaux agonistes et antagonistes de mort, de survie, d'arrêt et de prolifération cellulaire.

Les taux d'extinction de ces deux types de kinases sont différents sous inhibition de l'activité kinase de ces récepteurs, les kinases de survie s'éteignant plus rapidement que celles de mort.

Cette différence dans la durée des signaux qu'induisent les RTK est, en partie, à l'origine du choc oncogénique qu'ils induisent (Evan 2006a). Cet aspect concerne les cancers mammaires qui présentent une surexpression du récepteur HER2.

Cette surexpression favorise l'activation d'une voie de signalisation en aval des RTK, et est donc susceptible d'induire un choc oncogénique du type de celui qui est décrit plus haut. Diverses données confortent cette notion : la surexpression de HER2 rend les cellules tumorales mammaires particulièrement sensibles à l'induction de l'apoptose par des inhibiteurs anticorps trastuzumab et pertuzumab et au *knock down* de l'expression de HER2 (Moasser 2007).

La grande majorité des cancers du sein (65-70%) ne surexpriment pas HER2 mais expriment ER. Leur progression dépend des l'estrogènes, expliquant le succès de l'utilisation des SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulator*), dont le tamoxifène est le prototype, dans le traitement ciblé de ces cancers (Sengupta et Jordan 2008). Une partie de l'efficacité de ces SERMs est liée au fait qu'ils induisent l'apoptose dans les cellules tumorales ER-dépendantes (Thiantanawat, Long et Brodie 2003). Ici encore, ce déclenchement apoptotique peut être considéré comme lié au fait que la voie ER déclenche des signaux de survie et des signaux de mort intrinsèques. L'existence de tels signaux de mort est indiquée par les effets paradoxaux de l'estradiol sur certaines cellules résistantes aux SERMs.

La déplétion prolongée en estrogène de cellules exprimant ER y induit une adaptation cellulaire, qui les rend sensibles à l'induction de l'apoptose par l'estradiol. Cet effet dépend de ER (Jordan 2004).

B- Problématique Résultats acquis : Protéines anti-apoptotiques et voies oncogéniques dans les cancers du sein

Il apparaît que les voies HER2 et ER induisent chacune un « choc oncogénique » en ayant des effets ambivalents sur les voies de survie des cellules tumorales mammaires.

Quels sont les mécanismes incriminés ?

Nous aborderons cette question en étudiant le rôle des protéines de la famille de Bcl-2, dans l'impact qu'a chacune de ces deux voies oncogéniques sur l'équilibre entre signaux de mort et de survie des cellules épithéliales mammaires.

La plupart des cancers du sein humains ont pour origine des cellules épithéliales qui expriment Bcl-2, Bcl-xL ou Mcl-1 (Krajewski et al. 1994; Krajewski et al. 1995).

La voie mitochondriale de l'apoptose que ces protéines régulent joue, d'ailleurs, un rôle physiologique important au cours de la morphogenèse de l'épithélium mammaire (Mailleux, Overholtzer et Brugge 2008). De plus une augmentation de Bcl-xL dans les carcinomes mammaires est associée à un faible pronostic (Olopade et al. 1997). Il s'avère à l'inverse que l'expression de Bcl-2 est de bon pronostic (Lipponen et al. 1995), mais l'association de cette expression à celle de ER, elle-même étant un facteur prédictif indépendant de bon pronostic, semble être à l'origine de ce lien statistique. Si les mécanismes par lesquels les voies HER2 et ER affectent la survie cellulaire restent incompris, un certain nombre de données indiquent qu'ils font intervenir les protéines anti-apoptotiques susnommées. Notons que, de manière générale, il est reconnu que ces protéines constituent un frein à l'induction de l'apoptose par les lésions mitogéniques (Lowe, Cepero et Evan 2004). HER2 induit l'activité de la kinase Akt qui exerce divers effets anti-apoptotiques, régulant négativement l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim et l'activité de Bad, et régulant positivement la stabilité et l'expression de Mcl-1 (Henson, Hu et Gibson 2006).

Un rôle de XIAP dans la réponse des cellules HER2-amplifiées au trastuzumab et un effet de HER2 sur l'expression de la survivine, ont été rapportés (Foster et al. 2009; Asanuma et al. 2005b).

Nous avons de plus observé que, dans une lignée cellulaire (BT474) HER2-amplifiée, la déplétion en Mcl-1 est suffisante pour induire la mort d'une fraction, faible mais significative, de cellules. Cette dépendance à Mcl-1 est en partie due par l'activité de mTORC1, en aval de HER2 (Campone et al. 2009).

Cette observation nécessite d'être comprise en termes moléculaires, et généralisée, mais elle illustre la notion que certains modules de signalisation en aval de HER2 peuvent exercer une pression pro-apoptotique.

Dans le même ordre d'idées, la voie ER a un effet direct sur l'expression de Bcl-2, tandis que l'induction de l'apoptose par l'estradiol repose sur les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, Bim et Bax (Lewis et al. 2005; Seveno et al. 2009).

Ces observations soulèvent les questions suivantes :

La viabilité de cellules au sein desquelles la voie HER2 ou ER est constitutivement active dépend-elle d'une ou de plusieurs des protéines anti-apoptotiques décrites plus haut ?

Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués ?

Notons que nous suspectons que ces mécanismes, même si leurs bases moléculaires sont communes, soient spécifiques de chacune des voies étudiées. Ces voies ont, dans les cellules tumorales, un effet dominant en partie lié au fait qu'elles se répriment mutuellement.

La répression de ER par HER2 a été documentée. Cet aspect souligne l'importance d'étudier conjointement l'impact sur la viabilité cellulaire de ces deux voies.

Cette dépendance aux protéines à mutidomaines anti-apoptotiques a été abordée selon deux approches. Une première approche porte sur une lignée de cancer du sein HER2 amplifiée, les cellules BT474.

La deuxième approche porte sur du matériel biologique beaucoup plus représentatif de la tumeur mammaire que le travail sur lignée développé plus haut. Elle est fondée sur une méthode fonctionnelle *ex-vivo* à partir de prélèvements de cancers du sein de patientes non traitées (au bloc opératoire) et prises en charge dans notre Institution. Ce type de matériel donne un accès très limité aux cancers HER2 mais permet une étude assez complète des tumeurs lumineales.

Cette approche ne permet pas d'étudier la réponse aux ARN interférents, mais elle permet d'exposer ces prélèvements à différents agents thérapeutiques tels que le paclitaxel ou l'ABT-737. Nous avons étudié la dépendance des cancers du sein lumineales aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL en exposant ces prélèvements à la molécule ABT-737.

PRESENTATION DES RESULTATS EXPERIMENTAUX

Partie I : Manuscrit

Constitutive c-Myc dependent expression of proapoptotic Bim promotes HER2-overexpressing breast cancer cell dependence on antiapoptotic Mcl-1

Mario Campone^{1-2 *}, B  linda No  l^{1-2 *}, Morgan Grau¹, Yannis Guillemin¹, Fabien Gautier¹, Wilfried Gouraud³⁻⁴, Catherine Charbonnel³⁻⁴, Pascal J  z  quel⁴⁻⁵, Frédérique Braun¹, Sophie Barillé-Nion¹, Philippe Juin^{1  }

*1- Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers - UMR 892 – INSERM /
Université de Nantes, Institut de Recherche Thérapeutique de l’Université de Nantes 8
Quai Moncousu BP 7072144007 Nantes Cedex 1*

*2- Service d’Oncologie Médicale CLCC René Gauducheau, Bd J. Monod, 44805 Nantes
- Saint Herblain*

*3-Unité de Biostatistique et de Biologie Intégrée, CLCC René Gauducheau, Bd J.
Monod, 44805 Nantes - Saint Herblain*

*4-Unité Mixte de Génomique du Cancer, Hôpital Laënnec Bd J. Monod, 44805 Nantes -
Saint Herblain Cedex*

*5-Département de Biologie Oncologique CLCC René Gauducheau, Bd J. Monod, 44805
Nantes - Saint Herblain*

* These authors contributed equally to this work.

   Correspondence to: Dr. Philippe Juin
CRCNA - UMR 892 - INSERM / Universit   de Nantes
Institut de Recherche Thérapeutique de l’Universit   de Nantes
8 Quai Moncousu
BP 7072144007 Nantes Cedex 1
France
email Philippe.Juin@univ-nantes.fr
Phone 33-2-28-08-03-20 Fax 33-2-28-08-02-04

ABSTRACT

Background Breast cancer cells that overexpress HER2 are characterized by an excess of signaling downstream of this member of the human epidermal growth factor receptor (HER) family, which leads to dysregulated proliferation and survival. It is well established that anti-apoptotic signals induced by HER2 contribute to chemo- and radioresistance. Whether or not some of these signals are also involved in counteracting rampant death signals that are inherent to HER2-induced transformation, thereby maintaining cell survival and representing a critical impediment that needs to be harnessed therapeutically, is much less understood. As antiapoptotic and proapoptotic Bcl-2 family members act as integrators of many death/survival signals, including these induced by oncogenes, investigating their role in the survival of HER2-overexpressing breast cancer cells may prove useful to address this key issue. **Methods** We used the BT474 cell line as an in vitro model of HER2-overexpressing cells. We analyzed whether anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family members play a role in regulating the survival of these cells, using a RNA interference approach, and which pathways might lead to the expression of proteins critically involved. Expression of the latter actors was confirmed using lysates from HER2-overexpressing tumors and by analysis of publicly available RNA expression data. **Results** We show here that the sole depletion of antiapoptotic Mcl-1 is sufficient to induce apoptosis in BT474 cells, and that this Mcl-1 dependence is due to proapoptotic Bim expression in these cells. This expression directly results from oncogenic signaling, as depletion of the oncoprotein c-Myc decreases Bim levels and mitigates Mcl-1 dependence. Moreover, inhibition of mTORC1 activity downstream of HER2 leads to decreased c-Myc expression decreased Bim expression and loss of Mcl-1 dependence. Western blot analysis confirms that HER2-overexpressing tumors constitutively express detectable levels of Bim and Mcl-1, while expression data hint on enrichment for Mcl-1 transcripts in these tumors. **Conclusion** This work establishes that it is necessary, and maybe sufficient, to therapeutically impact on the Mcl-1/Bim balance in HER2-overexpressing tumors. While current targeted approaches need to influence this balance, strategies that directly act upon this balance without interfering with the rest of the HER2 network represent a promising alternative.

BACKGROUND

Breast cancer is a heterogeneous disease, composed of distinct entities with differing underlying pathogenic processes. One such entity is the so-called HER2 subtype, which is characterized by amplification and/or overexpression of this member of the human epidermal growth factor receptor (HER) family. High levels of HER2 expression have been documented in approximately 30% of human breast cancers [1] and they are associated with an overall poorer prognosis and decreased survival compared with patients with HER2-negative, ER-expressing tumors [2]. HER2 encodes a Mr 185,000 transmembrane glycoprotein receptor protein that has intrinsic tyrosine kinase activity [3]. In contrast to other members of the HER family, HER2 remains an orphan receptor, with no soluble ligand identified so far, but the receptor plays a pivotal role in the HER network, being the preferred and most potent heterodimerization partner for other HER members [4]. Activation of HER2 that results from the dynamic heterodimerization of HER receptors activates a large repertoire of transforming signaling molecules and pathways that are, to a great extent, shared by these HER members.

The biological consequence of HER2 amplification and overexpression is excess HER2 signaling, which leads to numerous oncogenic processes, such as angiogenesis, cell motility, cell growth and, as discussed in more details below, cell proliferation and survival [3]. Due to the strong imprint of HER2 signaling on the corresponding cancer subtype, current therapeutic strategies for its treatment aim at interfering with the HER2 network. The mechanistic understanding of how HER2, and its downstream signaling modules impact on cell proliferation and survival in particular, fuels these strategies.

The major signaling pathways activated by HER2 include the RAS-Raf1-Mek-Erk and the PI3K-Pdk1-Akt pathways. Akt signaling leads to mTOR activation via the disruption of the tuberous sclerosis complex [composed of TSC1 (Harmartin) and TSC2 (Tuberin)] that in turn no longer attenuates RHEB-GTPase activity. There are two structurally distinct mTOR signaling complexes in mammalian cells: the mTOR complex 1 (mTORC1) and mTORC2 [5]. One well-characterized function of mTORC1 is to maintain protein synthesis through phosphorylation of at least two direct targets, eukaryotic initiation factor (eIF) 4E-binding proteins (4E-BPs) and ribosomal protein S6 kinases (S6Ks) [6]. 4E-BPs bind to and prevent eIF4E from entering into eIF4F, a heterotrimeric complex required for the cap-dependent ribosome recruitment phase of translation initiation, while S6K also regulates translation initiation by controlling the ribosomal protein S6 and eIF4A, a DEAD box RNA helicase which is essential to eIF4F function.

Activation of the Ras-MAPK-Erk and PI3K-Akt-mTOR pathways both culminate in activation of transcriptional programs, as well as cyclin dependant kinases, leading to progression through the cell cycle. Current evidence indicate that, through either of these pathways, HER2 signaling can regulate cyclin D and c-Myc, a multifunctional transcription factor involved in cell cycle progression (see [7] and references therein). In particular, inhibition of PI3K-Akt is expected to decrease cyclin D and c-Myc post-transcriptionally by dephosphorylation of GSK3 [8] [9]. A PI3K-Akt downstream target, NFkB, was reported to induce transactivation of c-Myc [10]. mTORC1 activity might contribute to cell cycle progression in HER2 overexpressing cells, as cyclin D and c-Myc expression are critically dependent upon EIF4F activity in cells with high Akt activity [11] [12]. Consistent with this, inhibition of mTORC1 by RAD001 (everolimus) potentially inhibits cell cycle progression of HER2 overexpressing breast cancer cells [13].

In addition to their deregulated proliferation, HER2 overexpressing cells appear to exhibit altered survival signals. In support to this claim are the abundant data that describe cancer cells overexpressing HER2 as resistant to an array of cytotoxic agents and radiation damage [14] [15]. The view that has emerged from these observations is that HER overexpressing cells not only escape cell cycle control but also apoptosis. It has become increasingly clear that anti-apoptotic signals (detailed below) associated with alterations of the Ras-MAPK-Erk and PI3K-Akt-mTOR pathways contribute to chemo- and radioresistance. To the very least, targeting these survival signals may thus be of therapeutic benefit in combination with cytotoxic approaches.

Yet, certain observations lead to the hypothesis that a well-designed inhibition of certain survival signals could have a more radical effect, and directly promote tumor destruction. Indeed, some of the survival signals harbored by HER2 overexpressing cells might directly contribute to cancer progression by allowing cancer cells to survive to constitutive death signals. The existence of such signals is suggested, at least in part, by the fact that the kinase cascade triggered by the hyperactivity of receptors of the HER family can be “addictive” to cancer cells [16]. This apparent “addiction” refers to the fact that inhibition of the HER kinase cascade pathway is all the more efficient therapeutically as the targeted pathway is highly active in the treated tumors. This gain of effect appears to result from the fact that hyperactivity of HER pathways has tumor promoting (survival) effects, but also tumor suppressive (death) ones [17]. The combination of these antagonistic effects is synthetically viable.

It may nevertheless lead to tumor destruction when the inhibition of the apical pathway leads to an oncogenic shock, in which oncogene-induced survival signals are affected more efficiently (or quickly) than oncogene-induced death signals [16]. Death signals downstream of EGFR signaling have been reported, but not fully described in molecular details [18]. Moreover, it has remained unknown whether similar signals are initiated downstream of HER2, which shares many signaling modules in common with EGFR. Investigating whether constitutive death and compensatory survival signals exist in HER2 overexpressing cells is however of importance, as it may lead to the identification of a critical event in the HER2 network that needs to be altered by current targeted therapies, or that could be favorably targeted without altering the rest of the network.

An investigation of the roles played by the Bcl-2 family of proteins in the survival of HER2 overexpressing cells may prove very useful for the characterization of constitutive death signals these cells might harbor. Indeed, this family of interacting proteins represents an integrating node towards which converge numerous death and survival signals in mammalian cells, including these induced by numerous oncogenic signals [19]. Anti-apoptotic Bcl-2 homologs preserve mitochondrial integrity by opposing the activity of multi-domain pro-apoptotic Bcl-2 family members Bax and Bak, which display sequence conservation throughout three Bcl-2 homology (BH) domains (BH1-3), and that of their upstream effectors, the BH3-only proteins (e.g. Bim, Puma, Bad...). This occurs in great part via a physical interaction between the BH3 domain of the pro-apoptotic proteins and a BH3-binding pocket, which is formed at the surface of the anti-apoptotic proteins. This interaction allows Bcl-2 homologs to negatively control the activation, and the activity, of pro-apoptotic Bax and Bak, that are themselves essential actors of the apoptotic response of mammalian cells to multiple stimuli. Anti-apoptotic Bcl-2 homologs (e.g. Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) control the sensitivity to conventional pro-apoptotic therapy of tumor cells and, in certain instances, their expression is necessary to maintain the survival of such cells [20] [21]. This indicates that they may be required to counteract constitutive death signals.

There is substantial evidence that the balance between anti- and pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family is biased in favor of survival proteins during breast carcinogenesis. Most breast cancers arise from epithelial cells that express Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 [22] [23], and enhanced expressions of these proteins are almost systematically found in transformed mammary epithelial cells.

In as far as downstream modules of HER2 signaling are concerned, it is worth mentioning here that Akt has numerous anti-apoptotic effects on Bcl-2 family members, since it was shown to stabilize Mcl-1 protein levels [24], to negatively regulate the expression of Bim and Puma via its repression of the Foxo3a transcription factor and to negatively regulate the activity of Bad by direct phosphorylation.

In this study, we investigated whether the imbalance in favor of survival proteins of the Bcl-2 family, which is induced by the sustained activity of signaling pathways downstream of HER2, plays a major role in maintaining the survival of HER2 overexpressing cells. To investigate this, we used the BT474 cell line as an in vitro model of HER2 overexpressing cells and we analyzed, using a RNA interference approach, whether the expression of Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 is required for their survival. We herein demonstrate that BT474 cells undergo apoptosis upon depletion of Mcl-1, and that this Mcl-1 dependence is due to their constitutive expression of the pro-apoptotic protein Bim. The latter expression is a direct consequence of HER2 activity, as it is due to mTORC1 dependant expression of c-Myc. Our work therefore establishes that anti-apoptotic signals leading to Mcl-1 activation are necessary to maintain the survival of HER2 amplified cells. It implies that tipping the balance between Bim and Mcl-1 towards Bim activity is one major issue of therapeutic approaches used for the treatment of HER2 driven malignancies.

Methods

Reagents, antibodies and siRNAs.

The following primary antibodies were used for western blotting: anti-actin from Millipore (mouse, MAB1501R), anti- β -tubulin from Sigma (mouse, T0198), anti-Bcl-xL antibody from Transduction Lab. (rabbit, 610212); anti-Bcl-2 from Dako (mouse, M0887), anti-Mcl-1 from Santa Cruz (rabbit, B0410), anti-Puma from Calbiochem (rabbit, PC686); anti-Bim from Chemicon International (rabbit, 17003), anti-c-Myc from Cell Signalling (rabbit, 9402), anti-Foxo3A from Upstate (rabbit, 07-702), anti-Akt from Cell Signalling (rabbit, 9272), anti-phospho-AKT(Ser473) from Cell Signalling (rabbit, 9271), anti-phospho-p70 S6 kinase (Thr 388) from Cell Signalling (mouse, 9206). Horseradish peroxidase-conjugated antibodies and enhanced chemiluminescence reagents were obtained from Santa Cruz (USA). RAD001 was provided by Novartis. Stattic, a kind gift of Prof. O Coqueret, was from Sigma (S7947). Unless indicated, all other reagents used in this study were obtained from Sigma. The following siRNAs were used: si-control A from Santa Cruz (sc-37007), si-Bcl-2 from Santa Cruz (sc-29214), si-Bcl-xL from Dharmacon (L-003458-00), si-Mcl-1 from Ambion (120644), si-Bim from Cell Signaling (6461), siPuma from Dharmacon (L-004380-00), si-Myc from Santa Cruz (sc-29226), si-Akt1 from Santa Cruz (sc-44188), si-Foxo3A from Invitrogen (FOXO3a Validated Stealth DuoPak)

Cell lines

BT474, SKBR3 and MCF7, obtained from ATCC, were grown at 37°C with 5% of CO₂ and humidified atmosphere. BT474 and MCF7 cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 1% glucose (45%), 0,1% insulin, 1% Na-pyruvate, 1% non essential amino acids, 5% penicillin. SKBR3 were grown in Mc Coy's 5A medium supplemented with 10% FBS, 5% glutamine, and 5% penicillin.

Transient RNA interference and drug treatment

One day prior transfection, $2 \cdot 10^5$ cells/well were seeded in 6-well plates with complete medium. Cells were transfected with siRNA oligonucleotides using LipofectamineTM RNAiMax (Invitrogen) according to the manufacturer instructions. Briefly, cells were gently washed with PBS (Phosphate Buffered Saline) before transfection with a mix containing OPTIMEM, transfection reagent and 60 pmol of siRNA. After 5 hours of incubation, cells were gently washed with PBS and fresh complete medium was added.

When applicable, a second transfection was performed 24 hours later following the same protocol. Adherent and floating cells were collected 48 hours later to perform western blot analysis or cell death investigations. Treatment of BT474 cells with RAD001 (20nM) and Stattic (20 μ M) was performed on cells seeded in 6-well plates at 2.10^5 cells/well the day before and analysis was performed as described above.

Western-blot analysis.

Cells treated with RAD001, Stattic and/or the indicated siRNAs were lysed as follows. Floating and adherent cells were washed twice with cold-PBS. They were then lysed in lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatinA, 0.5M NaF, 100mM Na₃VO₄) and extracts were sonicated six times for 15s each. Supernatants were recovered by centrifugation at 12000 rpm for 10 min at 4°C.

Tumor lysates were obtained as follows. Tumor tissue samples were surgically collected from untreated patients and processed in two parts by a pathologist: the first part was fixed in 10% neutral buffered formalin for standard histological analysis and determination of the HER2 by immunohistochemistry, and the second part was immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -180°C. This second part was crushed in liquid nitrogen with a mortar. After three washes in PBS, the samples were resuspended in a comparable volume of lysis buffer and extracts were sonicated on ice for 15 minutes. Supernatants were recovered by centrifugation at 12000 rpm for 10 min at 4°C.

Lysates prepared as described above (70 μ g of total proteins) were separated by SDS-PAGE (12% polyacrilamide gel) under reducing conditions followed by transfer to a 0.45 μ m PVDF membrane (Immobilon-P transfer membrane, IPVH00010). Non-specific binding was blocked by one hour incubation at room temperature in TBS-T (Tris Buffered Saline Tween, 25mM Tris, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH=8.0) containing 5% (v/v) of blocking reagent (Western blocking reagent, Roche, 11921681001). Primary monoclonal antibodies were incubated for one hour at 37°C. After 3 washes with TBS-T, membranes were incubated with peroxidase conjugated secondary antibody for one hour at 37°C. Following 3 washes with TBS-T, the blots were developed using the chemiluminescent blotting Substrate Kit (Roche).

Cell death assays.

Following the indicated treatments, cells were labeled with the IOTest anti-APO2.7-PE (Beckman Coulter, PN IM2088U) according to the manufacturer's instructions. Briefly, floating and adherent cells were washed once in PBS, transferred in 96 well plates and washed twice more in cold PBS. Cells were then resuspended in 500 µl of labeling mix diluted in PBS and incubated in the dark for 15 minutes at RT. Cells were then washed in PBS and either immediately analyzed by FACS or fixed in 1% paraformaldehyde for delayed FACS analysis. APO2.7 positive cells were analyzed using the FL1 channel (Ex. 486-580nm/Em. 568-590nm) of a FACS Calibur™ cytofluorometer (BD).

Mammosphere assays

BT474 cells treated with the indicated siRNA were plated as single cells in ultralow attachment plates (Corning) at low density (5,000 viable cells/ml). They were grown in serum-free mammary epithelial basal medium (Cambrex Bio Science) for 2 days, after which the capacity of cells to form spheres was quantified.

Statistical analysis of published expression data

The impact of HER2 status on the expression of 20 genes of the Bcl-2 family was evaluated by means of Wilcoxon test. When the evaluation was performed in a “probe-matching” way, 2 pooled published cohorts for which Affymetrix data were available were used after their conversion to a common scale. In a “gene-matching approach” the evaluation was performed on a larger pool obtained by merging 5 genomic published cohorts (Ma, 2004; Chin, 2006; Hess, 2006; Calabro, 2009; Jézéquel, 2009). If multiple probes corresponded to a same gene, the median of probes was taken.

Results

Mcl-1, which is highly expressed in HER2 overexpressing cancers, is required to maintain the survival of HER2 overexpressing BT474 cells in vitro

The HER2 amplified BT474 breast cancer express detectable levels of the main anti-apoptotic Bcl-2 homologs Bcl-xL, Bcl-2 and Mcl-1 (see Figure 1B). We investigated whether any of these proteins play a crucial role in maintaining the viability of BT474 cells *in vitro* using a RNA interference approach based on the transfection of small interfering RNAs (siRNA) targeting Bcl-xL, Bcl-2 or Mcl-1.

As shown in Figure 1B, treatment of BT474 cells with the corresponding siRNA led to the selective down regulation of the targeted proteins 48 hours after transfection. We analyzed the consequence of Bcl-xL, Bcl-2 and Mcl-1 depletion, under the same conditions, on the viability of BT474. For this purpose, we measured the expression, by the transfected cells, of the APO2.7 antigen (also known as the 7A6 antigen), whose expression is restricted to dying, apoptotic cells. As shown in Figure 1A, knock down of Mcl-1 expression by RNA interference lead to the induction of apoptosis in a substantial fraction of cells. In contrast, depletion of either Bcl-xL or Bcl-2 did not induce apoptosis in BT474 cells. Thus, Mcl-1 is specifically involved in preventing BT474 cells from spontaneously undergoing apoptosis.

Interestingly, we found that this feature of “Mcl-1 dependence” was displayed by another HER2 overexpressing cell line, SKBR3, as transfection with Mcl-1 siRNA was sufficient to induce rates of apoptosis in these cells also (Figure 1C). In contrast, transfection with Mcl-1 siRNA, under the same conditions, had no detectable effect on the viability of ER positive MCF7 cells, that do not overexpress HER2 (Figure 1C).

Transformed mammary epithelial cells, including established breast cancer cell lines such as BT474 cells [25], exhibit an inherent phenotypic plasticity and harbor a subpopulation of cells with features of cancer initiating cells (CIC). The latter cells, which are characterized by numerous parameters such as their ability to form spherical colonies in non-adherent culture conditions (mammospheres), were frequently described as being resistant to cell death induction by numerous stimuli [26]. This suggests that they may rely on survival signals distinct from these that are critical for the rest of the population. It is thus important to investigate whether the Mcl-1 dependence of BT474 cells revealed above (in assays performed on the bulk population) applies to the subpopulation of CICs. To test this, we reasoned that, if BT474 CICs are Mcl-1 dependent, then a diminished ability to form mammospheres should be observed in a population of BT474 that has been depleted in Mcl-1. BT474 were thus transfected with control or Mcl-1 siRNA, as described above, and the ability of the resulting pools to form mammospheres was evaluated. As shown in Figure 2, the ability of BT474 cells treated with Mcl-1 siRNA to form mammospheres was significantly decreased compared to that of the same cells treated with a control siRNA. Taken together, these data indicate that the HER2 overexpressing BT474 require Mcl-1 to survive *in vitro*, and this Mcl-1 dependence appears to extend to their subpopulation of CICs.

These data indicate that pathways that will drive expression of Mcl-1 in HER2 overexpressing breast cancers will contribute to pathogenesis. To investigate whether such pathways are specifically active in these cancers, compared to breast cancers that do not overexpress HER2, we analyzed the expression of 20 pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family members from published gene-expression profiles of breast cancer patients. We based this analysis on studies in which the HER2 status of each tumor was available (having been evaluated by immunohistochemistry) and that were performed using Affymetrix microarrays. Two studies corresponded to these criteria (Chin, 2006; Hess, 2006) leading to investigate expression profiles of 41 HER2 overexpressing tumors and 170 HER2 - ones (Table 1). Our evaluation was performed in a “probe-matching” way, using the 2 pooled aforementioned cohorts. Regarding the expression of anti-apoptotic genes (pro-apoptotic ones are evoked below), this evaluation revealed a statistically significant enrichment, in HER2 overexpressing breast tumors compared to other breast tumors, in one MCL1 specific probe and also in one BCL2L1 (Bcl-xL) one (Table 1). In contrast, other breast tumors appeared statistically enriched for three BCL2 specific probes (Table 1). Interestingly, when the evaluation was performed on a larger pool obtained by merging the two previously described cohorts with 3 additional genomic published cohorts (Ma, 2004; Chin, 2006; Hess, 2006; Calabro, 2009; Jézéquel, 2009), using a “gene-matching” approach (see Methods), an enrichment in MCL1 expression in HER2 overexpressing tumors (455 HER2- versus 71 HER2+, $p=0,0156$), and in BCL2 in the other ones (216 HER2- versus 52 HER2+, $p=0,0145$) was also found. In contrast, enrichment in BCL2L1 (268 HER2- versus 55 HER2+,) was no longer found.

These molecular profiling analyses are mostly consistent with the notion that mechanisms leading to Mcl-1 transcription and expression are highly active in HER2 overexpressing breast cancers.

Inhibition of mTORC1 by RAD001 does not induce cell death but it prevents cell death induced by Mcl-1 knock down in BT474 cells

Since BT474 cells require Mcl-1 to maintain survival, interfering with signaling pathways that lead to Mcl-1 expression are expected to impact on the viability of these cells.

Numerous studies have shown that STAT3 can directly induce the transcription of Mcl-1 (reviewed in [27]). Moreover, a direct link between HER2 signaling and STAT3 activation has been suggested by the demonstration that, in vitro, STAT3 is phosphorylated when HER2 is overexpressed [28]. We treated BT474 cells with 20 μ M of Stattic, a cell permeant small-molecule Inhibitor of STAT3 activation and dimerization [29]. This treatment induced significant rates of apoptosis (Figure 3A). It also induced a significant decrease in Mcl-1 expression in treated cells (Figure 3B). In contrast, the expression levels of Bcl-xL were left unchanged (Figure 3B). These observations suggest that constitutive activity of STAT3 is involved in promoting Mcl-1 expression in BT474 cells and, by inference, in maintaining their viability. They also illustrate that it is possible to induce cell death in BT474 cells by interfering with pathways that promote Mcl-1 expression.

Another way to down regulate Mcl-1 is to interfere with its translation. Numerous data have put forth the notion that Mcl-1 protein and mRNA both have short half-lives, defining Mcl-1 as a sensor of changes in the rates of mRNA and protein synthesis (see for a review [30]). Since Mcl-1 mRNA has a G+C-rich 5'UTR, its translation is expected to be preferentially increased when the activity of EIF4F is elevated [31]. By inference, cells that require Mcl-1 for survival may be acutely dependent upon the activity of this complex, and highly sensitive to inhibitors that interfere with its activity. This might be particularly relevant for HER2 amplified tumor cells, in which the Akt/mTOR pathway is frequently active and S6K and EIF4E phosphorylated [32]. In these cells, mTORC1 activity may thus promote cell survival through translational control of Mcl-1, as reported in other systems [33]. The importance of Mcl-1 in maintaining the survival of HER2 overexpressing breast cancer cells may thus validate the use of mTORC1 inhibitors in the treatment of HER2 overexpressing tumors not only because they interfere with proliferation, but also because they might promote cell death. We treated BT474 cells with the mTORC1 inhibitor RAD001, under conditions that proved sufficient to prevent their growth [13], arrest these cells in the G1 phase of the cell cycle (data not shown) and prevent phosphorylation of S6K (Figure 3D). However, RAD001 did not induce significant apoptosis rates in BT474 cells (evaluated by APO2.7 staining as described above, Figure 3C).

We found that RAD001 treatment had no detectable impact on Mcl-1 expression (Figure 3D), which might explain its lack of effect as a single agent. The conservation of Mcl-1 expression in RAD001 treated cells may, moreover, mask a pro-apoptotic effect of RAD001, which may only be patent when Mcl-1 is down regulated.

To investigate this, cells were treated with RAD001 or not prior to their transfection with control or Mcl-1 siRNA, and cell death rates were analyzed as described above. As shown in Figure 4A, RAD001 treatment did not enhance cell death rates induced by Mcl-1 siRNA, indicating that RAD001 has no pro-apoptotic effect even in Mcl-1 depleted BT474 cells. Instead, we found that RAD001 very significantly prevented cell death induced by Mcl-1 siRNA. Western blot analysis (Figure 4B) showed that RAD001 treatment did not interfere with the ability of Mcl-1 siRNA to down regulate Mcl-1 and that, conversely, RAD001 treatment was still efficient (as judged by phosphorylation of S6K) in Mcl-1 depleted cells. Thus, these data reveal a genuine anti-apoptotic effect of RAD001 treatment in BT474 cells, which allows these cells to survive even when Mcl-1 is depleted.

The Mcl-1 dependence of BT474 is due to RAD001 sensitive expression of pro-apoptotic Bim

The above data establish that mTORC1 activity contributes to signals that install state of Mcl-1 dependence in BT474 cells. They also put forth the notion that such signals may function independently from Mcl-1 itself, as they can be shut down (in our case through mTORC1 inhibition by RAD001) even in Mcl-1 depleted cells. To investigate what could be the molecular basis of these signals, we made use of current knowledge on the mechanisms through which Bcl-2 homologs promote survival. It is, in particular, well established that they do so in great part by counteracting pro-apoptotic counterparts of the Bcl-2 family, Bax/Bak and their upstream effectors the BH3-only proteins. Some BH3-only proteins, such as Bid, BIM or PUMA interact with all known anti-apoptotic Bcl-2 members, and they are proposed to also activate Bax/Bak directly. They are therefore good candidates as proteins that can initiate death signals that render anti-apoptotic proteins (in our case, Mcl-1) required for survival. This is particularly true for Bim and Puma, that activate Bax/Bak essentially in their native form, whereas cleavage of Bid is required for it to exert its pro-apoptotic activity [34].

We found that BT474 cells express detectable levels of Puma and of Bim (Figure 5B). Regarding the latter protein, it has to be noted that we essentially detected its Bim Extra-Long (EL) form, whereas the Long (L) and Short (S) forms were barely detectable in these cells (see for instance Figure 7B or Figure 8A).

To investigate whether Bim or Puma play an active role in the Mcl-1 dependence of BT474 cells, these cells were transfected with control, Bim or Puma siRNA, which down regulated efficiently the targeted proteins (Figure 5B), prior to their transfection with Mcl-1 siRNA and investigation of cell death. Of note, neither Bim nor Puma siRNA affected cell viability by themselves (data not shown). As shown in Figure 5A, Bim depletion robustly prevented cell death induced by transfection with Mcl-1 siRNA, indicating that this pro-apoptotic protein plays a major role in the Mcl-1 dependence of BT474 cells.

In contrast, PUMA depletion had a less pronounced and less consistent effect on Mcl-1 siRNA induced cell death (Figure 5A).

Since Bim expression affects the Mcl1 dependence of BT474 cells, we then analyzed whether RAD001 had an impact on its expression. As shown in Figure 5C, RAD001 treatment significantly decreased Bim expression in BT474 cells. This was also the case in Mcl-1 depleted cells or in cells treated with a control siRNA (Figure 5D). In contrast the expression levels of XIAP, another anti-apoptotic protein whose expression was reported to be enhanced by mTORC1 inhibition in some cases [35] were left unchanged by RAD001 treatment (Figure 5D).

It rises from above that constitutive expression of Bim contributes to render Mcl-1 necessary for the survival of HER2 overexpressing tumors. To analyze whether mechanisms leading to Bim transcription are particularly at stake in HER2 overexpressing tumors, we went back to our investigation of published gene-expression profiles of breast cancer patients using a probe-matching approach as described above. As shown in Table 1, we found a statistically significant enrichment, in HER2 overexpressing breast tumors compared to other breast tumors, in one BCL2L11 (Bim) specific probe. Regarding pro-apoptotic genes, a statistical enrichment in one BID specific probe and in BIK specific probe were also found (Table 1). In contrast, other breast tumors appeared statistically enriched for two PMAIP1 (Noxa) specific probes and for one BAD specific one (Table 1). While this tend to suggest that pathways leading to Bim transcription might be more active in HER2 overexpressing breast cancers, this should nevertheless be taken cautiously. Indeed, we did not confirm a statistical enrichment for Bim expression in HER2 overexpressing cancers by our gene-matching approach involving 5 cohorts (described above), even though enrichment for BID and BIK and impoverishment for BAD and NOXA were confirmed.

In an independent attempt to confirm that HER2 overexpressing tumors express Bim proteins, we prepared lysates from five tumors that had been diagnosed as HER2 overexpressing ones by immunohistochemistry and performed western blot analysis.

As shown in Figure 6, these lysates expressed detectable levels of anti-apoptotic Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1. They also expressed detectable levels of Bim. Most importantly here, we picked these samples because they correspond to tumors that had received no treatment prior surgery. The expression of pro-apoptotic Bim detected does not, therefore, result from stress induced by putative treatments, but results from signals that are inherent to the biology of these tumors.

mTORC1 dependent c-Myc expression contributes to Bim expression and Mcl-1 dependence of BT474 cells

We then investigated which mTORC1 dependent signaling pathways might contribute to Bim expression in BT474 cells. Foxo3a is a member of the FoxO class of the forkhead family of winged helix transcription factors, which was reported to directly induce the transcription of Bim, in particular in some breast cancer cells [36]. Akt negatively regulates its transcriptional activity. Since RAD001 treatment activates Akt (see Figure 8A below), transcription of Bim by Foxo3A may account for RAD001 sensitive expression of Bim in BT474. However, a RNA interference approach that successfully down regulated Foxo3A expression in BT474 cells (Figure 7A) had no discernible effect on Bim protein expression (Figure 7B), ruling out that Foxo3A activity is responsible for the constitutive expression of Bim in these cells.

c-Myc is a transcription factor that resembles transcription factors of the basic helix–loop–helix leucine zipper (bHLH–LZ) family. It is a major regulator of cell proliferation but it is also capable of promoting apoptosis. In particular, it was reported to induce Bim expression in certain settings [37]. Moreover, its expression is expected to be highly dependent of mTORC1 activity in cells with high Akt activity such as HER2-overexpressing cells [11] [12]. Consistent with this notion, RAD001 treatment of BT474 (which, as mentioned above, prevents their proliferation) leads to a decrease in c-Myc expression (Figure 7C). We used a RNA interference approach to specifically down-regulate c-Myc in BT474 cells (Figure 7A) and we found that it induced a significant decrease in the expression of Bim in the resulting cells (Figure 7B). These data indicate that RAD001 sensitive c-Myc is involved in the constitutive expression of Bim in BT474 cells.

To investigate whether c-Myc is involved in the inherent Mcl-1 dependence of BT474 cells, these cells were transfected with control or c-Myc siRNA, prior to their transfection with Mcl-1 siRNA and investigation of cell death as described above. Of note, c-Myc siRNA had no impact on cell viability by itself (data not shown).

As shown in Figure 7C, decreased c-Myc expression prevented cell death induced by transfection with Mcl-1 siRNA, indicating that this transcription factor contributes to the Mcl-1 dependence of BT474 cells.

Akt represses Bim expression in mTORC1-inhibited BT474 cells

One well established survival effect of mTORC1 inhibitors relies on their ability to activate Akt, through the inhibition of a negative feedback exerted by S6K on receptor tyrosine kinase and PI3K signaling [38] [39]. Western blot analysis revealed that treatment of RAD001 that was efficient at decreasing Bim expression enhanced the quantity of Akt phosphorylated at S473, suggesting that RAD001 promotes Akt activation (Figure 8A).

To analyze what role Akt might play in the survival of untreated and RAD001 treated BT474 cells, we down regulated Akt1 expression by a RNA interference approach. Down regulation of Akt had no detectable effect on Mcl-1 or Bim expression in untreated cells (Figure 8B). It had no impact on cell viability by itself and it did not enhance cell death induced by Mcl-1 siRNA (Figure 8C). In contrast, Akt depletion abrogated the cytoprotection exerted by RAD001 against Mcl-1 depletion induced cell death: Akt siRNA treated BT474 cells, as opposed to control treated cells, were not protected from Mcl-1 siRNA induced cell death by RAD001 treatment. Thus, Akt is involved neither in the constitutive survival of BT474 cells nor in the mechanisms that lead to their Mcl-1 dependence. Instead, it is involved in the protective effects of mTORC1 inhibition. Consistent with the notion that this occurs at the level of Bim expression, RAD001 treatment did not decrease Bim expression in Akt-depleted BT474 cells (Figure 8D). Interestingly, c-Myc expression was lower in Akt depleted cells than in control cells, yet RAD001 treatment no longer diminished, but rather enhanced, c-Myc expression in the former (Figure 8E).

We used, in this study, BT474 cells that overexpress HER2/neu, and in which signaling downstream of this member of the EGF receptor family is highly active. Our results establish that, despite the potent and numerous survival signals that are associated with HER2 activity, these cells rely on the expression of a single anti-apoptotic protein for their survival. We show, indeed, that the down regulation of Mcl-1 is sufficient to induce significant rates of spontaneous apoptosis in these cells. Mcl-1 appears to be crucial even for the subpopulation of BT474 that have features of cancer initiating cells, as its depletion significantly reduces the number of mammospheres these cells can form. Preliminary data tend to indicate that the codepletion of pro-apoptotic Bim (which reduces cell death rates induced by Mcl-1 depletion as discussed below) mitigates the effects of Mcl-1 knock down on mammosphere formation (data not shown). These effects are thus most likely to be a direct consequence from the induction of cell death, by Mcl-1 down regulation, in sphere forming cells. We cannot formally rule out, however, that Mcl-1 contributes to the biology of cancer initiating cells by mechanisms other than regulation of cell survival *stricto sensu*. This aspect is currently being investigated in our laboratory.

Given the role played by Mcl-1 in maintaining the survival of HER2 expressing cells, and in maintaining a significant pool of cancer initiating cells among them, pathways that lead to the expression of the anti-apoptotic protein Mcl-1 are expected to contribute to the pathogenesis of HER2 amplified mammary tumors. Conversely, pharmacological manipulations of these pathways may be of therapeutic benefit. Our investigation of published expression data hint on a selective enrichment for Mcl-1 transcripts in HER2 amplified mammary tumors compared to other mammary tumors.

Thus, pathways that positively impact on the transcription of Mcl-1 may be particularly active in HER2 amplified tumors, either because they are directly triggered by this pathway or because their secondary activation contributes to the progression of this malignancy.

The effect of Stattic on the expression of the Mcl-1 protein in BT474 cells, even though an effect on Mcl-1 mRNA expression needs to be confirmed, indicates that one signaling pathway that might control Mcl-1 expression in HER2 amplified cells is the one that relies on STAT3 activity. STATs are latent cytoplasmic transcription factors, but they can be activated by either Janus activated kinases or tyrosine kinase receptors.

Activation of STATs has been demonstrated in response to ligands that activate growth factor receptors with tyrosine kinase activity, including HER2 [40] [28]. In fact, constitutive activation of STAT3 is found in many human cancers, including 30 to 60% of primary breast cancer [41]. Most relevantly here is the recent classification of breast cancers that was performed by Gatza et al., based on molecular profiling and making use of previously established patterns of pathway activity [42]. This classification underlined a positive relationship between HER2 activity and STAT3 activity (see Figure 2B of the corresponding reference). It also led to the identification of a subgroup of breast cancers that typically exhibits status of high HER2 and STAT3 activities (subgroup 7 in Figure 3C of the same reference). Our data indicate that, at least in this subgroup, Mcl-1 is highly expressed and contributes to pathogenesis.

Interestingly, investigation of the Oncomine Cancer Profiling Database (www.oncomine.org) reveals that MCL1 is one of the 777 genes that constitute the « Differentially expressed genes in Human Mammary Epithelial Cell (HMECs) in response to oncogenic pathway stimulating viruses », suggesting that changes in MCL1 expression may be a frequent feature of epithelial transformation. More specifically, when we assessed for MCL1 mRNA levels (reporter numbers 200796_s_at, 200797_s_at, 200798_s_at, 214056_at, 214057_at) from the Bild_CellLine microarray data set of primary human mammary epithelial cells transfected with the vectors expressing GFP, E2F3, β -catenin, c-Myc, c-Src, or H-Ras, we found that the Ras pathway significantly upregulates MCL1 while other perturbations have no detectable effect. Thus, alterations in this pathway, which can be found in HER2 amplified tumors as suggested by molecular profiling [43], might contribute to their expression of Mcl-1 by mechanisms that require further investigation.

Since Mcl-1 translation might be critically determined by EIF4F activity [44], our demonstration of a key role of Mcl-1 in the survival of HER2-amplified cells might therefore provide one more rationale for the use of the mTORC1 inhibitor RAD001 against this malignancy. Our results nevertheless show that an impact of RAD001 on the viability of HER2-amplified cells, via an effect on Mcl-1, may not be guaranteed. Concentrations of RAD001 that are sufficient to inhibit the growth [13] and cell cycle progression of BT474 cells (our own unpublished data) are indeed inefficient at inducing apoptosis. This lack of effect coincides with a lack of effect of the treatment on Mcl-1 expression.

The reason why inhibition of mTORC1, in conditions in which it is sufficient to promote cell cycle arrest and the down regulation of proteins involved in cell cycle control (such as c-Myc), does not affect Mcl-1 expression, is currently unclear. One possibility is that RAD001, akin to rapamycin, only partially inhibits mTORC1, affecting S6K activity but leaving phosphorylation of 4EBP1 relatively unaltered. It is interesting to note here that increases in Mcl-1 protein levels downstream of oncogenic Akt signaling in thymocytes were shown to result from eIF4E hyperactivation, through a process that is specific to the 4EBP1 arm of oncogenic mTOR but that does not appear to rely on the S6K substrate rpS6 [44]. More potent inhibition of mTORC1 than that achieved by RAD001 might thus be required to impact on Mcl-1 expression in BT474 cells. We cannot rule out, moreover, the involvement of mechanisms capable of enhancing the stability of the Mcl-1 protein, such as the one that relies on the deubiquitinating enzyme USP9X [45], which is also involved in HER2 stability [46]. Since inhibition of protein synthesis by the translation elongation inhibitor cycloheximide nevertheless leads to substantial decreases of Mcl-1 in BT474 (data not shown), we assume that these putative mechanisms of Mcl-1 protein stabilization would themselves be dependant upon protein synthesis. The resistance of Mcl-1 expression to mTORC1 inhibition by compounds that are used in the clinic, revealed here, suggests that strategies aiming at inhibiting Mcl-1 transcription might constitute a more efficient approach than these that target its translation.

Our investigation of the effects of RAD001 treatment on BT474 cells lead to the observation that this treatment not only leaves cell viability unaltered, but that it protects cells against death induced by Mcl-1 depletion. This puts forth the notion that active death signals are involved in installing a cellular state that renders Mcl-1 absolutely required for survival. It has been established, over the last decade, that the pro-apoptotic multi-domaine proteins Bax and Bak play a major role in the apoptotic response of mammalian cells. Moreover, numerous data have converged towards the notion that the BH3 domains of some “activator” BH3-only proteins (that of Bid, Bim and Puma) have the innate ability to interact with these proteins and to activate them (see [34] for a review). The view that emerges from these data is that anti-apoptotic proteins allow cell survival by binding to their pro-apoptotic counterparts, thereby preventing a low affinity but high efficiency interaction between “activator” BH3-only proteins and multidomain proteins to occur and to kill cells. In support to this, we recently established that the ability of PUMA to activate Bax renders cells that constitutively express it dependent upon the sustained BH3-binding activity of Bcl-2 and Bcl-xL for survival.

Our observation that cell death rates induced by Mcl-1 depletion in BT474 cells are decreased by the codepletion of Bim (and, to a lesser degree, by that of PUMA) is also mostly consistent with this view. Numerous studies (in particular in lung and breast cancer cells, [47]) have hinted on a role of the Bim/Mcl-1 balance in the control of survival, but very few have shown, as it is the case here, that the mechanism involved relies on Mcl-1 counteracting the ability of Bim to promote cell death, rather than the ability of Bim to erode the cytoprotective effect of Mcl-1.

It rises from above that signaling pathways that lead to the expression and the stability of Bim actively contribute to render Mcl-1 expression required for survival. Our finding that Bim expression can be detected in lysates that were prepared from 5 HER2-amplified tumors that had received no treatment indicate that such pathways are active in this malignancy. Mechanisms that regulate Bim transcription in particular might be effective, as suggested by the possible enrichment for some Bim transcripts in HER2 amplified tumors revealed by our investigation of publicly available expression data from breast cancer. Our finding that RAD001 negatively regulates Bim expression indicate that mTORC1, which plays an important oncogenic role in HER2 amplified tumors, might contribute to this expression. The pro-apoptotic role our data attribute to the mTOR pathway is somewhat reminiscent to that reported for its downstream kinase S6K in hepatocytes, where S6K contributes to Bim expression [48].

Our data suggest that mTORC1 favors Bim expression by two pathways. First, we found that mTORC1 controls the expression and the activity of c-Myc, and that this transcription factor is involved is the constitutive expression of Bim in BT474 cells. As wild type c-Myc was shown to induce Bim expression in murine cells, we speculate that RAD001 sensitive c-Myc might be directly involved in the transcription of Bim in BT474 cells. Experiments, in which the occupancy of the Bim promoter by c-Myc in untreated and RAD001 treated BT474 cells, and in which the impact of RAD001 and of c-Myc knock down on Bim mRNA levels are investigated, are currently performed in our laboratory to confirm this notion. Alternatively, the effects of RAD001 sensitive c-Myc on Bim expression might be indirect. BCL2L11, the gene that encodes for Bim, is another one of the 777 genes that are differentially expressed genes in HMECs in response to oncogenic pathway stimulating viruses. Assessment for BCL2L11 mRNA levels (reporter numbers 155372_at, 1558143_at, 255606_at) from the aforementioned Bild_CellLine microarray data indicate that Bim might be directly regulated by E2F3 (a transcription factor involved in cell cycle progression) but not by Myc itself.

It is thus possible that the effect of c-Myc knock down, and that of RAD001, on Bim expression results from a decrease in the activity of the E2F pathway due to cell cycle arrest.

Second, we found that RAD001 treatment enhances Akt activity in BT474 cells. This suggests that the previously reported negative feedback loop that mTORC1 exerts on Akt extends to HER2-amplified cancer cells, a somewhat expected finding given the role played by PI3K (which is activated by HER2), in this feedback [38] [39]. Using a RNA interference approach to down regulate Akt expression, we found that Akt has no detectable impact on the constitutive expression of Bim in BT474 cells, but that it plays a role in the decrease in Bim expression in RAD001 treated cells. Thus the negative feedback loop exerted by mTORC1 on Akt activity contributes to the positive effects of mTORC1 on net Bim expression, and on the Mcl-1 dependence of BT474 cells. Exactly how Akt intervenes in mTORC1-driven Bim expression and Mcl-1 dependence remains poorly characterized. The repression exerted by RAD001 on c-Myc expression is lost in Akt depleted cells.

This is consistent with the notion that Akt activity contributes to render c-Myc expression mTORC1 dependent [12]. It also suggests that Akt activation by RAD001 contributes to the anti-apoptotic effects of the compound by preventing repression of c-Myc.

It should be noted, however, that c-Myc expression is lower in Akt depleted cells (treated or not with RAD001) than in untreated control cells, even though comparable levels of Bim are detected under these conditions. This raises the possibility that RAD001 sensitive Akt has a negative effect on Bim expression independently from c-Myc. A transcriptional effect of Akt via the negative regulation of Foxo3A seems unlikely, given the very limited effects of Foxo3A downregulation on Bim protein levels in BT474 cells. One plausible explanation is that Akt controls Bim stability, as it has been suggested that a direct phosphorylation of Bim by Akt might contribute to Bim degradation [49]. Interestingly, a role for mTORC1 in favoring Bim stability is suggested by the observation that cycloheximide treatment has a much stronger effect on Bim expression in RAD001 treated cells than in control cells (data not shown). It is also formally possible that Akt impacts on c-Myc transcriptional activity, in which case Akt induced by RAD001 might prevent c-Myc transcription of Bim (or of targets that promote Bim expression) thereby combining with RAD001-induced c-Myc decrease to diminish Bim expression.

In all cases, further experiments are required to establish whether Akt regulates Bim expression at a transcriptional or post-transcriptional level in RAD001 treated cells, and discriminate between these possibilities.

Regardless of the mechanisms involved in the effects of RAD001 on Bim expression in BT474 cells, they imply that mTORC1, an oncogenic kinase whose activity is required for the growth of these cells, directly contributes to their Mcl-1 dependence. This observation brings support to the notion that the apparent “addiction” of HER2 amplified tumors to this pathway results from the fact that it induces antagonistic survival and death signals. Indeed, it associates directly to the HER2 pathway one death signal (Bim expression) that needs to be counteracted by a survival signal (Mcl-1 expression), which also lies downstream of this pathway. The view that emerges from this is that the positive effect of mTORC1 on c-Myc expression and its negative effect on Akt (discussed above) locks HER2 amplified cells in a state that requires sustained expression of Mcl-1 to maintain survival. Thus, some therapeutic approaches targeting the HER2 pathway might inefficiently affect tumor cell survival, due to their inability to maintain sufficiently high levels of Bim expression. This would be the case for RAD001 treatment, that might be of therapeutic interest through its cytostatic effects against HER2-amplified tumor cells, yet fail to promote tumor destruction. *A contrario*, approaches that circumvent the side effect of therapies targeting the HER2 pathways on Bim expression, and tip the Bim/Mcl-1 towards Bim activity, will be of enhanced efficiency. This underscores the interest in combining inhibition of mTORC1 with that of signaling pathways involved in the negative feedback it exerts on Akt, such as the PI3K pathway.

An alternative approach is to directly take benefit from the dependence of HER2 amplified cells to Mcl-1 by developing approaches that target this “non-oncogenic addiction”. These approaches might selectively affect the survival of HER2 addicted tumors. Given the importance of protein-protein interactions in the anti-apoptotic function of Mcl-1, inhibitors of the interactions Mcl-1 engages with Bim (and possibly other pro-apoptotic members of the Bcl-2 family) might be of interest. While a very strong inhibitor of Bcl-2 and Bcl-xL has been characterized, there are less Mcl-1 inhibitors that have been characterized to date. One of them is the small molecule compound TW37, which was shown to inhibit the interaction between Bim and Mcl-1 in malignant B lymphocytes [50]. Our preliminary investigations tend to indicate that this compound exerts little single agent activity when added to BT474 cells.

One possibility for this lack of effect is that Bim /Mcl-1 complexes, or other complexes Mcl-1 is critically engaged in, are not affected by this treatment. Alternatively, even when this compound inhibits Mcl-1, *de novo* protein synthesis might be required to create a sufficient amount of free Bim and kill cells. This is suggested by the fact that cycloheximide treatment, which leads to Mcl-1 depletion and maintains detectable levels of Bim, does not impact on the viability of BT474 cells. This implies that down regulation of Mcl-1, which is in itself sufficient to promote Bim dependent cell death, might impact on Bim synthesis by a mechanism that requires to be elucidated.

CONCLUSIONS

Our work provides strong support to the notion that some tumor cells might depend upon a limited number of anti-apoptotic proteins, and Bcl-2 like proteins in particular, for their survival. It establishes that this “Bcl-2 dependence” extends to HER2 amplified tumors, and that, in these tumors, it relies, at least in part, on the interconnected pathways that lead to pro-apoptotic Bim and anti-apoptotic Mcl-1 expressions. This implies that current targeted approaches need to influence the balance between Bim and Mcl-1 to efficiently affect cancer cell survival. It strongly suggests that novel strategies (such as these based on the use of Bcl-2 homologs inhibitors) that directly act upon this balance without interfering with the rest of the HER2 network are a promising alternative for the treatment of this disease. On a more general perspective, our work illustrates how the molecular characterization of mechanisms that regulate cancer cell survival can help to diagnose “Bcl-2 dependences” in breast cancer, to refine the efficiency of current treatments, and to validate the development, in breast cancer therapy, of approaches that target mechanisms critically involved in cell survival.

Acknowledgments

We thank Prof. O. Coqueret and Dr Benjamin Barré for fruitful comments and Dr Céline Séveno for her help and criticism throughout this study. This work was supported by a fellowship (to B.N.) and a grant (to M.C.) from Novartis, by a fellowship from Institut de Recherche Servier (to Y.G.) and by grants from ARC (n°4875), Fondation de France (“Tumour” committee) and Région Pays de la Loire (CIMATH network) to P.J.

REFERENCES

1. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** *Science* 1987, **235**(4785):177-182.
2. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A *et al*: **Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.** *Science* 1989, **244**(4905):707-712.
3. Yarden Y, Sliwkowski MX: **Untangling the ErbB signalling network.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**(2):127-137.
4. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M *et al*: **Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions.** *Embo J* 1996, **15**(10):2452-2467.
5. Guertin DA, Sabatini DM: **Defining the role of mTOR in cancer.** *Cancer Cell* 2007, **12**(1):9-22.
6. Hay N, Sonenberg N: **Upstream and downstream of mTOR.** *Genes Dev* 2004, **18**(16):1926-1945.
7. Le XF, Pruefer F, Bast RC, Jr.: **HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 via multiple signaling pathways.** *Cell Cycle* 2005, **4**(1):87-95.
8. Lenferink AE, Busse D, Flanagan WM, Yakes FM, Arteaga CL: **ErbB2/neu kinase modulates cellular p27(Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways.** *Cancer Res* 2001, **61**(17):6583-6591.
9. Liang J, Slingerland JM: **Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression.** *Cell Cycle* 2003, **2**(4):339-345.
10. Kessler DJ, Duyao MP, Spicer DB, Sonenshein GE: **NF-kappa B-like factors mediate interleukin 1 induction of c-myc gene transcription in fibroblasts.** *J Exp Med* 1992, **176**(3):787-792.
11. Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N: **eIF4E--from translation to transformation.** *Oncogene* 2004, **23**(18):3172-3179.
12. Shi Y, Sharma A, Wu H, Lichtenstein A, Gera J: **Cyclin D1 and c-myc internal ribosome entry site (IRES)-dependent translation is regulated by AKT activity and enhanced by rapamycin through a p38 MAPK- and ERK-dependent pathway.** *J Biol Chem* 2005, **280**(12):10964-10973.
13. Miller TW, Forbes JT, Shah C, Wyatt SK, Manning HC, Olivares MG, Sanchez V, Dugger TC, de Matos Granja N, Narasanna A *et al*: **Inhibition of mammalian target of rapamycin is required for optimal antitumor effect of HER2 inhibitors against HER2-overexpressing cancer cells.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(23):7266-7276.
14. O'Rourke DM, Kao GD, Singh N, Park BW, Muschel RJ, Wu CJ, Greene MI: **Conversion of a radioresistant phenotype to a more sensitive one by disabling erbB receptor signaling in human cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(18):10842-10847.
15. Yu D, Liu B, Jing T, Sun D, Price JE, Singletary SE, Ibrahim N, Hortobagyi GN, Hung MC: **Overexpression of both p185c-erbB2 and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol.** *Oncogene* 1998, **16**(16):2087-2094.
16. Sharma SV, Settleman J: **Oncogenic shock: turning an activated kinase against the tumor cell.** *Cell Cycle* 2006, **5**(24):2878-2880.
17. Evan GI: **Can't kick that oncogene habit.** *Cancer Cell* 2006, **10**(5):345-347.
18. Sharma SV, Gajowniczek P, Way IP, Lee DY, Jiang J, Yuza Y, Classon M, Haber DA, Settleman J: **A common signaling cascade may underlie "addiction" to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes.** *Cancer Cell* 2006, **10**(5):425-435.

19. Juin P, Geneste O, Raimbaud E, Hickman JA: **Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1644**(2-3):251-260.
20. Gallenne T, Gautier F, Oliver L, Hervouet E, Noel B, Hickman JA, Geneste O, Cartron PF, Vallette FM, Manon S *et al*: **Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members.** *J Cell Biol* 2009, **185**(2):279-290.
21. Letai AG: **Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis.** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**(2):121-132.
22. Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang HG, Irie S, Fong L, Reed JC: **Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression.** *Cancer Res* 1994, **54**(21):5501-5507.
23. Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, Shabaik A, Gascoyne R, Berean K, Reed JC: **Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo.** *Am J Pathol* 1995, **146**(6):1309-1319.
24. Henson ES, Hu X, Gibson SB: **Herceptin sensitizes ErbB2-overexpressing cells to apoptosis by reducing antiapoptotic Mcl-1 expression.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**(3 Pt 1):845-853.
25. Reim F, Dombrowski Y, Ritter C, Buttman M, Hausler S, Ossadnik M, Krockenberger M, Beier D, Beier CP, Dietl J *et al*: **Immunoselection of breast and ovarian cancer cells with trastuzumab and natural killer cells: selective escape of CD44high/CD24low/HER2low breast cancer stem cells.** *Cancer Res* 2009, **69**(20):8058-8066.
26. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, Lander ES: **Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening.** *Cell* 2009, **138**(4):645-659.
27. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C, Dey S, Sung B: **Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?** *Ann N Y Acad Sci* 2009, **1171**:59-76.
28. Yuan G, Qian L, Shi M, Lu F, Li D, Hu M, Yu M, Shen B, Guo N: **HER2-dependent MMP-7 expression is mediated by activated STAT3.** *Cell Signal* 2008, **7**:1284-1291.
29. Schust J, Sperl B, Hollis A, Mayer TU, Berg T: **Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization.** *Chem Biol* 2006, **13**(11):1235-1242.
30. Akgul C: **Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer.** *Cell Mol Life Sci* 2009, **66**(8):1326-1336.
31. Graff JR, Konicek BW, Carter JH, Marcusson EG: **Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy.** *Cancer Res* 2008, **68**(3):631-634.
32. Rojo F, Najera L, Lirola J, Jimenez J, Guzman M, Sabadell MD, Baselga J, Ramon y Cajal S: **4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(1):81-89.
33. Mills JR, Hippo Y, Robert F, Chen SM, Malina A, Lin CJ, Trojahn U, Wendel HG, Charest A, Bronson RT *et al*: **mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(31):10853-10858.
34. Juin P, Cartron PF, Vallette F: **Activation of Bax by BH3 domains during apoptosis: the unfolding of a deadly plot.** *Cell Cycle* 2005, **4**(5):637-642.
35. Romagnoli M, Desplanques G, Maiga S, Legouill S, Dreano M, Bataille R, Barille-Nion S: **Canonical nuclear factor kappaB pathway inhibition blocks myeloma cell growth and induces apoptosis in strong synergy with TRAIL.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(20):6010-6018.
36. Sunters A, Fernandez de Mattos S, Stahl M, Brosens JJ, Zoumpoulidou G, Saunders CA, Coffey PJ, Medema RH, Coombes RC, Lam EW: **FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines.** *J Biol Chem* 2003, **278**(50):49795-49805.

37. Hemann MT, Bric A, Teruya-Feldstein J, Herbst A, Nilsson JA, Cordon-Cardo C, Cleveland JL, Tansey WP, Lowe SW: **Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants.** *Nature* 2005, **436**(7052):807-811.
38. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL *et al*: **mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt.** *Cancer Res* 2006, **66**(3):1500-1508.
39. Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC *et al*: **Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer.** *J Clin Invest* 2008, **118**(9):3065-3074.
40. Huang S: **Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(5):1362-1366.
41. Page C, Huang M, Jin X, Cho K, Lilja J, Reynolds RK, Lin J: **Elevated phosphorylation of AKT and Stat3 in prostate, breast, and cervical cancer cells.** *Int J Oncol* 2000, **17**(1):23-28.
42. Gatz ML, Lucas JE, Barry WT, Kim JW, Wang Q, Crawford MD, Datto MB, Kelley M, Mathey-Prevot B, Potti A *et al*: **A pathway-based classification of human breast cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(15):6994-6999.
43. Bild AH, Parker JS, Gustafson AM, Acharya CR, Hoadley KA, Anders C, Marcom PK, Carey LA, Potti A, Nevins JR *et al*: **An integration of complementary strategies for gene-expression analysis to reveal novel therapeutic opportunities for breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2009, **11**(4):R55.
44. Hsieh AC, Costa M, Zollo O, Davis C, Feldman ME, Testa JR, Meyuhas O, Shokat KM, Ruggero D: **Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E.** *Cancer Cell* 2010, **17**(3):249-261.
45. Schwickart M, Huang X, Lill JR, Liu J, Ferrando R, French DM, Maecker H, O'Rourke K, Bazan F, Eastham-Anderson J *et al*: **Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival.** *Nature* 2010, **463**(7277):103-107.
46. Marx C, Held JM, Gibson BW, Benz CC: **ErbB2 trafficking and degradation associated with K48 and K63 polyubiquitination.** *Cancer Res* 2010, **70**(9):3709-3717.
47. Faber AC, Li D, Song Y, Liang MC, Yeap BY, Bronson RT, Lifshits E, Chen Z, Maira SM, Garcia-Echeverria C *et al*: **Differential induction of apoptosis in HER2 and EGFR addicted cancers following PI3K inhibition.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(46):19503-19508.
48. Gonzalez-Rodriguez A, Alba J, Zimmerman V, Kozma SC, Valverde AM: **S6K1 deficiency protects against apoptosis in hepatocytes.** *Hepatology* 2009, **50**(1):216-229.
49. Qi XJ, Wildey GM, Howe PH: **Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function.** *J Biol Chem* 2006, **281**(2):813-823.
50. Al-Katib AM, Sun Y, Goustin AS, Azmi AS, Chen B, Aboukameel A, Mohammad RM: **SMI of Bcl-2 TW-37 is active across a spectrum of B-cell tumors irrespective of their proliferative and differentiation status.** *J Hematol Oncol* 2009, **2**:8.

Figure 1 ARN interference mediated knock-down of Mcl-1, but not that of Bcl-2 or of Bcl-xL, induces cell death in HER2 overexpressing cells

BT474 cells were transfected with control siRNA, Bcl-xL siRNA, Bcl-2 siRNA or Mcl-1 siRNA as indicated. Forty-eight hours later, apoptosis was assessed by Apo 2.7 staining and FACS analysis as described in Methods. (A) Data represented (% of Apo2.7 positive cells) are the means $\pm$ standard errors of three independent experiments. p-values were assessed using a Student's t test (B) Down regulation of the targeted proteins 48 hours after transfection was confirmed by western blot analysis, using actin as a loading control. (C) Experiments were performed as described in A, using HER2 overexpressing SKBR3 cells, and ER expressing MCF7 cells, as indicated. Data are mean $\pm$ se of the indicated number of independent experiments. p-values were assessed using a Student's t test.

Figure 2 Mcl-1 knock-down negatively impacts on mammosphere formation by BT474 cells

BT474 cells were transfected with control or Mcl-1 siRNA, as described in Figure 1. One day later, the resulting cells were plated in non-adherent conditions under mammosphere medium, as described in Methods. Mammosphere formation was analyzed by microscopy (A) and enumerated (B) two days later.

Figure 3 Treatment with the mTORC1 inhibitor RAD001, unlike treatment with the STAT3 inhibitor Stattic, impacts neither on viability nor on Mcl-1 expression of BT474 cells.

(A-B) BT474 cells were treated with 20 μ M Stattic for 24 hours Cell death was then assessed by Apo2.7 staining as described in Methods (A) Data are mean $\pm$ se of three independent experiments. p-values were assessed using a Student's t test. Western blot analysis was performed to document the effect of Stattic on Mcl-1 and Bcl-xL expression (B).(C-D) BT474 cells were treated with 20nM RAD001 for 72 hours. Cell death was then assessed by Apo 2.7 staining as described in Methods (C). Data are mean $\pm$ se of three independent experiments. p-values were assessed using a Student's t test Western blot analysis was performed to document the effect of RAD001 treatment on the phosphorylation of p70S6K and on Mcl-1 expression (D).

Figure 4 RAD001 treatment protects BT474 cells against Mcl-1 knock down induced cell death

BT474 cells were treated with 20nM RAD001 or left untreated, as indicated. 24 hours later, cells were transfected with control or Mcl-1 siRNA and put back into control or RAD001 containing complete medium. Apoptosis was assessed 48 hours later by Apo 2.7 staining as described in Figure 1. Data are mean $\pm$ se of the indicated number of independent experiments. p-values were assessed using a Student's t test. Western blot analysis was performed at the end of the experiment to document the effects of RAD001 treatment and of Mcl-1 siRNA on the phosphorylation of p70S6K and on Mcl-1 expression, using β -tubulin as a loading control.

Figure 5 Expression of pro-apoptotic Bim is sensitive to RAD001 treatment and is required for Mcl-1 knock down induced cell death

BT474 cells were transfected with control siRNA, Bim siRNA or PUMA siRNA, as indicated. 24 hours later, cells were transfected with Mcl-1 siRNA. Apoptosis was assessed 48 hours later by Apo 2.7 staining as described in Figure 1 (A). Data are mean $\pm$ se of three independent experiments. They are expressed as a percentage of cell death obtained after Mcl-1 siRNA transfection of cells that had been transfected with control siRNA. p-values were assessed using a Student's t test. In (B), western blot analysis was performed to confirm the down regulation of the targeted proteins under the conditions used. Using actin as a loading control in each case, western blot analysis was also performed to document the effect of RAD001 treatment (48 hours at 20 nM) on Bim (EL) expression in BT474 cells (C), and the effect of the same treatment, and of Mcl-1 siRNA, on Bim (EL) and XIAP expression.

Figure 6 HER2-amplified mammary tumors express detectable levels of Bim

Western blot analysis of lysates from HER2 overexpressing tumors was analyzed as described in Methods.

Figure 7 RAD001 sensitive c-Myc expression in BT474 cells impacts on Bim expression and Mcl-1 dependence

BT474 cells were transfected with control siRNA, Foxo3A siRNA or c-Myc siRNA, as indicated. 48 hours later, western blot analysis was performed to confirm the effect of each siRNA on the expression of the targeted proteins (A) and on Bim (EL), (L-) and (S), as indicated (B). Western blot analysis was also performed to document the effects of RAD001 treatment (48 hours at 20 mM) on c-Myc expression in BT474 cells (C). In (D), BT474 cells were transfected with control siRNA, or c-Myc siRNA, as indicated. 24 hours later, cells were transfected with Mcl-1 siRNA and apoptosis was assessed 48 hours later as described in Figure 1. Data are mean $\pm$ se of three independent experiments. They are expressed as a percentage of cell death obtained after Mcl-1 siRNA transfection of cells that had been transfected with control siRNA. P-values were assessed using a Student's t test.

Figure 8 Akt is induced by RAD001 treatment of BT474 cells, and its knock down favors Bim expression and Mcl-1 dependence in RAD001 treated cells.

(A) Western blot analysis was performed to document the effects of RAD001 treatment (48 hours at 20 mM) of BT474 cells on the phosphorylation of Akt and on the expression of Bim (EL), (L) and (S).

(B-E) BT474 cells were transfected with control siRNA, or Akt siRNA, as indicated (First siRNA). 24 hours later, cells were transfected with control siRNA or Mcl-1 siRNA, as indicated (Second siRNA) and treated or not with RAD001 (20 mM). Apoptosis was assessed 48 hours later by Apo 2.7 staining as described in Figure 1 In (C) Data are mean $\pm$ se of three independent experiments. They are expressed as a percentage of cell death obtained after Mcl-1 siRNA transfection of cells that had been transfected with control siRNA. P-values were assessed using a Student's t test. In (B), western blot analysis was performed to effects of the first transfection (control siRNA or Akt siRNA) on total Akt expression, and on Mcl-1 and Bim (EL) expression. Western blot analysis was also performed to document the effect of RAD001 treatment on Bim (EL), (L) and (S) expression in Akt depleted cells (D) and the effects of RAD001 on c-Myc expression (using β -tubulin as a loading control) in control or Akt depleted cells (E).

TABLES

Table 1 Impact of HER2 status on the expression of Bcl-2 family members in mammary tumors

The impact of HER2 status on the expression of 20 genes of the Bcl-2 family was evaluated as described in Methods. + and - indicate an enrichment and an impoverishment, respectively, in the HER2 overexpressing cohort. p values were assessed by a Wilcoxon test.

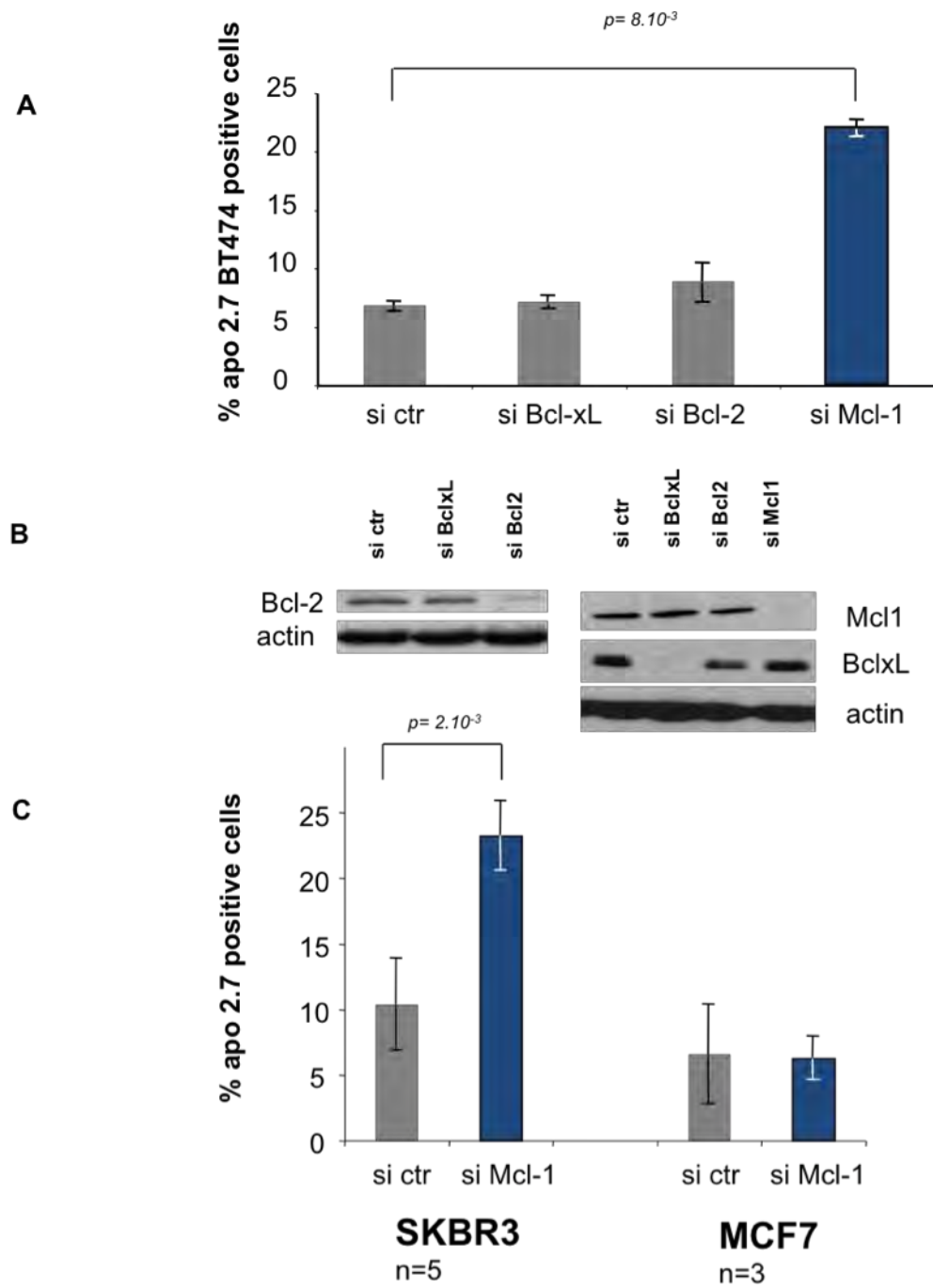


Figure 1 Campone et al.

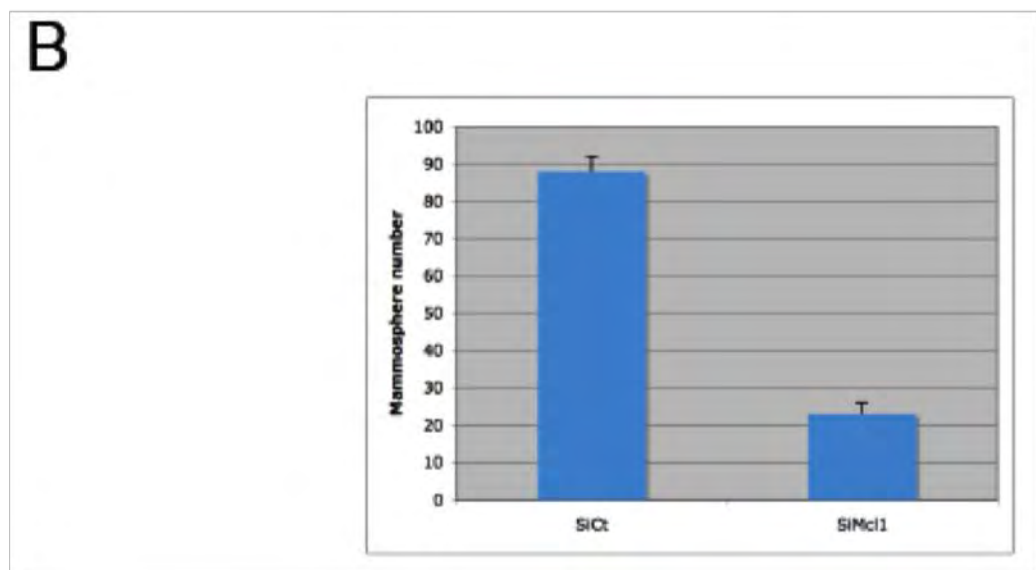
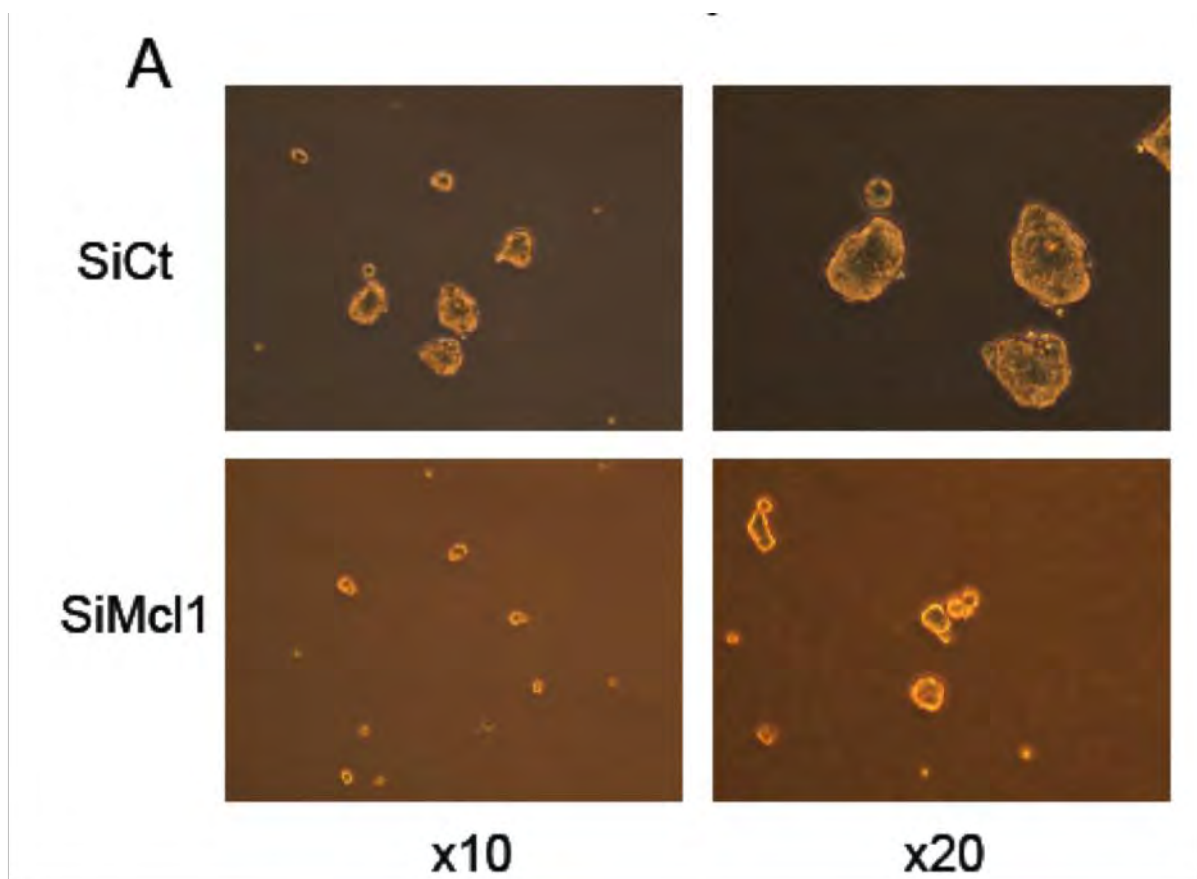


Figure 2 Campone et al.

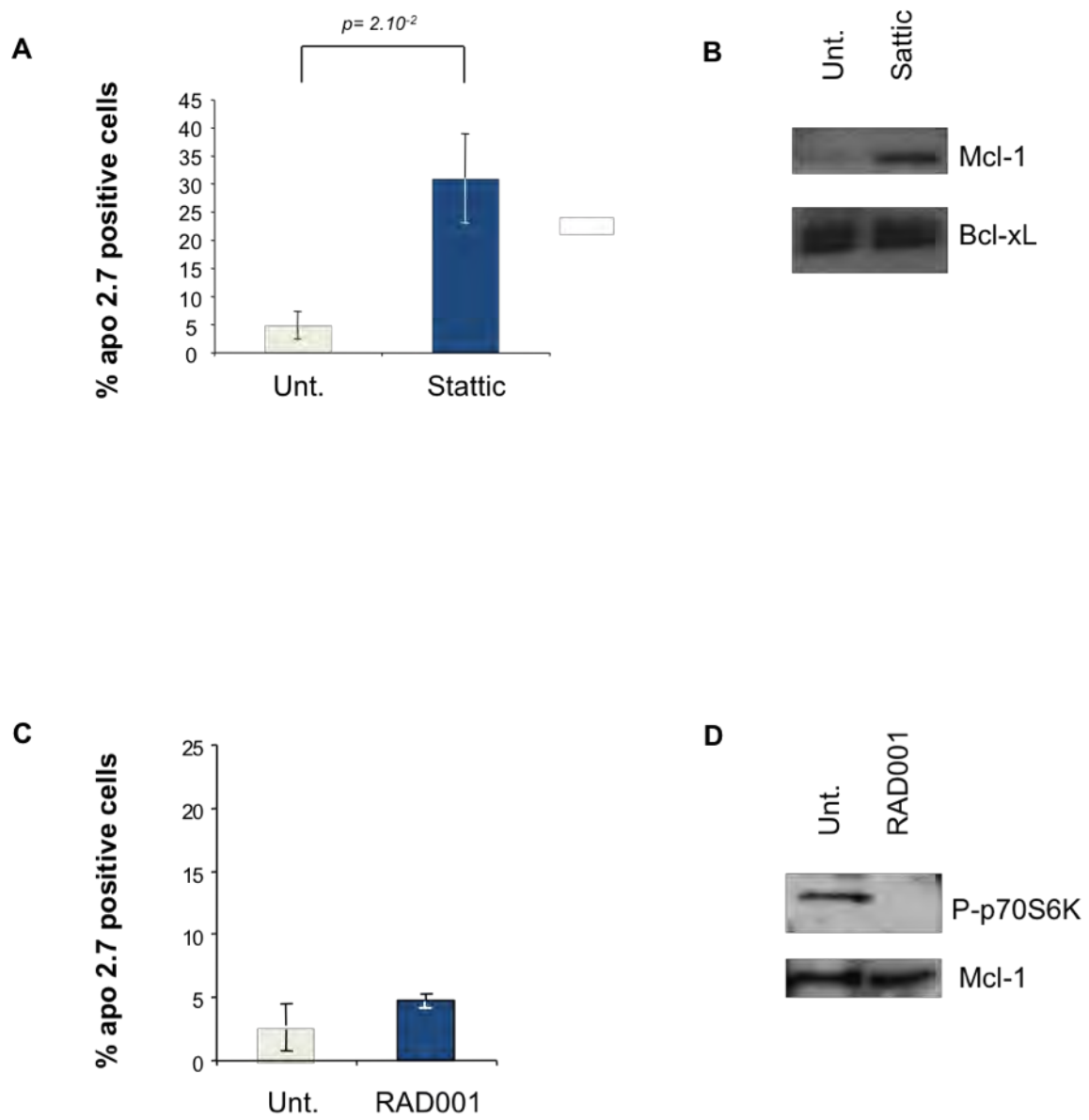


Figure 3 Campone et al.

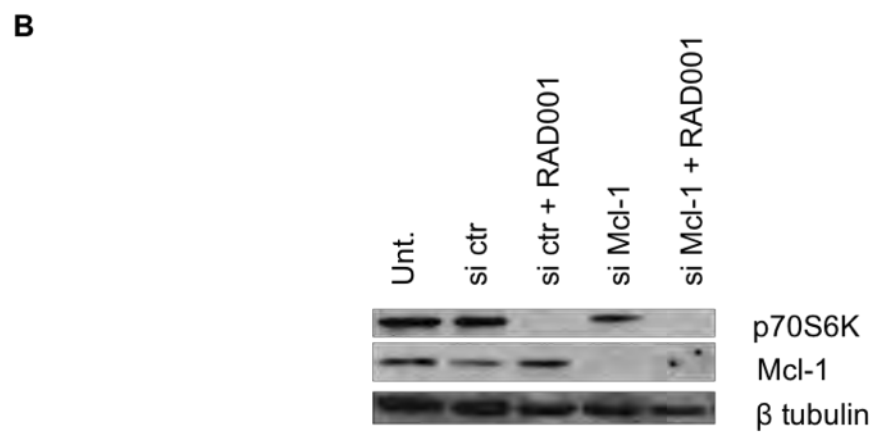
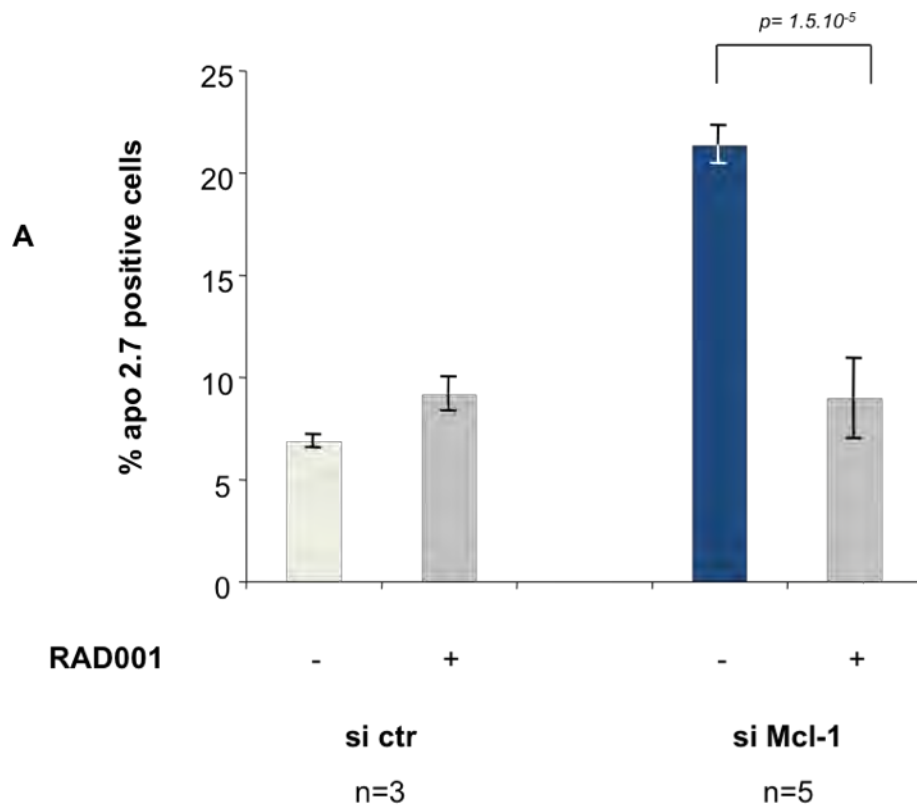


Figure 4 Campone et al.

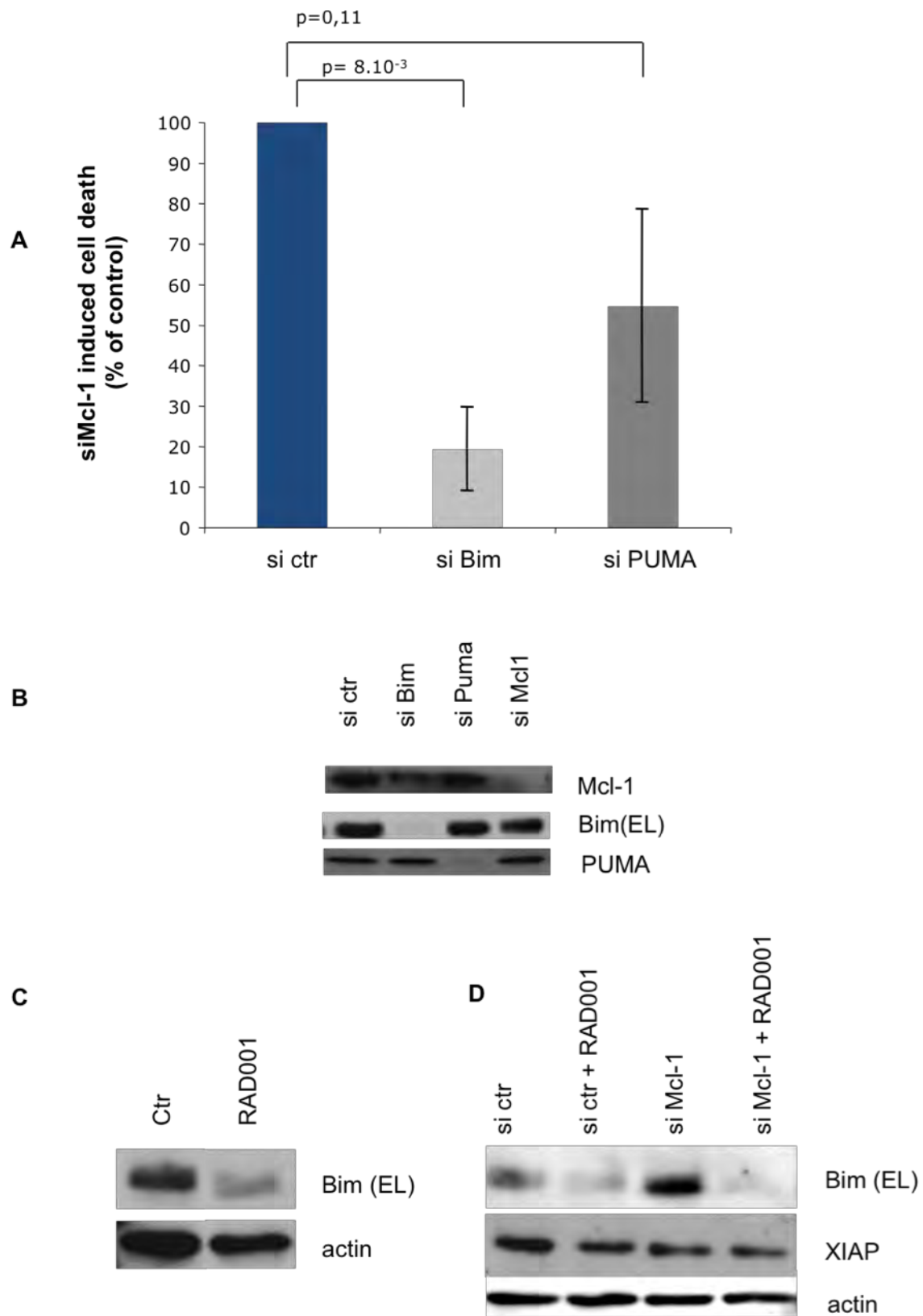


Figure 5 Campone et al.

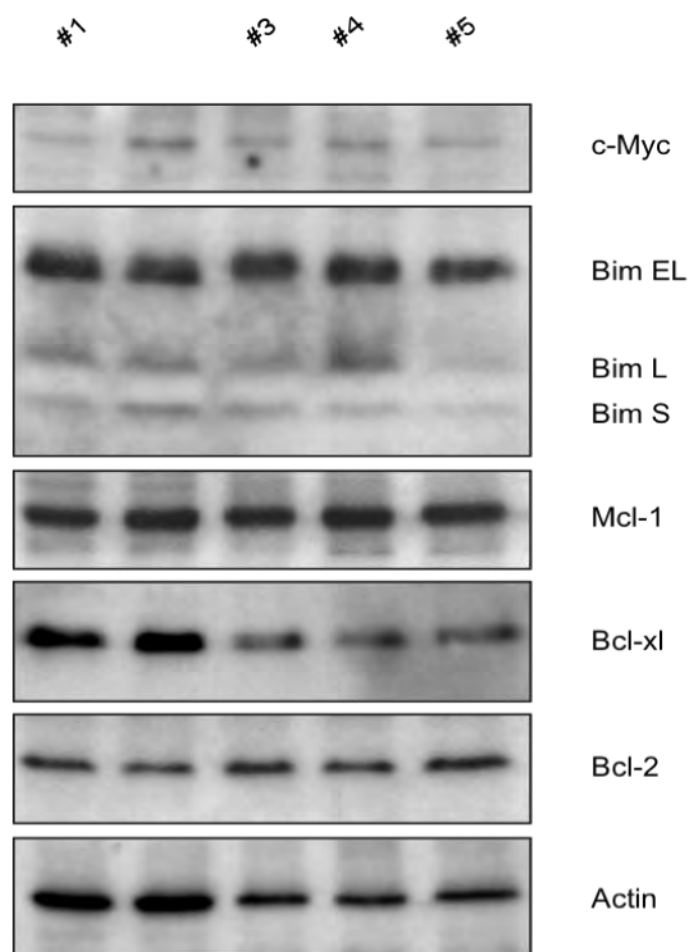


Figure 6 Campone et al.

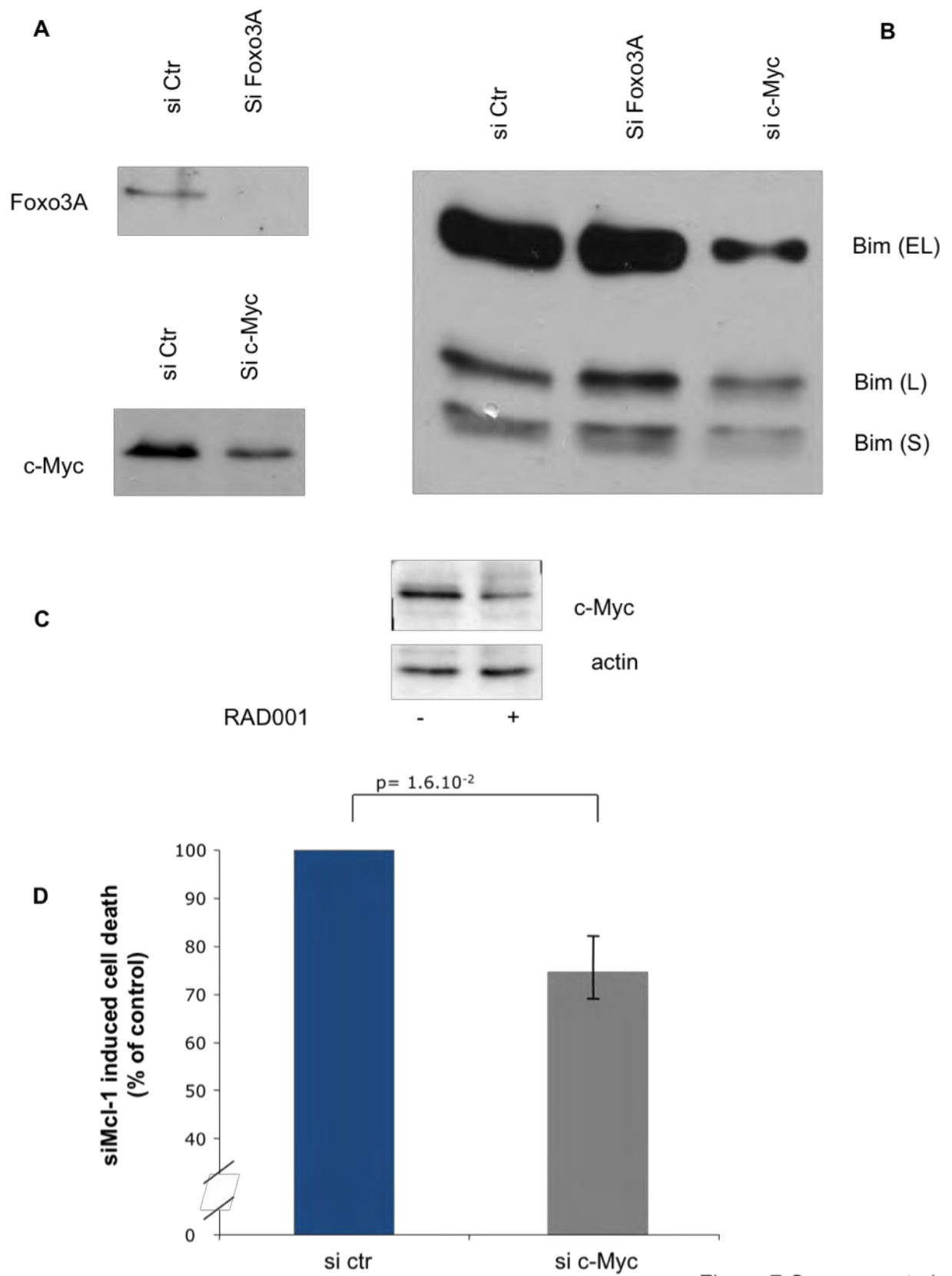


Figure 7 Campone et al.

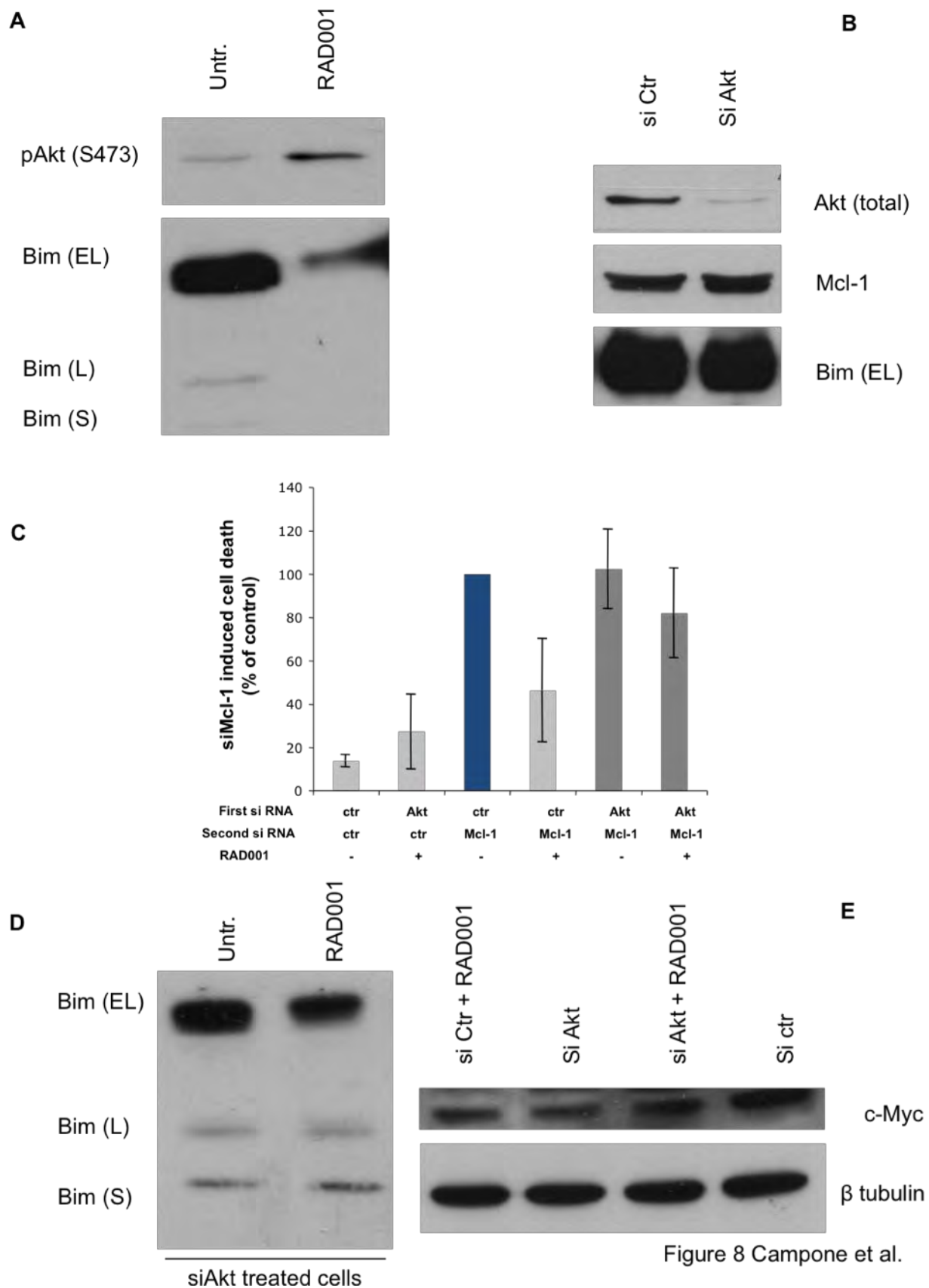


Figure 8 Campone et al.

probe	gene	pvalue	enrichment HER2+	size	size HER2-	size HER2+
P_1861_at	BAD	0,0294	-	211	170	41
P_203728_at	BAK1	ns	ns	211	170	41
P_208478_s_at	BAX	ns	ns	211	170	41
P_211833_s_at	BAX	ns	ns	211	170	41
P_211692_s_at	BBC3	ns	ns	211	170	41
P_203685_at	BCL2	< 0.0001	-	211	170	41
P_207004_at	BCL2	0,0157	-	211	170	41
P_207005_s_at	BCL2	0,0311	-	211	170	41
P_203684_s_at	BCL2	ns	ns	211	170	41
P_205681_at	BCL2A1	ns	ns	211	170	41
P_212312_at	BCL2L1	0,0054	+	211	170	41
P_206665_s_at	BCL2L1	ns	ns	211	170	41
P_215037_s_at	BCL2L1	ns	ns	211	170	41
P_221320_at	BCL2L10	ns	ns	211	170	41
P_222343_at	BCL2L11	0,0061	+	211	170	41
P_208536_s_at	BCL2L11	ns	ns	211	170	41
P_217955_at	BCL2L13	ns	ns	211	170	41
P_221241_s_at	BCL2L14	ns	ns	211	170	41
P_209311_at	BCL2L2	ns	ns	211	170	41
P_211725_s_at	BID	0,0086	+	211	170	41
P_204493_at	BID	ns	ns	211	170	41
P_205780_at	BIK	0,0116	+	211	170	41
P_221454_at	BOK	ns	ns	211	170	41
P_206864_s_at	HRK	ns	ns	211	170	41
P_206865_at	HRK	ns	ns	211	170	41
P_214056_at	MCL1	0,0097	+	211	170	41
P_200796_s_at	MCL1	ns	ns	211	170	41
P_200797_s_at	MCL1	ns	ns	211	170	41
P_200798_x_at	MCL1	ns	ns	211	170	41
P_214057_at	MCL1	ns	ns	211	170	41
P_204285_s_at	PMAIP1	0,0005	-	211	170	41
P_204286_s_at	PMAIP1	< 0.0001	-	211	170	41

Table 1 Campone et al.

Partie II

Introduction

Dans la première partie de notre travail, nous avons établi que les signaux de survie étaient Mcl-1 dépendants pour la lignée cellulaire du cancer du sein BT474. Nous avons observé que le sous- type HER2 présente un possible enrichissement en transcrits Bcl-xL (cf tableau 1 du manuscrit). De plus nous avons observé une additivité d'effets entre l'association de la mise sous silence de Mcl-1 et de l'ABT-737. Ceci suggère que si Mcl-1 joue un rôle majeur dans la survie, Bcl-2 et/ou Bcl-xL y participe également.

En somme nous montrons que le sous-type HER2 dépend pour sa survie des protéines anti-apoptotiques des homologues Bcl-2. Si cela est vrai pour les cancers du sein HER2 amplifiés, qu'en est-il pour les autres sous-types moléculaires et phénotypiques de cancer du sein et notamment le sous-type luminal ?

La question posée alors est de savoir si cette dépendance peut être mise à profit en thérapeutique, notamment par l'emploi de l'ABT-737, qui est un inhibiteur de Bcl-2 et de Bcl-xL.

Nous avons décidé d'aborder cette question de manière méthodologiquement différente de la partie I de notre travail, en utilisant des prélèvements de patientes présentant un cancer du sein et non des lignées cellulaires. Hormis le caractère plus représentatif de ce matériel biologique, ce choix est également mu par les arguments suivants. Il été récemment été montré que certains sous groupes de type luminal du cancer du sein (Gaza et al.) ne sont pas représentés par le panel de lignées de cancer du sein disponible dans les laboratoires. Réciproquement certaines de ces lignées ne correspondent pas absolument à un sous-type précis, suggérant qu'il y a eu au cours de l'immortalisation et du maintien en culture de ces lignées (pour la plupart émanant d'effusions pleurales qui plus est, et non de la tumeur primaire) une dérive démontrée par l'expression moléculaire.

Ces études ne prennent pas non plus en compte les interactions dynamiques entre les cellules tumorales épithéliales et leur microenvironnement, incluant les cellules stromales et la matrice extracellulaire.

Une des approches pertinentes est l'approche des xénogreffes. L'équipe de Decaudin (Marangoni et al. 2009) utilise une banque de tumeurs mammaires humaines maintenue en xénogreffe hétérotopique (SC) sur des souris immunodéficientes.

Il évalue la réponse au traitement par le suivi de la taille tumorale lors des traitements à potentiels antitumoraux administrés à la souris porteuse. Ce test permet l'évaluation préclinique de l'efficacité d'une drogue anticancéreuse.

La xénogreffe est toutefois longue à mettre en place et donne une information sur la tumeur de départ trop tardive pour bénéficier au donneur *stricto sensu* (elle ne bénéficie qu'aux suivants).

De plus, la procédure de xénogreffe peut induire une sélection clonale (Ding et al. 2010). De manière générale, un traitement efficace sur modèles de xénogreffes n'est pas automatiquement efficace en clinique. L'issue de ce type d'expériences dépend de plusieurs variables, comme le site d'implantation, les propriétés de croissance de la xénogreffe, la taille de la tumeur quand le traitement expérimental est initié, etc... (Jo et al. 2009).

Il semble, enfin que seuls certains sous-types de cancer du sein puissent être manipulés de cette manière, ce qui ne rend compte que d'une fraction des cancers du sein accessibles par cette approche. Cette banque de tumeurs ne contient quasiment pas de tumeur de type luminal.

Si ceci souligne l'importance de travailler sur du matériel humain, notamment si le sujet de l'étude porte sur le sous-type luminal. Il est très rare d'avoir accès à des échantillons tumoraux au cours du traitement.

À l'opposé, l'évaluation mécanistique et la validation d'un traitement anti-cancéreux chez des patients présentant une tumeur est problématique en raison de l'accès limité ou insuffisant au matériel tumoral, la diversité de la maladie, et un défaut d'information sur les caractéristiques moléculaires de la tumeur. Soulignons à nouveau que l'évaluation de « surrogate markers » comme indicateur de validation mécanistique, une alternative courante, n'est pas idéale car il n'est pas clair que les tissus normaux reflètent les propriétés des tumeurs souvent dérivées de types de tissus complètement différents. Trouver des moyens permettant de combler l'écart entre les études précliniques et les cancers humains est un des enjeux majeurs de la recherche contre le cancer.

C'est pour toutes ces raisons que nous avons développé un système d'étude d'échantillons tumoraux, *ex-vivo* dont la vocation est de combler ces lacunes. Nous avons appliqué cette méthode au traitement de l'ABT-737 sur différents sous-types de cancers du sein et notamment le sous-type luminal. Cette approche fonctionnelle validera ou pas le fait que la notion de signaux de survie est nécessaire au maintien de certains sous-types de cancers du sein.

Matériel et Méthode

Préparation des prélèvements tumoraux :

Du tissu frais de cancer du sein est obtenu, après signature d'un consentement éclairé et après résection chirurgicale, chez des patientes nouvellement diagnostiquées pour un cancer du sein invasif prise en charge au Centre René Gauducheau (la préparation de tranches de tissus est illustrée à la figure 1).

Les patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante ont été exclues de cette étude. Les prélèvements rapidement obtenus du service d'anatomopathologie sont, avant toute autre manipulation, inclus dans un réactif biocompatible par un protocole mis au point dans notre laboratoire. Les échantillons tumoraux sont directement débités en coupes minces (200 à 300mm d'épaisseur) de 25 mm² de surface environ, à l'aide d'un microtome dédié. Ces coupes minces sont mises en culture dans un milieu optimisé à 37°C, en présence de drogues ou pas.

Après incubation avec diverses drogues, les coupes fines de tumeurs, sont congelées (pour d'éventuelles analyses ultérieures biochimiques ou transcriptomiques, non décrites dans ce travail) ou fixées et transmises au service d'anatomopathologie.

Puis, elles y sont incluses dans la paraffine puis débitées en coupes de 5-6mm, et analysées après coloration HES et immunomarquage par un médecin anatomopathologiste qui évalue le pourcentage de cellules tumorales positives pour chaque immunomarquage. Les échantillons non utilisés sont conservés en bloc de paraffine permettant l'analyse ultérieure d'autres marqueurs. Dans le cadre de notre travail des marqueurs (Ki67) de la prolifération et de l'apoptose (caspase 3 activée) sont étudiés. Le traitement par paclitaxel (700 nM) ou ABT-737 (1 mM) débute après une nuit d'incubation. Après traitement, les différentes tranches sont ensuite soit, immédiatement congelées dans l'azote liquide (pour analyses futures), soit fixées dans le formol.

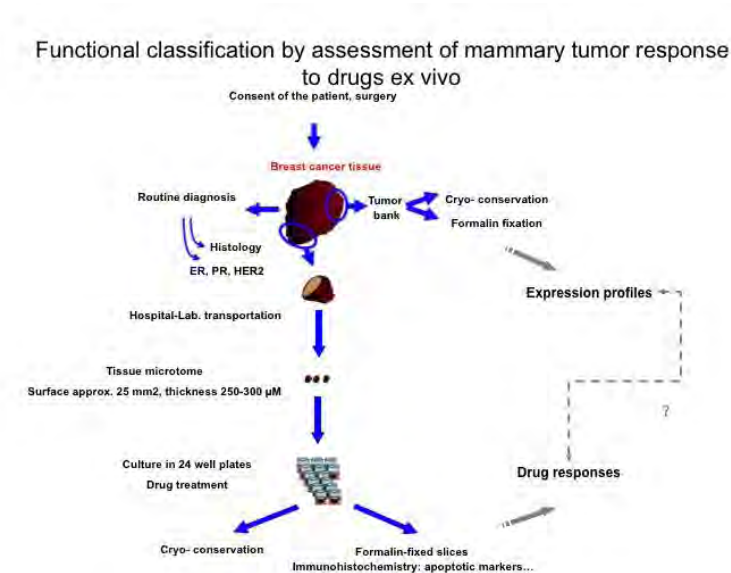


Figure 1 : préparation des prélèvements tumoraux.

Etude Immunohistochimique

Les tranches de tumeurs ont été fixées à J2 et J0 dans du formol tamponné à 4% et incluses en paraffine. Pour l'étude histopathologique, les coupes en paraffine ont été colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES). Un examen histologique des lames HES permettait d'évaluer le taux de nécrose cellulaire. L'étude immunohistochimique a été effectuée à l'aide des anticorps dirigés contre la Caspase 3 active (clone C92-605, dilution 1:1200, BD Pharmingen) et le Ki67 (clone MIB1, dilution 1:150, Dako). Après restauration antigénique par la chaleur (bain-marie, solution de tampon citrate pH6 pour l'anticorps anti-caspase 3 active et solution de tampon EDTA pour l'anticorps anti-Ki67), les lames ont été testées avec le kit Histofine (Histofine SAB-PO kit, MMFrance) dans un automate (Autostainer, Dako) et contre-colorées à l'hématoxyline. Le pourcentage de cellules apoptotiques a été déterminé de façon quantitative en appréciant le nombre de cellules carcinomateuses caspase 3 active positives sur 200 cellules carcinomateuses (au grossissement x 400). L'index de prolifération Ki67 a été déterminé de façon quantitative en appréciant le nombre de cellules carcinomateuses Ki67 positives sur 200 cellules carcinomateuses (au grossissement x 400).

Résultats :

Cette activité s'est déroulée sur 16 mois. Nous avons eu accès à une cinquantaine de tumeurs. Sur la base, de l'étude immunohistochimique de l'expression du KI67, de ER , de PR, et de HER2 sur la tumeur primitive, cette cohorte est constituée de 2 sous-types de HER2, 6 sous-types triples négatifs. Le reste est constitué du sous-type luminal, à parts égales entre le sous-type A et B. Soixante cinq pour cent des ces prélèvements se sont avérés être exploitables. Nous estimons, qu'un échantillon est exploitable si la coloration HES indique une préservation générale de l'organisation tissulaire et si un immunomarquage détectant les cellules tumorales en apoptose d'une coupe non traitée indique un pourcentage de cellules tumorales positives est inférieur ou égal à 15%. Une étude plus détaillée indique que ces chiffres ont évolué au cours du temps. Au cours des 8 derniers mois 77,7% des échantillons étaient exploitables. Nous avons vérifié que les échantillons non exploitables de cette période, dite de routine, correspondent essentiellement à des tumeurs fortement apoptotiques ou nécrotiques au moment du prélèvement et, dans quelques rares cas, à une dégradation de la viabilité lors de la culture.

Concernant les échantillons obtenus au décours de la période dite de routine, nous avons évalué quel était l'impact de la mise en culture de 2 jours *ex-vivo* sur le taux de prolifération des cellules tumorales.

Dans ce but, pour chacune des tumeurs de la figure 2, une première tranche a été fixée directement sur formaldéhyde (J0), une seconde l'a été après deux jours de mise en culture *ex-vivo* en absence de tout autre traitement (J2). Un immunomarquage par le KI 67 a été réalisé et le pourcentage de cellules tumorales pour ce marqueur de prolifération évalué. La figure 2 montre que les échantillons de tumeurs non traités, voient leur taux de prolifération très faiblement, et très peu fréquemment altéré au cours de 2 jours de culture *ex-vivo* (Figure 2). Ceci suggère un maintien des voies qui régulent la prolifération des cellules tumorales.

Nous avons également évalué l'impact de la mise en culture de 2 jour *ex-vivo* sur la survie des cellules tumorales.

Pour chacune des tumeurs de la figure 3, une première tranche a été fixée directement sur formaldéhyde (J0), une seconde l'a été après deux jours de mise en culture *ex-vivo* comme décrit plus haut (J2). Un immunomarquage par un anticorps reconnaissant la caspase 3 active a été réalisé et le pourcentage de cellules tumorales pour ce marqueur d'apoptose évalué.

Nous n'avons pas observé de différence majeure entre l'apoptose spontanée présente à T0 et celle détectée à 48h, indiquant que la mise en culture permet le maintien de la viabilité cellulaire de façon satisfaisante.

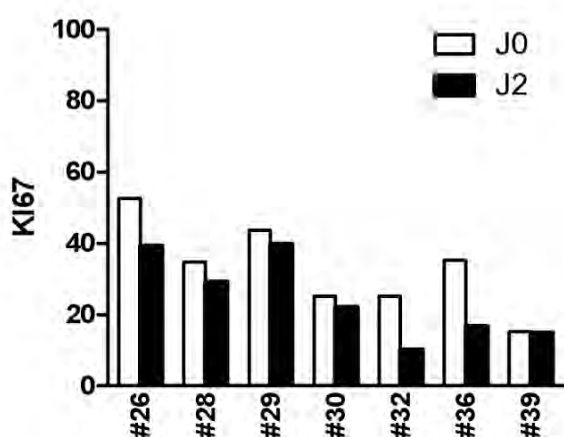


Figure 2 : Etude de la variation du KI67 après 48h de culture.

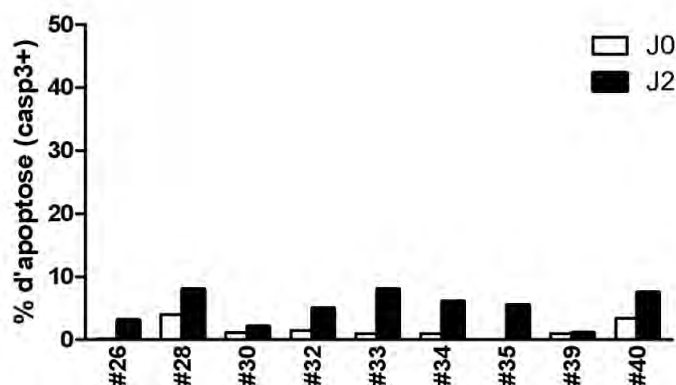


Figure 3- Etude de la viabilité cellulaire à J0 et J2 après 48h de culture.

L'absence d'apoptose dans les conditions de contrôle nous a permis d'étudier la réponse apoptotique à une drogue de référence des différentes tumeurs au paclitaxel (figure 4).

La figure 4 indique qu'une réponse apoptotique au paclitaxel peut être détectée dans certaines tumeurs, alors que d'autres tumeurs (n°35, n° 39) ne répondent pas au même traitement.

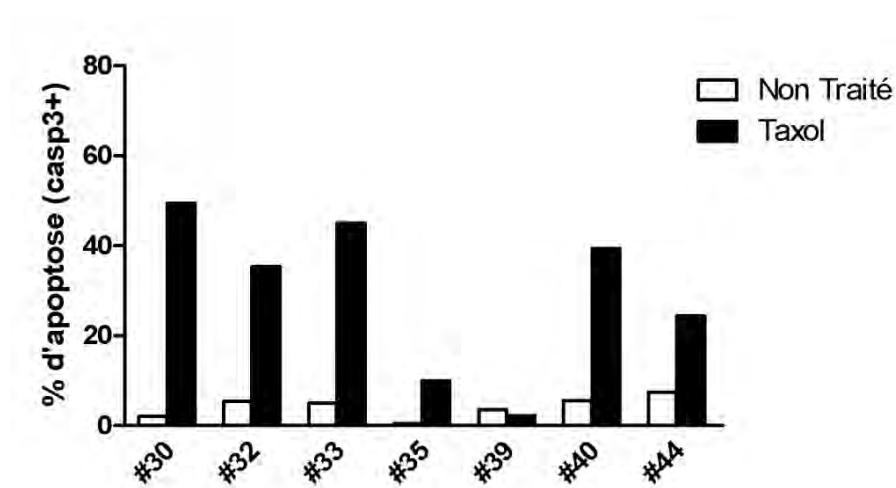


Figure 4 : Analyse de l'apoptose à 48h de tranches traitées ou non au paclitaxel

Ayant établi que cette approche maintient la viabilité et détecte une réponse apoptotique, nous l'avons appliquée au traitement par l'ABT-737. La figure 5 représente le pourcentage de cellules tumorales positives pour la caspase 3 active après exposition pendant 48 H à 1 mM de l'ABT-737 auquel a été soustrait le pourcentage de cellules tumorales positives pour la caspase 3 active non traitées (NT ; jamais supérieur à 15%).

Ces résultats montrent que l'ABT-737, sur 16 prélèvements, induit une apoptose massive dans certaines tumeurs et n'a quasiment pas d'effet dans d'autres (Fig. 5).

Les différences de réponses sont-elles associées à un sous-type phénotypique particulier ?

Sur la figure 5, l'expression de ER et PR est précisée. Il apparaît qu'une tumeur triple négative a répondu alors qu'une autre non ; c'est également le cas pour une tumeur ER+/PR- (un répondeur et un non répondeur). Le reste des tumeurs ER+/PR+ présentent, elles aussi, des réponses variables.

Pour évaluer plus avant s'il existe une différence de réponse entre le sous-type luminal A (tumeur peu proliférante) et B (tumeur proliférante), nous avons recherché une relation entre la réponse à l'ABT-737 et le pourcentage du KI67 de la tumeur initiale.

Parmi 8 tumeurs de type luminal, la figure 6, suggère qu'il existe une réponse positive entre le taux de prolifération et l'intensité de la réponse à l'ABT-737. Cette relation n'est toutefois pas statistiquement significative.

Au regard des données obtenues nous pouvons faire deux conclusions.

La première conclusion est que le petit nombre d'échantillons nous ne permet pas de définir que le sous-type luminal B répond mieux que le sous-type A à l'ABT-737. Mais néanmoins il indique que certaines tumeurs lumineuses B répondent. Ceci suggère que l'ABT-737 peut avoir un impact thérapeutique dans le sous-type luminal B et triple négatif.

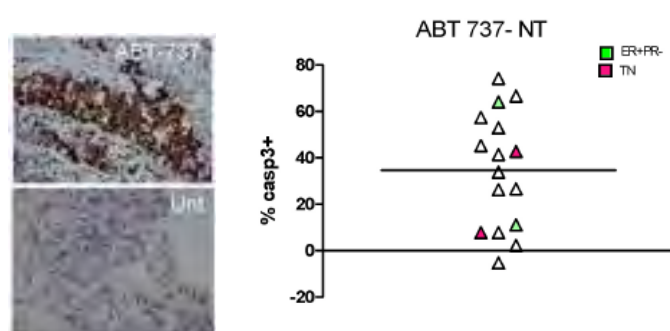


Figure 5

Gauche : Exemple d'un marquage de la caspase 3 active sur coupes en HIC.

Droite : Réponse apoptotique de tumeurs humaines mammaires *ex-vivo* à un inhibiteur l'ABT-737.

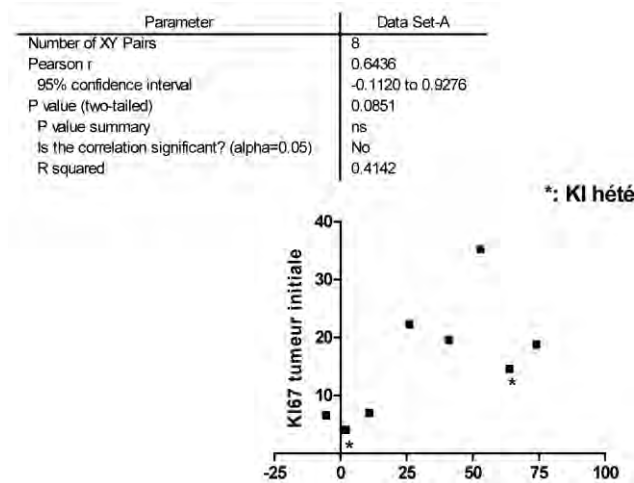


Figure 6 : Réponse apoptotique de tumeurs humaines mammaires luminales *ex vivo* à un inhibiteur l'ABT- 737.

Conclusion :

Cette approche met en évidence l'efficacité d'approches thérapeutiques originales qui prennent pour cible des événements non-oncogéniques de survie cellulaire, plus précisément les homologues de Bcl-2 (*Non Oncogene Targeting*, NOT).

Des inhibiteurs de Bcl-2/Bcl-xL comme l'ABT-737 ne sont pas à notre connaissance en cours de développement clinique dans le cancer du sein, mais les données mentionnées dans la première partie de nos résultats montrent qu'elles pourraient être à la base d'une approche NOT efficace dans certaines tumeurs mammaires.

Nous avons constaté que certains sous-types répondent et d'autres pas. Il conviendrait de déterminer les facteurs prédictifs de réponse et de résistance.

Comment aborder cette question ?

Nous proposons de faire l'étude du profilage moléculaire des tumeurs pour lesquelles la réponse à cet inhibiteur (en terme de prolifération et d'apoptose, évaluée par immunomarquage) aura été déterminée. Nous évaluerons à partir de ce profil moléculaire le statut d'activation des voies prises pour cible par un algorithme publié (Bild et al. 2009). Nous étudierons s'il existe bel et bien une corrélation entre le statut d'activation et la réponse tumorale à cet inhibiteur.

Dans tous les cas, nous identifierons également, indépendamment de signatures d'activité préétablies, les gènes dont l'expression discrimine statistiquement les tumeurs répondeuses de celles qui ne répondent pas (signature de sensibilité). A partir de ces données moléculaires, nous tenterons d'identifier des immuno-marqueurs de sensibilité à l'ABT-737, de manière rétrospective sur les prélèvements de grande taille et à partir d'une étude *ex-vivo* sur biopsies.

Les perspectives biologiques, cliniques, attenantes à cette technologie sont nombreuses et elle est applicable à tout inhibiteur des voies oncogéniques.

Cependant cette technique que nous avons développée ne nous permet pas encore de cibler l'ensemble des patientes pour deux raisons principales. La première est que de nombreuses tumeurs, diagnostiquées précocément, sont de petite taille et que les échantillons disponibles sont entièrement utilisés pour l'analyse anatomopathologique. La seconde concerne les patientes pour lesquelles une chimiothérapie néoadjuvante est prescrite, induisant une réduction de la masse tumorale ainsi qu'une diminution drastique de la viabilité cellulaire (apoptose ou nécrose) ne permettant pas une mise en culture de la tumeur. Ceci nécessite d'avoir accès à la tumeur avant le début du traitement.

Travailler sur des tumeurs non traitées est également important pour travailler sur du matériel cancéreux dont la biologie n'a pas été modifiée par des traitements variables d'une patiente à l'autre. Si les échantillons préservent leur dépendance en certaines voies de signalisation, nous pourrons alors étudier l'inhibition de ces voies qui dominent dans une tumeur donnée.

La réponse tumorale évaluée *ex-vivo* reflète-t-elle la réponse *in vivo* ?

Pour aborder cette question, nous intégrerons nos tests fonctionnels sur biopsies à une approche clinique pré-opératoire d'hormonothérapie qui a pour but de prédire son efficacité (figure 7). Cette approche, réalisée au CRLCC dans le cadre d'un PHRC (Dr M Campone) est conçue pour déterminer le taux de réponse biologique après 2 semaines et 6 semaines d'un traitement pré-opératoire par tamoxifène chez des patientes présentant un cancer du sein non métastatique exprimant ER.

Les résultats d'une équipe anglaise ont démontré qu'une variation de la prolifération tumorale (évaluée par Ki67) deux semaines après traitement pré-opératoire par hormonothérapie prédit une amélioration de la survie sans récurrence (Dowsett et al. 2007).

Discussion générale

Des données expérimentales, modèles de souris transgéniques et de cultures cellulaires, démontrent, que malgré le nombre important d'anomalies génétiques cumulées au niveau de la cellule tumorale, il suffit de reverser une seule de ces anomalies oncogénique, pour inhiber la prolifération et favoriser la mort cellulaire par apoptose de ces cellules.

Cette dépendance à une voie oncogénique dominante introduit la notion « d'oncogène addiction » (Weinstein 2002). L'activation de cette voie oncogénique dominante va induire des signaux antagonistes, de mort, de survie, de prolifération et d'arrêt cellulaire. Seuls les signaux de prolifération et de survie cellulaire seront prépondérants. Cette voie va induire par conséquent une addiction à des processus « non-oncogéniques » de survie cellulaire (Luo, Solimini, et Elledge 2009).

Cette fragilité est mise à profit en clinique par le développement d'agents thérapeutiques (inhibiteurs de kinase) qui vont inhiber cette voie oncogénique « addictive ». Ces thérapies vont induire un « choc oncogénique » (Sharma et al. 2006). L'induction de ce choc, qui est dynamique au cours du temps, va provoquer un déséquilibre de signaux qui, cette fois ci, se fera en faveur des signaux d'arrêt et de mort cellulaire. Une résistance peut avoir lieu si cette inhibition ne préserve pas les signaux de suppression tumorale ou d'arrêt de prolifération.

La conséquence directe de ces constations et d'ordre thérapeutique. Pour améliorer l'efficacité de nos thérapeutiques, il devient alors primordial de pouvoir identifier l'ensemble de ces signaux antagonistes, de mort et de survie, mis en jeu lors de l'activation ou bien lors de l'inactivation de cette voie oncogénique dominante.

Nos travaux ont porté sur l'étude de la dépendance aux protéines à mutidomaines anti-apoptotique de la famille Bcl-2 dans différents sous-types phénotypiques de cancer du sein, le sous-type HER2 et luminal.

Nous avons employé deux approches différentes pour déterminer cette dépendance aux signaux antagoniste de mort et de survie cellulaire. Une approche dites fonctionnelle ou *ex-vivo*, à partir d'échantillons de patientes présentant un cancer du sein (luminal) et une approche à partir d'une lignée cellulaire, la lignée BT474 (amplification de HER2).

Ces approches étaient dépendantes d'une part de la fréquence de chaque sous-type de cancer du sein (70% pour le sous-type luminal et 15% pour le sous-type HER2) et des outils moléculaires (siARN) ou thérapeutiques (l'ABT-737) employés pour la régulation de l'expression des protéines de survie et de mort.

Les signaux antagonistes de survie et de mort des tumeurs HER2 :

Nos résultats, sur le sous-type HER2, ont été obtenus à partir de la lignée BT474. Nous avons démontré, par une approche d'ARN interférence, que la mise sous silence de Mcl-1, était suffisante pour induire un signal de survie. La survie de ces cellules est donc Mcl-1 dépendante.

Comment la voie oncogénique dominante HER2 régule-t-elle l'expression de Mcl-1 ?

La régulation de l'expression de Mcl-1 est probablement transcriptionnelle et traductionnelle, comme le démontrent les données de la littérature publiées et nos résultats.

Il est probable que le facteur STAT3 joue un rôle déterminant. Nous avons que STAT-3 régule l'expression des gènes qui interviennent dans la survie tels que la survivine, Bcl-xL et Mcl-1 (Aggarwal et al. 2009). L'activation des récepteurs à tyrosine kinase par les facteurs de croissance induit une activation de STAT3 (Suyun Huang 2007). Yuan et al. (2008) a observé une augmentation de la phosphorylation de STAT3 dans les cellules MCF7 transfectées par HER2. Les travaux de Page et al. (2000) rapportent une activation constitutive de STAT3 dans 30 à 60% des cancers du sein. Les travaux récents rapportés par Gatza et al. (2010) et Bild et al. (2009) définissent une classification transcriptomique basée sur la dysrégulation des voies oncogéniques. Cette classification établit une corrélation entre l'expression de HER2 et STAT3. Nous suspectons que Mcl-1 doit être surexprimé dans ce groupe et qu'il est l'un des éléments fondamentaux de la pathogénie de ce sous groupe.

La deuxième voie de régulation de l'expression de Mcl-1 est possiblement traductionnelle. Nous savons que la demi-vie de la protéine et de son ARNm est très courte (Akgul 2009).

La traduction de Mcl-1 est cap-dépendante et fait donc intervenir le complexe eIF4F qui est constitué, en autres, du facteur d'initiation eIF4E et de la protéine S6 kinase (Graff et al. 2008).

Cette phase d'initiation de la traduction est sous la dépendance de mTORC1.

Après activation par la voie PI3K/Akt, mTORC1 va induire l'activation de eIF4E et de la protéine S6 kinase. Mills et al. (2008) a démontré que l'expression de Mcl-1 est mTORC1 dépendant. Nous pouvions alors supposer que l'inhibition de mTORC1 peut inhiber l'expression du signal de survie Mcl-1.

Nous avons alors utilisé le RAD 001 qui est un dérivé de la rapamycine et qui possède comme propriété pharmacologique d'inhiber l'activité de mTORC1.

Nous avons alors constaté qu'en présence du RAD 001 les cellules de la lignée BT474 cessaient de proliférer, mais sans affecter les signaux de survie et sans perte d'expression de Mcl-1.

La voie oncogénique HER2 régule-t-elle la dépendance Mcl-1 ?

Il est actuellement établi que les protéines à multi-domaines Bax et Bak jouent un rôle déterminant dans la réponse aux signaux pro-apoptotique. Cependant de nombreuses données semblent démontrer le rôle de plus en plus important des protéines BH3 *only*. Ces protéines peuvent interagir et activer les protéines Bax et Bak. Mais elles interagissent aussi, avec les protéines à multi-domaines anti-apoptotiques en inhibant leur fonction. Nous avons démontré que dans les lignées BT474 la co-déplétion de Mcl-1 et de la protéine BH3 *only* Bim, n'augmente pas le nombre de cellules en apoptose. D'après nos données, Mcl-1 inhibe la capacité de Bim d'induire un signal de mort et non l'inverse. Le RAD 001 inhibe les signaux, qu'installe une dépendance à Mcl-1 en inhibant l'expression de Bim.

A ce stade nous pouvons dire que la voie oncogénique HER2 induit des signaux antagonistes de mort Bim dépendants et des signaux de survie Mcl-1 dépendants. Comment mTORC1 régule-t-il l'expression de Bim ? Cette régulation implique les facteurs de transcription c-Myc et la kinase de Akt.

Il a été démontré sur des lignées murines que c-Myc induisait l'expression de Bim. mTORC1 contrôle aussi l'expression de c-Myc. Nous supposons que le RAD 001 inhibe l'expression de Bim car sa transcription est c-Myc dépendante. Pour démontrer notre hypothèse, nous allons conduire des expériences qui vont consister à étudier les niveaux ARM de Bim avant et après traitement par le RAD 001.

Nous envisageons d'étudier si le promoteur de Bim est occupé par c-Myc (étude par méthode de *Chromatin immunoprecipitation*, en collaboration avec O.Coqueret et B.Barret).

Nous avons observé que le RAD 001 augmente l'activité de la kinase Akt dans la lignée BT474. Cette observation est conforme aux données déjà publiées. mTORC1, après son activation, induit une boucle de rétrocontrôle négatif via la protéine S6 kinase (O'Reilly et al. 2006; Carracedo et al. 2008). Par conséquent toute inhibition de mTORC1 induit une perte de cette boucle de rétrocontrôle.

Akt peut-il contrôler le niveau d'expression de Bim ? Nos données démontrent que la mise sous silence de Akt seule n'induit pas de diminution d'expression de Bim mais uniquement en association avec le RAD 001.

Cette diminution de l'expression de Bim n'est pas Foxo3A dépendante. Nous devons poursuivre nos investigations pour savoir si ces modifications sont transcriptionnelles ou post transcriptionnelles. Il a été observé que Akt pouvait induire une dégradation de Bim (Qi, Wildey, et Howe 2006).

En somme nous venons d'observer d'une part que l'activation HER2 (voie oncogénique dominante), induit des signaux antagonistes de mort dépendant de Bim et de survie Mcl-1 dépendants et d'autre part, que l'expression de Bim est sous la dépendance de mTORC1 et c-Myc alors que STAT3 va maintenir l'expression de Mcl-1.

Les conséquences thérapeutiques sont les suivantes. Toute thérapie anti-HER2 pour être efficace doit induire une augmentation de l'expression de Bim et/ou une diminution de l'expression de Mcl-1. Le RAD 001 en monothérapie n'a pas d'indication chez les patientes présentant une amplification de HER2. Il doit être associé de manière systématique à une thérapie anti-HER2. Ceci est lié aux effets anti-apoptotiques décrits ici.

Si la thérapie n'induit pas ces modifications, elle sera considérée comme inefficace. Le rapport Bim/Mcl-1 sera alors le reflet de l'effet biologique thérapeutique. Une approche thérapeutique pertinente est d'inhiber les interactions entre les protéines à domaines BH3 *only* et les protéines à mutidomains anti-apoptotiques pour induire des signaux de mort cellulaire. A l'heure actuelle seul le composé TW37 est capable d'inhiber les interactions entre Mcl-1 et Bim. L'étude de ses effets sur le sous-type HER2 est intéressante.

Les signaux antagonistes de survie et de mort des tumeurs Luminals :

Comme décrit plus haut, l'existence d'une corrélation entre l'efficacité d'un inhibiteur et l'intensité de sa voie oncogénique cible implique que certains oncogènes induisent un «choc» lié à des signaux ambivalents, de survie et de mort (Gerard I Evan 2006). Ainsi avons-nous observé que, dans des cellules tumorales mammaires HER2-amplifiées, l'activité de mTORC1 contribue non seulement à la prolifération, mais aussi à l'expression de la protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2, Bim. Certaines cellules tumorales mammaires peuvent donc abriter des signaux de mort latents, et par conséquent, dépendre d'un nombre restreint de signaux de survie, qui contrecarrent les premiers, pour leur maintien. Les cancers du sein sont susceptibles de présenter une hétérogénéité dans la nature, l'identité ou l'existence même de ces signaux de survie nécessaires à leur progression, et on ne peut savoir, à l'heure actuelle, dans quelle mesure les classifications en sous-types intrinsèques et/ou par voies oncogéniques secondaires rendent compte de ce degré supplémentaire de diversité.

La deuxième partie de nos travaux s'inscrit dans ce cadre. Elle a pour but de valider la notion que des signaux de survie sont nécessaires au maintien de certains sous-types de cancers du sein.

Elle met en évidence l'efficacité d'approches thérapeutiques originales qui prennent pour cible des événements non-oncogéniques de survie cellulaire (NOT). Elle intègre la notion d'hétérogénéité des tumeurs en termes de voies de survie.

L'approche NOT proposée découle du fait que la plupart des signaux de mort qu'induisent les oncogènes convergent vers la voie mitochondriale de l'apoptose. Cette voie est sous le contrôle des protéines de la famille de Bcl-2.

Nous savons que cette famille est constituée de membres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1,...) qui s'opposent à l'action des protéines pro-apoptotiques de la même famille, les multidomains, comme Bax et Bak, ayant en commun avec Bcl-2 trois domaines d'homologie, (BH1, 2 et 3) et les BH3 *only* (Bim, Puma, Noxa, Bad,...), ne possédant que le domaine BH3 et qui agissent en amont de Bax/Bak.

Des données préalables, obtenues par notre équipe ont établi que la fonction de survie des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 repose sur leur capacité à interagir physiquement avec leurs contreparties apoptotiques (Cartron et al. 2004 ;Manero et al. 2006). Gallenne et al. (2009) a identifié un des mécanismes moléculaires que cette fonction de survie doit contrecarrer pour maintenir la viabilité de certaines cellules cancéreuses. Ce travail donne corps à la notion que certaines cellules tumorales puissent dépendre de protéines de la famille de Bcl-2 pour leur survie. Des inhibiteurs de Bcl-2/Bcl-xL comme l'ABT-737 ou des inhibiteurs, à spectre plus large, de Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 comme l'Obatoclax ont été caractérisés. Il n'y a pas, à notre connaissance de développement clinique en cours pour ces molécules dans le cancer du sein, mais les données mentionnées plus haut suggèrent qu'elles pourraient être à la base d'une approche NOT efficace dans certaines tumeurs mammaires. L'utilisation de tests ex vivo associés au profilage moléculaire permettra de définir des marqueurs prédictifs de la réponse des tumeurs mammaires à ces inhibiteurs.

Cette approche *ex-vivo* est fondée sur l'utilisation de prélèvements frais de tumeurs mammaires effectués au CRLCC de Nantes (Centre René Gauducheau), chez des patientes pour lesquelles un consentement éclairé est signé et non traité au préalable par un traitement systémique (chimiothérapie, thérapie ciblée).

Ils sont inclus dans la paraffine, débités en coupes de 5-6mm, et analysés après coloration HES et immunomarquage. Un médecin anatomopathologiste évalue le pourcentage de cellules tumorales positives pour chaque immunomarquage. Dans le cadre de notre étude, des marqueurs de prolifération (Ki67) et d'apoptose (caspase 3 active) sont employés.

Nos résultats concernant l'activation de la caspase 3 par l'ABT-737 sur 18 prélèvements de grande taille montrent que cette molécule induit une apoptose massive dans certaines tumeurs et n'a quasiment pas d'effet dans d'autres. Les différences de sensibilité ne semblent pas s'associer à un sous-type particulier. Mais nos données suggèrent que le sous-type luminal B, par rapport au sous-type luminal A, répond à l'ABT-737. Il convient de déterminer les marqueurs de sensibilité et de résistance à l'ABT-737.

La réponse tumorale évaluée *ex-vivo* reflète-t-elle la réponse *in vivo* ? Pour aborder cette question, nous intégrerons nos tests fonctionnels sur biopsies à une approche clinique pré-opératoire de thérapie ciblée (hormonothérapie, anti-HER2, anti-PARP) qui a pour but de prédire son efficacité.

Perspectives

La classification moléculaire des tumeurs mammaires a prouvé son importance pour le développement de traitements personnalisés des cancers du sein. Elle y contribuera encore davantage quand elle permettra l'identification non seulement des voies de signalisation qui dominent dans une tumeur donnée, mais aussi des faiblesses possiblement associées à ces dominances. Notre approche participe et participera à ce développement et nous étudierons dans quelle mesure des inhibiteurs fonctionnels des protéines de la famille de Bcl-2 seront utiles pour le traitement du cancer du sein en définissant des indicateurs moléculaires, des contextes et conditions dans lesquels ils seront les plus efficaces. Ceci permettra la proposition d'essais cliniques employant ce type de molécules. La mise en évidence, dans des échantillons de tumeurs mammaires, de mécanismes inédits de résistance aux effets apoptotiques de ces molécules, ou d'autres molécules ciblées, alimentera en même temps notre recherche d'amont qui porte sur les mécanismes d'addictions oncogéniques et non oncogéniques des tumeurs mammaires, en identifiant des mécanismes d'échappement à ces dépendances. La systématisation de l'utilisation d'échantillons cliniques dans des tests fonctionnels, capables de donner une indication rapide de réponse tumorale qui est un des objectifs de ce projet de recherche de transfert.

Cette approche est susceptible de donner des informations *a posteriori* sur la biologie de la tumeur qui permettent de choisir l'option qui corresponde le mieux aux patientes, même dans des conditions où les connaissances *a priori* sur les caractéristiques moléculaires de la tumeur, voire les effets biologiques d'un agent thérapeutique, sont limitées au moment du choix thérapeutique.

ANNEXES

Prediction of metastatic relapse in node-positive breast cancer: establishment of a clinicogenomic model after FEC100 adjuvant regimen

Mario Campone · Loïc Campion · Henry Roché · Wilfried Gouraud · Catherine Charbonnel · Florence Magrangeas · Stéphane Minvielle · Jean Genève · Anne-Laure Martin · Régis Bataille · Pascal Jézéquel

Received: 14 June 2007 / Accepted: 26 June 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract Breast cancer is a very heterogeneous disease, and markers for disease subtypes and therapy response remain poorly defined. For that reason, we employed a retrospective study in node-positive breast cancer to identify molecular signatures of gene expression correlating with metastatic free survival. Patients were primarily

included in FEC100 (5-fluorouracil 500 mg/m², epirubicin 100 mg/m² and cyclophosphamide 500 mg/m²) arms of two multicentric prospective adjuvant clinical trials (PACS01 and PEGASE01—FNCLCC cooperative group). Data from nylon microarrays containing 8,032 cDNA unique sequences, representing 5,776 distinct genes, have been used to develop a predictive model for treatment outcome. We obtained the gene expression profiles for 150 of these patients, and used stringent univariate selection techniques based on Cox regression combined with principal component analysis to identify a genomic signature of metastatic relapse after adjuvant FEC100 regimen. Most of the 14 selected genes have a clear role in breast cancer, carcinogenesis or chemotherapy resistance. Six genes have been previously described in other genomic studies (*UBE2C*, *CENPF*, *C16orf61* [*DC13*], *STMN1*, *CCT5* and *BCL2A1*). Furthermore, we showed the interest of combining transcriptomic data with clinical data into a clinicogenomic model for patients subtyping. The described model adds predictive accuracy to that provided by the well-established Nottingham prognostic index or by our genomic signature alone.

M. Campone
Service d'Oncologie Médicale, Centre de Lutte Contre le Cancer René Gauducheau, Bd J. Monod, 44805 Nantes—Saint Herblain Cedex, France

L. Campion · W. Gouraud · C. Charbonnel
Unité de Biostatistique, Centre de Lutte Contre le Cancer René Gauducheau, Bd J. Monod, 44805 Nantes—Saint Herblain Cedex, France

L. Campion · W. Gouraud · C. Charbonnel · F. Magrangeas · S. Minvielle
INSERM U601, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu, 44035 Nantes Cedex, France

H. Roché
Service d'Oncologie Médicale, Institut Claudius Regaud, 20–24 rue du Pont Saint Pierre, 31052 Toulouse Cedex, France

W. Gouraud · C. Charbonnel · F. Magrangeas · S. Minvielle · P. Jézéquel
Unité Mixte de Génomique du Cancer, Hôpital Laennec, Bd J. Monod, 44805 Nantes—Saint Herblain Cedex, France

J. Genève · A.-L. Martin
Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC), 101 rue de Tolbiac, 75654 Paris Cedex 13, France

R. Bataille · P. Jézéquel (✉)
Département de Biologie Oncologique, Centre de Lutte Contre le Cancer René Gauducheau, Bd J. Monod, 44805 Nantes—Saint Herblain Cedex, France
e-mail: p-jezequel@nantes.fnclcc.fr

Keywords Adjuvant chemotherapy · Breast cancer · Clinicogenomic model · FEC100 regimen · Genomic study · PACS01 · PEGASE01

Abbreviations

AIC	Akaike information criterion
CGM	clinicogenomic model
CI	confidence interval
GS	genomic signature
HR	hazard ratio
NPI	Nottingham prognostic index

MFS	metastatic free survival
MR	metastatic relapse
PCA	principal component analysis
SBR	Scarff–Bloom–Richardson

Introduction

Breast cancer is currently considered a hugely heterogeneous disease. It is believed that differences in clinical behavior (prognostic, response to therapy) are due to molecular differences between histological similar tumors. The ability to define tumor subtypes would allow individualization of care. In such a case, chemotherapy regimen would be chosen in respect to tumor aggressiveness and predicted responsiveness. Today, various chemotherapeutic agents, alone or in combination, are still applied empirically to breast cancer patients. The delivering of these drugs is based on results from prospective clinical adjuvant trials proving benefits of new or associations of molecules compared with currently available, and on standard prognostic indexes (National Institute of Health [NIH], St Gallen, Nottingham Prognostic Index [NPI]) [1–3]. Excepted for positive-estrogen receptor (ER) and -HER2 status, which condition targeted therapies (respectively, hormonal therapy and trastuzumab therapy), no predictive biomarker has been shown a sufficient power or predictive value to render it therapeutically useful. So, medical oncologists need new and more powerful tools for selecting breast cancer treatments for individual patients. DNA microarray technology is ideally suited to reveal molecular differences and to the grouping of tumor subtypes, which could be used for the management of patients with breast cancer [4, 5]. In exploratory studies, van't Veer et al. and van de Vijver et al. identified and tested a gene-expression predictor based on a collection of 70 genes, which showed some promise as breast cancer prognostic tool [6, 7]. Furthermore, in few studies, microarrays have been used to identify expression patterns capable of predicting response after specific adjuvant treatment for patients with primary breast cancer [8]. Many studies aimed to identify predictors of response to neoadjuvant chemotherapy [9–14]. Prior to the results of the PACS01 trial, FEC100 (5-fluorouracil 500 mg/m², epirubicin 100 mg/m² and cyclophosphamide 500 mg/m²) regimen was considered for French medical oncologists the standard treatment in adjuvant setting for node-positive breast cancer patients. This regimen is prescribed without any tumor subtyping information [15, 16]. Medical oncologists do not know if the tumor is sensible to this particular systemic drug association, or even if it is necessary to prescribe any chemotherapeutic molecule, in the case of unidentified lower risk patients.

The first goal of our study was to identify a gene-expression signature for the purpose of predicting outcome for node-positive breast cancer patients who received FEC100 regimen. The study retrospectively included 150 patients belonging to the FEC100 arms of two multicentric phase III clinical trials (PACS01 and PEGASE01) conducted by investigators from the French Federation of Cancer Centres (FNCLCC) [17, 18]. We used cDNA nylon microarrays containing 8,032 cDNA unique sequences, representing 5,776 distinct genes, to analyze gene expression profiles of tumor [14, 19]. The second goal of our study, as pointed out and recommended, was to evaluate if the identified genomic signature predicted more accurately than does the combined prognostic index NPI, or added predictive accuracy to that provided by the NPI alone [20, 21]. NPI was chosen in regard of Eden's work [22]. Briefly, our strategy consisted in 3 steps: (1) robust univariate selection of relevant genes, (2) combination of the relevant genes into one genomic signature (GS) by means of principal component analysis (PCA), (3) establishment of a clinicogenomic model (CGM) based on a combination of the GS and the NPI. To avoid overfitting, frequently pointed out in genomic studies, robust internal validation based on resampling and permutation was performed. Kaplan–Meier curves and logrank tests were computed to assess the CGM performance.

Materials and methods

Patients

One hundred and fifty women who had unilateral breast cancer, showed no evidence of metastasis, were node-positive, younger than 65 years of age, and treated by FEC100, were enrolled on this retrospective study. These patients were primarily included in the FEC100 arms of two multicentric phase III clinical trials (PACS01 [*n* = 128] and PEGASE01 [*n* = 22]) conducted by investigators from the Federation Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (FNCLCC) in France—French Federation of Cancer Centres [17, 18]. After surgery, patients received intravenous adjuvant treatment with 5-fluorouracil 500 mg/m², epirubicin 100 mg/m² and cyclophosphamide 500 mg/m² every 21 days for six (PACS01) or four (PEGASE01) cycles. Only patients whose piece of tumor was stored at −180°C were included in this study. Patients were followed up for metastatic free survival (MFS) (in our study, delimited by the first clinically recognized evidence of distant relapse; local relapses were excluded). After a median follow-up of 5 years (range: 0.9–6.7), the number of relapses was respectively 23 and 9. Clinicopathologic characteristics of the 150 studied patients are detailed in Table 1.

Table 1 Clinicopathologic characteristics of the 150 studied patients

Variable	N
N°	150
Median age at diagnosis (years)	51 [30–64]
Median follow-up (years)	5.0 [0.9–7.5]
Tumor size (mm)	
≤20	44
> 20	101
Not determined	5
Median	25 [10–150]
N° positive lymph nodes	
≤ 3	86
> 3	72
Median	3 [1–34]
Histological type	
Infiltrating ductal carcinoma	114
Infiltrating lobular carcinoma	20
Others	16
SBR histological grade	
I	25
II	64
III	46
Not determined	15
tamoxifen	
Yes	85
No	65
NPI ^a	
1	7
2	76
3	67
Estrogen receptor status	
Negative	25
Positive	115
Not determined	10
Progesterone receptor status	
Negative	39
Positive	101
Not determined	10

Values are median [range]; a: missing values (tumor size and tumor grade) were replaced by median values to calculate NPI

Tumor tissue samples

All tumor tissue samples were surgically collected and processed in two parts by a pathologist: the first part was fixed in 10% neutral buffered formalin for standard histological analysis and immunohistochemistry, and the second part was immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored until RNA extraction.

RNA extraction

All RNA was prepared on the same platform (IPSOGEN, Marseille, France) by the CsCl-cushion, as described [23]. The quality and the quantity of RNA samples were evaluated by Agilent 2100 Bioanalyser RNA LabChip kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Nylon microarray technology

In the present study, we used nylon microarrays manufactured in our lab, which contained 8,032 unique sequenced-verified cDNA clones, representing 5,776 distinct genes, chosen using the expressed sequence tag (EST) database from the NCBI with update Hs#196 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The same microarray tools were used and described in previous works [14, 19]. Microarray characteristics and data have been deposited in the NIH Gene Expression Omnibus (GEO) (accessible through GEO Series accession number: GSE7017) according to Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE7017>).

RNA labeling and microarray hybridization

Five microgram of RNA were labeled by reverse transcription and incorporation of [α -33P]dCTP. Then nylon microarrays were hybridized with the labelled probes as previously described [19].

Data acquisition and pre-processing

DNA microarrays were scanned at 25- μ m resolution using a Fuji BAS 5000 image plate system (Raytest, Paris, France). The hybridization signals were quantified using ArrayGauge software v.1.3 (Fuji Ltd, Tokyo, Japan). For each membrane, the raw data were background noise subtracted (median value of negative controls ± 6 SD), then normalized by global intensity of hybridization. Patient data were adjusted by the amount of PCR product spotted onto the membrane and finally log₂-transformed. Only genes well measured for 70% of patients were retained.

Data analysis

All genomic analyses were performed based on the whole dataset and a rigorous internal validation was performed to prevent overfitting and increase predictive accuracy. This strategy was chosen over the one consisting on splitting the data into one training and one test set in a way to use the data more efficiently. Actually, withholding a substantial

proportion of the samples to use as validation may reduce the prediction's performance [24].

Nottingham prognostic values and classification

NPI, the well-established prognostic index, was chosen as a prognostic reference classification scheme. Since its initial definition by Haybittle et al. in 1982, NPI was slightly modified [1, 25]. In our study, we used the definition according to Galea: $NPI = 0.2 \times \text{size (in cm)} + \text{lymph node stage} + \text{tumor grade}$ [26]. This index allows a separation of patients in subgroups with different prognoses for overall and recurrence-free survival: $NPI < 3.4$, low risk (score = 1); $3.4 \leq NPI \leq 5.4$, intermediate risk (score = 2) and $NPI > 5.4$, high risk (score = 3).

Because of unavailable data (5 tumor sizes and 15 tumor grades), missing values were replaced by median values to calculate NPI; to take into account this lack of information and prevent potential bias, all analyses were performed twice with 'maximal bias method' for these patients: each of these 20 patients was attributed first his minimal NPI, second his maximal NPI and stability of results was verified.

Genomic signature establishment and classification

Before building a GS, the first step was the selection of a reduced number of genes significantly associated with survival. Cox proportional-hazard regression was used to fulfil this task: univariate Cox analyses were conducted on each of the genes which remained after data pre-processing. The final 15-gene-sequence list was set after a double internal validation (resampling and permutation techniques, $P = 0.05$). Resampling was performed as follows: for each resampling loop, 80% of the patients were randomly sorted and analyses were performed based solely on these patients; 1,000 loops were computed. Mean of the 1,000 P -values and frequency of $P < 0.01$ were performed, giving robust results. Permutation was also performed; 10,000 samples ($n = 100\%$ of original data set size) were randomly built as follows: random metastatic relapse (MR) label was attributed to each patient with global respect of the original MR frequency; proportion of samples in which p -value was smaller than in original data set was reported.

PCA was performed to build a GS based on this 15-gene-sequence list with minimum loss of prognostic information. PCA is a multivariate technique, which permits reduction of dimension and detection of linear relationships. The first principal component, the one with the largest variance of any linear combination of these gene-sequences, was kept to summarize the 15 gene-sequence

information. First principal component was then divided into quartiles in order to classify the patients into risk groups (score 1 to 4).

Clinicogenomic model establishment and classification

Once the GS thus established, following needs were to evaluate its performance, to compare its prediction accuracy with the NPI's one, and finally to test whether a CGM, combining both GS and NPI, could perform significantly better than either GS or NPI alone. Independent and complementary predictive value of MFS was verified by Cox multivariate analysis before deciding to combine GS and NPI. To establish the CGM score, NPI and GS scores were added: CGM score = NPI score (1 to 3) + GS score (1 to 4); the risk groups were then defined according to this CGM score: CGM score = 2 or 3: low-risk group, CGM score = 4 to 6: intermediate-risk group, and CGM score = 7: high-risk group.

Nottingham prognostic index, genomic signature and clinicogenomic model classification comparisons

Akaike information criterion (AIC) was used for comparison of the different predictors' performances. AIC is a measure of goodness-of-fit, which permits to compare performance of non-nested models: $AIC = -2\ln(L) + 2k$, where L is the model likelihood function and k is the model parameters' number; thus, the lower the AIC, the better the model. The 3 classifications resulting from each model were also carefully studied. More specifically, the interest was focused on the MFS in the highest and in the lowest group of patients.

Furthermore, the distribution of MR frequency according to CGM score was taken into consideration: 1,000 training-validation pairs (80–20% of original data set) were randomly built and then each patient of the validation samples was classified by means of the CGM score calculated from the corresponding training sample; results stability was verified: averaging of MR frequency in validation samples was given with 99% confidence interval.

In addition to their chemotherapy treatment, patients with positive hormonal receptors were also given tamoxifen. As the presence or absence of tamoxifen treatment was significantly related to MFS ($P = 0.002$), it was used as stratification variable in all multivariate analyses.

All analyses were performed with SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC) and BRB ArrayTools developed by Dr. R. Simon and A. Peng (Bethesda, MD; 2003. <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>).

Results

Data analysis

Nottingham prognostic index classification

In the studied patients, there was evidence that most of classical prognostic factors (tumoral size, number of positive lymph nodes, SBR staging, ER and progesterone receptor [PR] status, and the combined index: NPI) were significantly related to MFS (Table 2). Furthermore, out of all these factors, NPI was the best-related to MFS and no other clinical or biological factor added independent statistical information. Hence NPI was the parameter retained to summarize patients' outcome clinical information. NPI Kaplan–Meier curves are displayed in Fig. 1A.

Genomic signature classification

After robust univariate analyses based on resampling ($n = 1,000$) and permutation techniques ($n = 10,000$), of the 2,902 genes, which remained after data preprocessing, 15 gene-sequences were kept (Table 3). Information contained in those 15 gene-sequences was then focused into one component by means of PCA. Eventually, this component was divided into quartiles to build a GS capable of classifying patients according to their risk of MFS. Two distinct cDNA sequences with high discriminating power based on resampling and permutation belonged to the same gene: *UBE2C* (*Ubch10*). As expected, the two sequences were highly correlated (Pearson coefficient = 0.81, $P < 0.0001$). These facts reinforced the robustness of this gene

in our study. The GS permitted to separate patients in significantly different groups (GS, AIC = 285.5, $P = 1 \times 10^{-7}$) (Table 4). GS Kaplan–Meier curves are displayed in Fig. 1B.

Clinicogenomic model classification

The results of Cox multivariate analysis showed that GS ($P = 0.0006$) and NPI ($P = 0.0107$) carried independent and complementary information to predict MFS (Table 2). Hence it was pertinent to combine both GS and NPI to obtain a new, potentially more powerful, predictive tool. The CGM, combining NPI and GS, permitted to classify patients of the original dataset into 3 groups with significantly different MFS; CGM hazard ratio (HR) was quite strong (HR = 6.47, 95% confidence interval [CI] = [3.40–12.31], $P = 9 \times 10^{-12}$). CGM Kaplan–Meier curves are displayed in Fig. 1C. This stratification lead to: a low-risk group (score = 2 or 3) including 21.3% of the patients with a 100% 5-year MFS, an intermediate-risk group (score = 4 to 6) including 60.0% of the patients with a 84% 5-year MFS, and a high-risk group (score = 7) including 18.7% of the patients with a 37% 5-year MFS (Table 4).

Nottingham prognostic index, genomic signature and clinicogenomic model classification comparisons

In original data set, AIC of the 3 classification schemes showed that the classification power of CGM (AIC = 274.6) was better than the GS model's one (AIC = 285.5), which itself was better than NPI's one (AIC = 292.1) to explain the MFS (Table 4). In particular, patients with no

Table 2 Univariate and multivariate survival analysis for classical bioclinical and genomic factors

Variable	Univariate analysis ^a				Multivariate backward analysis ^b		
	AIC	HR	95% HR CI	P	HR	95% HR CI	P
Age < 40 vs. ≥ 40 (years)	310.3	1.50	0.58–3.91	0.403			
Tumoral size > 20 vs. ≤ 20 (mm)	306.8	4.36	1.32–14.40	0.016			
Positive lymph node >3 vs. ≤ 3	298.4	3.78	1.70–8.42	0.001			
SBR grade III vs. I + II	303.5	2.27	1.14–4.55	0.020			
tamoxifen yes vs. no	299.9	0.30	0.14–0.63	0.002			
Histology IDC vs. ILC + others	310.8	0.86	0.40–1.85	0.693			
Estrogen positive vs. Negative	309.1	0.39	0.19–0.83	0.014			
Progesterone positive vs. Negative	308.5	0.44	0.22–0.87	0.019			
NPI: 1 vs. 2 vs. 3	292.1	5.32	2.34–12.10	< 0.0001	3.05	1.30–7.19	0.0107
GS: 1 vs. 2 vs. 3 vs. 4	285.5	2.50	1.67–3.74	< 0.00001	2.06	1.36–3.12	0.0006

IDC: Infiltrating ductal carcinoma; ILC: Infiltrating lobular carcinoma

^a There is evidence that most of classical prognostic factors (tumoral size, number of positive lymph nodes, SBR staging, estrogen and progesterone receptor absence) are significant in our population as NPI

^b Furthermore, prognostic independent information was found only for NPI and 15-gene signature in multivariate backward Cox analysis leading to combine them into a clinicogenomic model: CGM

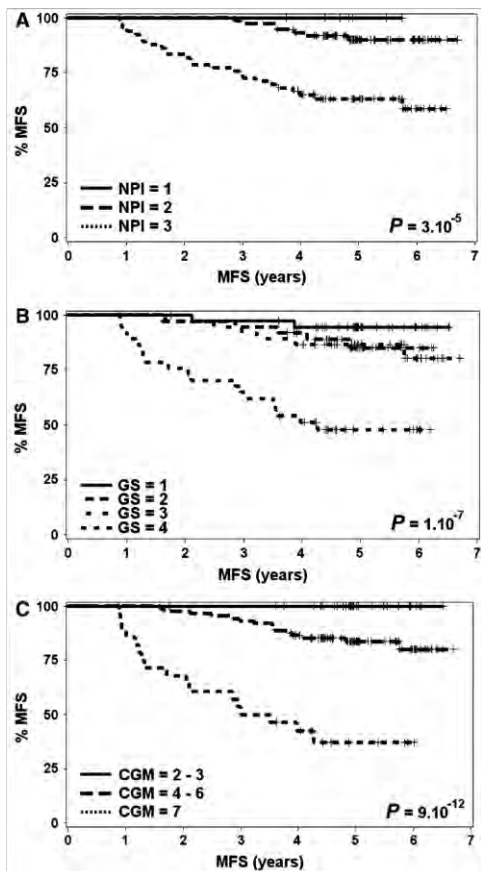


Fig. 1 MFS Kaplan-Meier curves of the groups of patients with a statistically different clinical outcome (logrank test) defined according to: NPI score 1: $n = 7$, 2: $n = 76$, 3: $n = 67$ — $P < 10^{-4}$ (A), GS score 1: $n = 38$, 2: $n = 37$, 3: $n = 38$, 4: $n = 37$ — $P < 10^{-7}$ (B) and CGM score 2–3: (low-risk group) $n = 32$, 4–6 (intermediate-risk group) $n = 90$, 7: (high-risk group) $n = 28$ — $P < 10^{-11}$ (C)

MR were better isolated with CGM than with NPI (21.3% vs. 4.7% of total population) and, in a similar way, high-risk patients were better classified with CGM than with NPI (5-year MFS: 37% vs. 63% for respective high-risk groups) (Table 4).

Based on the resampling analysis ($n = 1,000$), a more specific study of the MR distribution according to classification group was made for the 3 predictors and goodness-of-fit comparison between the 3 predictors was performed. Mean of MR occurrence for validation samples was 0.5% (99% CI = 0–5%), 17% (99% CI = 10–24%) and 61% (99% CI = 41–85%) respectively in low, intermediate and

high-risk groups defined with CGM (Fig. 2). The comparison of the different models (GS, NPI and CGM) by means of AIC resampling calculation showed that the CGM performed better than either NPI (83.2%) or GS model alone (68.4%) to explain MR. Moreover GS model was better than the one with NPI (61.1%).

Molecular biology of the markers

Overall, the genes retained in our 15-gene-sequence classifier are implicated in breast cancer, carcinogenesis or chemotherapy resistance. Briefly, clusters of proliferation, chemoresistance and histone H1 are represented by 12 sequences: respectively 5 (*UBE2C* [two ESTs], *CENPF*, *STMN1*, *GPI*), 4 (*C16orf61* [DC13], *CCT5*, *APRT*, *BCL2A1*) and 3 (*HIST1H1C*, *HIST1H2BK*, *HIST1H2BC*) sequences. *UBE2C*, the most highly ranked gene in our analysis, belongs to the ubiquitin pathway. Our finding is consistent with recent reports, which underlined a strong link between *UBE2C* overexpression and the degree of tumor differentiation in many cancers (breast, lung, ovary, bladder and glioblastomas) [27, 28]. Furthermore, in breast cancer, an increased expression of *UBE2C* was associated with high tumor grade and cancer progression [29]. Rape and Kirschner showed a crucial role for *UBE2C* in the cell cycle [30]. In a previous work, based on proteome screening of breast tumors using SELDI-TOF-MS approach, we already pointed out ubiquitin-proteasome pathway by identifying ubiquitin as a prognostic biomarker for node-negative breast cancer patients [31]. *CENPF* belongs to the family of “chromosome passenger” protein and is a potential target of farnesyl transferase inhibitors [32]. *CENPF* was previously selected in two genomic studies, which aimed to identify prognostic and predictive genes in breast cancer: respectively, 231-gene set [6], 64-gene set [8]. In O’Brien’s reanalysis of the van’t Veer dataset, *CENPF* was among the genes highly associated with poor prognosis, that could be studied at the protein level using tissue microarrays [33]. *STMN1* was previously found to be overexpressed in a subset of human breast carcinomas [34]. Soon after, two studies with complementary results showed that *STMN1* correlated well with general prognostic factors in breast cancer [35, 36]. In 2007, Oishi et al. showed that *STMN1* expression and *STMN1* protein were associated with bad prognosis in node-positive breast cancer patients [37]. *UBE2C*, *CENPF* and *STMN1*, as pointed out by numerous genomic studies, belong to cancer proliferation cluster [38–41]. These genes function in G2/M to mediate processes such as chromosome segregation. Furthermore cell proliferation signature was present in many tumors and has been associated with poor outcome in a subpopulation of breast cancer patients [42, 43]. *C16orf61* [DC13], *CCT5*, and *APRT* have been

Table 3 15-gene-sequence list relevance and characteristics ordered according to resampling and permutation values

Gene symbol	MR ^a	resampling ^b		permutation ^c <i>P</i>	Gene title	GEO ID	
		Mean <i>P</i>	% <i>P</i> < 0.01			UMGC_Probe	GenBank #
<i>UBE2C</i>	+	0.0006	100	0.0002	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	UMGC_02270	AA149943
<i>HIST1H2BK</i>	+	0.0059	99.8	0.0005	Histone 1, H2bk	UMGC_07984	BX090468
<i>STMN1</i>	+	0.0051	100	0.0013	Stathmin 1/oncoprotein 18	UMGC_01066	R15906
<i>UBE2C</i>	+	0.0068	100	0.0014	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	UMGC_06429	N75989
<i>GPI</i>	+	0.0054	98.8	0.0003	Glucose phosphate isomerase	UMGC_03419	H27209
<i>CCT5</i>	+	0.0050	99.2	0.0007	Chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	UMGC_03440	R73042
<i>EST</i>	–	0.0069	97.2	0.0006	Expressed sequence tag	UMGC_04567	H04779
<i>BCL2A1</i>	+	0.0079	98.2	0.0010	BCL2-related protein A1	UMGC_07453	N28416
<i>CENPF</i>	+	0.0136	99.6	0.0035	Centromere protein F, 350/400ka (mitotin)	UMGC_01312	R16839
<i>HIST1H1C</i>	+	0.0079	99.2	0.0023	Histone 1, H1c	UMGC_07687	BX092939
<i>CST4</i>	–	0.0123	93.8	0.0010	Cystatin S	UMGC_08604	AI446249
<i>EST</i>	–	0.0128	94.0	0.0015	Expressed sequence tag	UMGC_04962	AL833369
<i>C16orf61 (DC13)</i>	+	0.0177	96.4	0.0036	Chromosome 16 open reading frame 61 (DC13 protein)	UMGC_00205	T81379
<i>HIST1H2BG</i>	+	0.0258	86.6	0.0059	Histone 1, H2bg	UMGC_03528	H70774
<i>APRT</i>	+	0.0483	67.0	0.0320	Adenine phosphoribosyltransferase	UMGC_03273	R68817

^a sense of expression in patients with MR; Internal validation was used to avoid overfitting by means of resampling and permutation^b resampling with p-value averaging from 1,000 randomly created samples (*n* = 80% of original sample)^c permutation with comparison of the p-value from original dataset to the distribution of p-values from 10,000 randomly created samples when the data are permuted**Table 4** Distribution, 5-year MFS and MR according to classification schemes

Classification scheme	Distribution n(%)	5-year MFS% [95% CI]	MR n (%)	<i>P</i> logrank
NPI				
1	7 (4.7)	100 [–]	0 (0)	3×10^{-5}
2	76 (50.6)	90 [80–95]	7 (9.2)	
3	67 (44.7)	63 [50–74]	25 (37.3)	
(AIC = 292.1)				
GS				
1	38 (25.3)	95 [80–99]	2 (5.3)	1×10^{-7}
2	37 (24.7)	85 [67–94]	5 (13.5)	
3	38 (25.3)	86 [71–94]	6 (15.8)	
4	37 (24.7)	48 [31–63]	19 (51.4)	
(AIC = 285.5)				
CGM				
2–3	32 (21.3)	100 [–]	0 (0)	9×10^{-12}
4–5–6	90 (60.0)	84 [74–90]	15 (16.7)	
7	28 (18.7)	37 [19–55]	17 (60.7)	
(AIC = 274.6)				

previously found to be involved in the phenomenon of multidrug resistance in different carcinomas [44–47]. *CCT5* was found up-regulated in node-positive breast cancer patients with a poor outcome [37]. In a recent genomic study which aimed at identifying a gene-expression-based outcome predictor for ER-positive and

PR-positive breast cancer patients, Oh et al. found that a high expression of *BCL2A1* was associated with a bad prognosis, suggesting an impaired ability to undergo cell death [48]. Other reports have shown that high expression of *BCL2A1* can directly contribute to chemoresistance [49, 50]. Three H1 histones subtypes (*HIST1H1C*, *HIST1H2BK*,

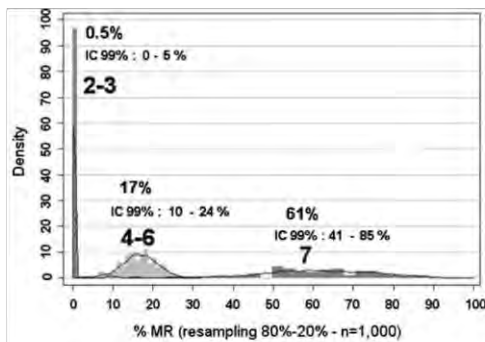


Fig. 2 Distribution of MR frequency in 1,000 resampled validation samples ($n = 20\%$) according to CGM score (2–3/4–6/7). Internal validation was used to avoid overfitting and so increase predictive accuracy by means of resampling: CGM score determination in validation patients (20% of original sample) was iteratively extrapolated ($n = 1,000$) from calculations in training patients ($n = 80\%$ of original sample). Then MR frequency was calculated according to CGM score in each validation sample and then averaged with 99% CI

HIST1H2BC) were found to be overexpressed in metastatic relapse. Early studies suggested that H1 histones have a generally repressive role in transcription. However, more recent works showed that H1 variants have much more specific effects, both positive and negative on gene expression in vivo [51–53]. Recently Oishi et al. identified 313 genes up-regulated in poor outcome group of node-positive breast cancer patients; four *HIST1H3* subtype genes were included in this list [37]. *CST4* belongs to cystatin super-family. Cystatins are endogenous inhibitors of endosomal/lysosomal cysteine protease, whose impaired function has been implicated in cancer progression. No study in breast cancer pointed out *CST4*. Nonetheless, *CST6* (cystatin M) has been typed as a tumor suppressor gene. *CST4* underexpression in metastatic relapse is consistent with a cystatin family composed of tumor suppressor genes. *GPI* has been implicated in tumor malignancy and plays an important role in the progression of breast cancer, as well as having a prognostic role [54, 55].

Discussion

Performance of our clinicogenomic model

The application of predictive study is to inform which patients are suitable for a specific therapy. Our preliminary results defined a predictive model of MFS (CGM) more powerful than the well-established index NPI and our 15-gene-sequence signature alone. The CGM permitted to better classify node-positive patients according to their

evolution after FEC100 chemotherapy regimen. This first step (developmental study) is analogous to phase II clinical trials. Its true predictive accuracy will need to be evaluated in a phase III trial (external validation) [21].

The proportion of FEC100 correctly treated patients (CGM low-risk group), based on MFS, was more than fourfold increased; the CGM also permitted to identify a subgroup of patients with higher risk than the high-risk subgroup identified by NPI (more than 50% risk rise), for whom we know FEC100 largely fails and another therapy must be considered.

Because, given the number of patients at disposal, retaining a part of them for external validation would have meant risking to withhold information contained in our data, internal validation was performed by cross-validation.

Although our CGM classifies patients better than NPI, there are two ways it could achieve further performance. One way is to increase the studied cohort size, and so the number of MR, making the CGM more accurate. The second way is to analyze the entire genome, which might lead to a more informative gene-signature. Actually, we explored the expression level of only 5,776 genes, estimated to represent roughly one-sixth of the human genome.

Clinicogenomic model for personalized medicine

Genomic data, particularly genome-scale measures of gene expression derived from DNA microarray studies, have the potential for adding enormous information to the analysis of biological phenotypes. In translational research, a growing question is: Will these exclusive transcriptomic data be sufficient to type precisely the different phenotypes? Or in other words: Is the transcriptome, all alone, exhaustively informative? In breast cancer, standard clinical risk factors, such as lymph-node involvement, tumor size, histological grade, patient age, hormone receptor status, alone or in combination (NPI), certainly have prognostic value in connection with disease progression. Genomic and clinical data could be relevant, have redundant information, and be combined in integrative models to improve patient subtyping into different risk group in order to help in making treatment decisions. To our knowledge, JR Nevins was the first to underline the interest of “integrated clinicogenomic models” for personalized medicine in breast cancer outcome prediction [20, 56]. As pointed out by different authors, genomic classifiers must be tested to evaluate whether they predict more accurately than do classical factors or add predictive accuracy to that provided by classical factors [21, 57, 58]. In 2004, P. Eden compared the power of van’t Veer classifier with that of NPI, and concluded that the classifier did not perform noticeably better than the well-established NPI [22]. In the present study, we compared NPI to our classifier. We showed that

the latter was more powerful than the NPI, and that the CGM resulting from the combination of the NPI and our gene combination exceeded the power achieved by using either one alone.

To date, except Oncotype DX[®] assay, restricted to the prediction of recurrence of tamoxifen-treated node-negative breast cancer newly diagnosed (stage I or II), no multigene classifier has been adopted into oncology practice and very few are close to achieving such status [59]. Essentially because of lack of robustness of these results, confirmative studies by other groups and well-performed meta-analyses are imperatively needed. At the present time, all published gene-signatures are more or less dependent (bias) to many parameters of genomic studies or overfitted [60]. Combinations are closely linked to the composition of the cohort, delay from tumor excision to freezing, method of RNA extraction, kind of DNA microarray, data pre-processing and statistical analysis. Before a gene-signature could be widely used, proper evaluation, of utmost importance from a clinical perspective, has to be done. However, some robust results are already present, but still hidden, in different published gene-signatures. As pointed out by our bibliographic investigation, most of our selected genes have a biological sense in breast cancer, in carcinogenesis or in chemotherapy resistance. Furthermore, six genes were previously described in other genomic studies (*UBE2C*, *CENPF*, *C16orf61* [*DC13*], *STMN1*, *CCT5*, *BCL2A1*). These results do not confirm our gene-signature in its entirety, but underline the presence of the same robust genes in different genomic studies. Furthermore, we can suppose that these common genes have more chance to reach the clinical practice. In this way, synthesis of different transcriptomic results might represent a successful strategy. Recently, Brenton et al. proposed to try to identify an overlapping consensus set of candidate predictive genes by reanalyzing data from existing gene-expression signatures [61]. We can suggest that a widespread usable gene-signature, which will give more information than existing diagnostic tools, will probably fail to type all the patient because of hugely breast cancer heterogeneity. The existence of worldwide prognostic or predictive gene-classifiers in breast cancer, able to type all the patients without preliminary subtyping, is an *a priori*, and so, unsure. In conclusion, one can hypothesize that clinicogenomic models, which could include other “-omic” screening results (proteins, single nucleotide polymorphisms...), could be the future most powerful tools for personalized medicine [62].

Acknowledgements We thank M. Martin, E. Ollivier and N. Roi for technical assistance. This work was supported by funds from PFIZER-France pharmaceutical company, the Ligue Régionale contre le Cancer de Loire Atlantique, Cancéropôle Grand Ouest and by generous gifts from Lyon's Clubs-La Baule/Pays Guérandais and

Nantes Pays de Loire, and different regional associations of bowls players. A part of the tissues used in this publication was provided by IRCNA tumor bank, Nantes, funded by the Institut National du Cancer and the Cancéropôle Grand Ouest.

References

- Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW et al (1982) A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 45:361–366
- Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD et al (1998) Meeting highlights: international consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:1601–1608
- Eifel P, Axelsson JA, Costa J et al (2001) National institutes of health consensus development conference statement: adjuvant therapy for breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 93:979–989
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–752
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10869–10874
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530–535
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ et al (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347:1999–2009
- Pawitan Y, Bjöhle J, Amler L et al (2005) Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts. *Breast Cancer Res* 7:R953–R964
- Sotiriou C, Powles TJ, Dowsett M et al (2002) Gene expression profiles derived from fine needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 4:R3
- Buchholz TA, Stivers D, Stec J et al (2002) Global gene expression changes during neoadjuvant chemotherapy of human breast cancer. *Cancer* 8:461–468
- Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A et al (2003) Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 362:362–369
- Ayers M, Symmans WF, Stec J et al (2004) Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel/FAC chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 22:2284–2293
- Gianni L (2004) Gene expression profiles of paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22:501 (Abstract)
- Millour M, Charbonnel C, Magrangeas F et al (2006) Gene expression profiles discriminate between pathologic complete response and resistance to neoadjuvant FEC100 in breast cancer. *Cancer Genomics and Proteomics* 3:89–96
- Bonnetterre J, Roché H, Kerbrat P et al (2005) Epirubicin increases long-term survival in adjuvant chemotherapy of patients with poor-prognosis, node-positive, early breast cancer: 10-year follow-up results of the french adjuvant study group 05 randomized trial. *J Clin Oncol* 23:2686–2693
- Trudeau M, Charbonneau F, Gelman K et al (2005) Selection of adjuvant chemotherapy for treatment of node-positive breast cancer. *Lancet Oncol* 6:886–898
- Roché H, Viens P, Biron P et al (2003) High-dose chemotherapy for breast cancer: the French PEGASE experience. *Cancer Control* 10:42–47

18. Roché H, Fumoleau P, Spielmann M et al (2006) Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the PACS01 trial. *J Clin Oncol* 24:5664–5671
19. Magrangeas F, Nasser V, Avet-Loiseau H et al (2003) Gene expression profiling of multiple myeloma reveals molecular portraits in relation to the pathogenesis of the disease. *Blood* 101:4998–5006
20. Nevins JR, Huang ES, Dressman H et al (2003) Towards integrated clinicogenomic models for personalized medicine: combining gene expression signatures and clinical factors in breast cancer outcomes prediction. *Hum Mol Genet* 12:R153–R157
21. Simon R (2005) Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers. *J Clin Oncol* 23:7332–7341
22. Eden P, Ritz C, Rose C et al (2004) “Good old” clinical markers have similar power in breast cancer prognosis as microarray gene expression profilers. *Eur J Cancer* 40:1837–1841
23. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ et al (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294–5299
24. Simon R, Radmacher MD, Dobbin K et al (2003) Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J Natl Cancer Inst* 95:14–18
25. Todd JH, Dowle CS, Williams MR (1987) Confirmation of prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 56:489–492
26. Galea MH, Blamey RW, Elston CE et al (1992) The Nottingham prognostic index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 22:207–219
27. Okamoto Y, Ozaki T, Miyazaki K et al (2003) UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme. *Cancer Res* 6:4167–4173
28. Wagner KW, Sapinoso LM, El-Rifai W et al (2004) Overexpression, genomic amplification and therapeutic potential of inhibiting the UbcH10 ubiquitin conjugase in human carcinomas of diverse anatomic origin. *Oncogene* 23:6621–6629
29. Ma XI, Salunga R, Tuggle JT et al (2003) Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5974–5979
30. Rape M, Kirschner M (2004) Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* 432:588–595
31. Ricolleau G, Charbonnel C, Lodé L et al (2006) Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling identifies ubiquitin and ferritin light chain as prognostic biomarkers in node-negative breast cancer tumors. *Proteomics* 6:1963–1975
32. Hussein D, Taylor S (2002) Farnesylation of Cenp-F is required for G2/M progression and degradation after mitosis. *J Cell Sci* 115:3403–3414
33. O’Brien SL, Fagan A, Fox EJP et al (2007) CENP-F expression is associated with poor prognosis and chromosomal instability in patients with primary breast cancer. *Int J Cancer* 120:1434–1443
34. Bièche I, Lachkar S, Becette V et al (1998) Overexpression of the stathmin gene in a subset of human breast cancer. *Br J Cancer* 78:701–709
35. Curmi PA, Noguès C, Lachkar S et al (2000) Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours. *Br J Cancer* 82:142–150
36. Brattsand G (2000) Correlation of oncoprotein 18/stathmin expression in human breast cancer with established prognostic factors. *Br J Cancer* 83:311–318
37. Oishi Y, Nagasaki K, Miyata S et al (2007) Functional pathway characterized by gene expression analysis of supraclavicular lymph node metastasis-positive breast cancer. *J Hum Genet* 52:271–279
38. Barrett M, Pritchard D, Palanca-Wessels C et al (2003) Molecular phenotype of spontaneously arising 4N (G₂-tetraploid) intermediates of neoplastic progression in Barrett’s esophagus. *Cancer Res* 63:4211–4217
39. Rosty C, Sheffer M, Tsafir D et al (2005) Identification of a proliferative gene cluster associated with HPV E6/E7 expression level and viral DNA load in invasive cervical carcinoma. *Oncogene* 24:7094–7104
40. Milyasky M, Tabach Y, Shats I et al (2005) Transcriptional programs following genetic alterations in *p53*, *INK4A*, and *H-RAS* genes along defined stages of malignant transformation. *Cancer Res* 65:4530–4543
41. Tabach Y, Milyavsky M, Shats I et al (2005) The promoters of human cell cycle genes integrate signals from two tumor suppressive pathways during cellular transformation. *Mol Syst Biol* msb4100030-E1-E15
42. Dai H, van’t Veer L, Lamb J et al (2005) A cell proliferation signature is a marker of extremely poor outcome in a subpopulation of breast cancer. *Cancer Res* 6:4059–4066
43. Whitfield ML, George LK, Grant GD et al (2006) Common markers of proliferation. *Nature Rev* 6:99–106
44. Sinha P, Hutter G, Kottgen E et al (1999) Search for novel proteins involved in the development of chemoresistance in colorectal cancer and fibrosarcoma cells in vitro using two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing. *Electrophoresis* 14:2961–2969
45. Ludwig A, Dietel M, Lage M (2002) Identification of differentially expressed genes in classical and atypical multidrug-resistant gastric carcinoma cells. *Anticancer Res* 6A:3213–3221
46. Jiang A, Zhang LX, Yue W et al (2003) Establishment of a human nasopharyngeal carcinoma drug-resistant cell line CNE2/DDP and screening of drug-resistant genes. *Ai Zheng* 4:337–345
47. Ooe A, Kato K, Noguchi S (2007) Possible involvement of CCT5, RGS3, and YKT6 genes up-regulated in p53-mutated tumors in resistance to docetaxel in human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 101:305–315
48. Oh DS, Troester MA, Usary J et al (2006) Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. *J Clin Oncol* 24:1656–1664
49. Wang CY, Guttridge DC, Mayo MW et al (1999) NF- κ B induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 19:5923–5929
50. Cheng Q, Ho HL, Li Y et al (2000) Upregulation of Bcl-x and Bfl-1 as a potential mechanism of chemoresistance, which can be overcome by NF- κ B inhibition. *Oncogene* 19:4936–4940
51. Brown D, Alexander B, Sittman DB (1996) Differential effect of H1 variant overexpression on cell cycle progression and gene expression. *Nucleic Acids Res* 24:486–493
52. Gunjan A, Alexander B, Sittman D et al (1999) Effects of H1 histone variant overexpression on chromatin structure. *J Biol Chem* 274:37950–37956
53. Alami R, Fan Y, Pack S et al (2003) Mammalian linker-histone subtypes differentially affect gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5920–5925
54. Yanagawa T, Funasaka T, Tsutsumi S et al (2004) Novel roles of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase in tumor malignancy. *Endocrine-related Cancer* 11:749–759
55. Jiang WG, Raz A, Douglas-Jones A et al (2006) Expression of autocrine motility factor (AMF) and its receptor, AMFR, in human breast cancer. *J Histochem Cytochem* 54:231–241
56. Pittman J, Huang E, Dressman H et al (2004) Integrated modeling of clinical and gene expression information for personalized

- prediction of disease outcomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8431–8436
57. Kattan MW (2004) Evaluating a new marker's predictive contribution. *Clin Cancer Res* 10:822–824
58. Sun Y, Goodison S, Li J et al (2007) Improved breast cancer prognosis through the combination of clinical and genetic markers. *Bioinformatics* 23:30–37
59. Paik S, Shak S, Tang G et al (2004) A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351:2817–2826
60. Ransohoff DE (2005) Bias as a threat to the validity of cancer molecular-marker research. *Nat Rev* 5:142–149
61. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA et al (2005) Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 23:7350–7360
62. West M, Ginsburg GS, Huang AT et al (2006) Embracing the complexity of genomic data for personalized medicine. *Genome Res* 16:559–566

A 38-gene expression signature to predict metastasis risk in node-positive breast cancer after systemic adjuvant chemotherapy: a genomic substudy of PACS01 clinical trial

Pascal Jézéquel · Mario Campone · Henri Roché · Wilfried Gouraud · Catherine Charbonnel · Gabriel Ricolleau · Florence Magrangeas · Stéphane Minvielle · Jean Genève · Anne-Laure Martin · Régis Bataille · Loïc Campion

Received: 7 November 2008 / Accepted: 7 November 2008
© Springer Science+Business Media, LLC. 2008

Abstract Currently, no prognostic gene-expression signature (GES) established from node-positive breast cancer cohorts, able to predict evolution after systemic adjuvant chemotherapy, exists. Gene-expression profiles of 252 node-positive breast cancer patients (median follow-up: 7.7 years), mostly included in a randomized clinical trial (PACS01), receiving systemic adjuvant regimen, were determined by means of cDNA custom array. In the training cohort, we established a GES composed of 38 genes (38-GES) for the purpose of predicting metastasis-free survival. The 38-GES yielded unadjusted hazard ratio (HR) of 4.86 (95% confidence interval = 2.76–8.56). Even when adjusted with the best two clinicopathological prognostic

indexes: Nottingham prognostic index (NPI) and Adjuvant!, 38-GES HRs were 3.30 (1.81–5.99) and 3.40 (1.85–6.24), respectively. Furthermore, 38-GES improved NPI and Adjuvant! classification. In particular, NPI intermediate-risk patients were divided into 2/3 close to low-risk group and 1/3 close to high-risk group (HR = 6.97 [2.51–19.36]). Similarly, Adjuvant! intermediate-risk patients were divided into 2/3 close to low-risk group and 1/3 close to high-risk group (HR = 4.34 [1.64–11.48]). The 38-GES was validated on gene-expression datasets from three external node-positive breast cancer subcohorts ($n = 224$) generated from different microarray platforms, with HR = 2.95 (1.74–5.01). Moreover, 38-GES showed prognostic performance in supplementary cohorts with different lymph-node status and endpoints (1,040 new patients). The 38-GES represents a robust tool able to type systemic adjuvant treated node-positive patients at high risk of metastatic relapse, and is

Pascal Jézéquel and Loïc Campion contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10549-008-0250-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. Jézéquel · W. Gouraud · C. Charbonnel · F. Magrangeas · S. Minvielle
Unité Mixte de Génomique du Cancer, Hôpital Laënnec,
Bd J. Monod, 44805 Nantes, Saint Herblain Cedex, France

P. Jézéquel (✉) · G. Ricolleau · R. Bataille
Département de Biologie Oncologique, Centre de Lutte Contre le
Cancer René Gauducheau, Bd J. Monod, 44805 Nantes,
Saint Herblain Cedex, France
e-mail: p-jezequel@nantes.fnclcc.fr

M. Campone
Service d'Oncologie Médicale, Centre de Lutte Contre le Cancer
René Gauducheau, Bd J. Monod, 44805 Nantes, Saint Herblain
Cedex, France

H. Roché
Service d'Oncologie Médicale, Institut Claudius Regaud, 20-24
rue du Pont Saint Pierre, 31052 Toulouse Cedex, France

W. Gouraud · C. Charbonnel · F. Magrangeas · S. Minvielle ·
L. Campion
INSERM U892, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu,
44035 Nantes Cedex, France

W. Gouraud · C. Charbonnel · L. Campion
Unité de Biostatistique, Centre de Lutte Contre le Cancer René
Gauducheau, Bd J. Monod, 44805 Nantes, Saint Herblain Cedex,
France

J. Genève · A.-L. Martin
Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer
(FNCLCC), 101 rue de Tolbiac, 75654 Paris Cedex 13, France

Published online: 20 November 2008

 Springer

especially powerful to refine NPI and Adjuvant! classification for those patients.

Keywords Adjuvant chemotherapy · Breast cancer · Clinicogenomic model · FEC100 regimen · Genomic study · PACS01

Introduction

In breast cancer, gene expression profiling permitted first to distinguish breast tumors into subclasses with clinical implications, and second to predict evolution of node-negative breast cancer patients [1–5]. The initial focus on node-negative breast cancer subtyping resulted from the crucial decision of not treating low-risk patients who might have a favorable evolution without systemic adjuvant chemotherapy. Currently, three prognostic breast cancer tests resulting from gene expression studies are commercially available: Oncotype Dx[®] (Genomic Health, Redwood City, CA, USA), MammaPrint[®] (Agendia BV, Amsterdam, The Netherlands) and H/I[®] (AvariaDX, Carlsbad, CA, USA) [3, 6, 7]. All these tests are designed to be used in the management of node-negative breast cancer. Today, in breast cancer, no robust gene-expression signature (GES) based exclusively on node-positive patients treated by systemic adjuvant chemotherapy, and able to predict metastasis evolution, exists. Being able to type those node-positive patients would lead to orientate and include high-risk patients in new clinical trials testing novel targeted therapies. The goal of our study was thus to identify and validate a GES for the purpose of predicting metastatic relapse in node-positive patients treated by systemic adjuvant chemotherapy, and so, to enlarge the panel of prediction of breast cancer GESs.

Methods

Patients

The training cohort (TC) was composed of 252 women who had unilateral breast cancer, were node-positive, showed no evidence of metastasis at diagnosis, were younger than 65 years of age, and treated by adjuvant systemic chemotherapy. The majority of the studied patients (90.5%) was primarily included in a multicentric phase III clinical trial (PACS01) conducted by investigators from the French Federation of Cancer Center [8]. One hundred and twenty eight patients were also part of a previous study; in the present work, follow-up data were actualized [9]. Twenty four patients (9.5%) followed in the René Gauducheau Cancer Center were included based on the same inclusion

criteria as those used for PACS01 trial. Briefly, after surgery, patients received intravenous adjuvant treatment with 5-fluorouracil 500 mg/m², epirubicin 100 mg/m² and cyclophosphamide 500 mg/m² (FEC100) every 21 days for 6 cycles (PACS01-FEC arm and René Gauducheau Cancer Center), or 3 cycles (PACS01-FEC+Docetaxel arm). Patients were followed up for metastasis-free survival (MFS). No bioclinical or MFS heterogeneity between the 3 subpopulations was found, allowing their pooling (supplementary Table 1). The median follow-up was 7.7 years (range 1.22–10.02). During the period, 65 patients showed evidence of distant MR and 47 died. This substudy of PACS01 trial was reviewed and approved by the ethics committee/institutional (CCPPRB) review board (number 1-97-13). All patients signed informed consent for research purpose.

External validation was based on independent breast cancer patients with the following inclusion criteria: available genomic profiles, node-positive and metastatic relapse (MR) well defined in order to use the same outcome definition as the one used in the TC. Hence, we extracted three subcohorts (validation cohorts [VCs] 1–3) from three published cohorts (Table 1, supplementary Table 2) [4, 10, 11]. No statistical heterogeneity was found between TC and VC1 + VC2 + VC3 for available data (estrogen receptor [ER] and 5-year MFS) (supplementary Table 3).

Table 1 Methodological distribution and status of the studied cohorts

Code	Data sets	Nodal status			Clinical outcome	
		N+	N−	Mixed	MR	ue
Training cohort						
TC	Our study	252			65	
	Total	252			65	
Validation cohorts						
VC1	Van de Vijver et al. [4]	144			47	
VC2	Sotiriou et al. [10]	53			23	
VC3	Sotiriou et al. [11]	27			7	
	Total	224			77	
Exploratory cohorts						
EC1	Van de Vijver et al. [4]	151			54	
EC2	Sotiriou et al. [10]	46			7	
EC3	Sotiriou et al. [11]	149			33	
EC4	Wang et al. [5]	286			107	
	Subtotal	632			201	
EC5	Pawitan et al. [12]		159			40
EC6	Ivshina et al. [13]		249			89
	Subtotal		408			129

MR metastatic relapse; ue unspecified event: local relapse, metastatic relapse or cancer death; TC training cohort; VC validation cohort 1–3; EC, exploratory cohort 1–6

To explore performance capacities of our gene signature (*n*-GES), a complementary study was conducted on breast cancer patients (exploratory cohorts [ECs] 1–6) who did not fulfill *n*-GES establishment inclusion criteria (node-mixed, node-negative and unspecified event [local relapse, metastatic relapse or cancer death]) (Table 1, supplementary Table 2) [4, 5, 10–13].

Tumor tissue samples and RNA isolation

All tumor tissue samples were surgically collected and immediately macrodissected by a pathologist, snap-frozen in liquid nitrogen and stored until RNA extraction. Total RNA was prepared by the CsCl-cushion, as described [14]. The quality and the quantity of RNA samples were evaluated by Agilent 2100 Bioanalyser RNA LabChip kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Nylon microarray technology

We used nylon microarrays manufactured in our lab, which contained 8,032 unique sequenced-verified cDNA clones, representing 5,776 distinct genes, chosen using the expressed sequence tag database from the NCBI with update Hs#196 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The same microarray tools were used and described in previous works [9, 15, 16]. Microarray characteristics and data have been deposited in the NIH Gene Expression Omnibus (Series accession number: GSE11264) according to minimum information about a microarray experiment (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE11264>).

Statistical analysis

Bioinformatics

DNA microarrays were scanned at 25- μ m resolution using a Fuji BAS 5000 image plate system (Raytest, Paris, France). The hybridization signals were quantified using ArrayGauge software v.1.3 (Fuji Ltd, Tokyo, Japan). For each membrane, the raw data were background noise subtracted (median value of negative controls $\pm$ 6 standard deviation), then normalized by global intensity of hybridization. Patient data were adjusted by the amount of polymerase chain reaction product spotted onto the membrane, $\log_2$ -transformed and finally standardized (mean = 0; standard deviation = 1). Only genes well measured for at least 70% of patients were retained.

Establishment of the gene expression signature

Genes were selected by means of resampling and univariate Cox permutations techniques to minimize overfitting and to

maximize stability of gene list for MFS prediction. We created 100 different random samples composed of the 2/3 of TC. For each of these 100 subsamples i ($i = 1-100$), we determined an unbiased predictor (p_i) with internal robust cross-validation (leave-one-out cross-validation method). One-hundred p_i ($i = 1-100$) were thus determined. In order to increase stability of final gene list (n), only genes present in at least 50% of the unbiased resampled gene predictors p_i were retained to build the *n*-GES. The *n*-GES score was calculated as the difference between the mean of the genes overexpressed genes in MR patients and the mean of the genes underexpressed genes in MR patients. To limit overfitting no weight was assigned to genes. Standardization of gene distributions permitted extrapolation of fully determined *n*-GES (including cutoff) onto other cohorts. Optimal cutoff between *n*-GES low-risk and high-risk groups was determined as the value with minimal Akaike Information Criterion (AIC). The *n*-GES was evaluated in VCs, separately and pooled. When at least one GES gene was missing in an external dataset, we calculated a reduced 38-GES and determined its optimal cutoff in TC. Moreover it was necessary to evaluate if this subscore was significantly correlated with 38-GES complete score to permit its use (Supplementary Appendix 1).

Survival analysis and endpoints

Time from surgery to MR (primary endpoint) was retained for GES establishment. Overall survival (OS), defined as time from surgery to death from any cause, was used to reinforce MFS analysis in TC. Survival curves were plotted according to Kaplan–Meier method and compared by means of log-rank test (or Wilcoxon log-rank test if number of events was small, in order to give greater weight to earlier events). For each univariate survival analysis, 10,000 permutation survival analyses were performed to ensure P values were not optimized by overfitting. Only parameters with permutation $P < 0.05$ were entered into the forward Cox proportional hazards model. Proportional hazards assumption was verified for the final models by means of Schoenfeld residuals study and $-\ln(-\ln(\text{survival}))$ curves. Because time to distant metastasis was not specified for EC5 and EC6, time to the first cancer event (local relapse, MR or death) was used.

Sensitivity, specificity

Receiver operating characteristic (ROC) analysis with MR within 5 years as a defining point was computed. The area under the curve (AUC) was used as a measure of the signature global performance in the test set. Time-dependent ROC curves were calculated for *n*-GES and the best two clinical prognostic indexes: Nottingham prognostic index (NPI) and Adjuvant! (10-year OS score was used) [17].

Clinicogenomic model establishment and classification

Firstly, multivariate Cox regression analysis was used to determine if *n*-GES added independent prognostic information to NPI and Adjuvant!. To rule out the possibility that our results were dependent on the choice of clinical indexes cutoff, we carried out a sensitivity analysis in which we varied the NPI raw score that defined low risk, as predicted by NPI, from 3.5 (in which case most patients were classified in the high-risk group) to 7 (in which case most patients were classified in the low-risk group). For Adjuvant!, the same analysis was done from 20% (in which case most patients were classified in the low-risk group) to 80% (in which case most patients were classified in the high-risk group). Secondly, we focused on patients with NPI and Adjuvant! intermediate risk: score 2 and 10-year OS probability between 60 and 80%, respectively. For those patients, the therapeutic decision could be facilitated by an appropriate refining, for example to orientate *n*-GES high-risk patients towards new clinical trials.

All analyses were performed with SAS 9.1 (SAS Institute Ins., Cary, NC), Stata 10.0 SE (Stata Corp., College Station, TX), R software (version 2.5.1) and BRB ArrayTools developed by Dr. R. Simon and A. Peng (Bethesda, MD; 2003) (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>). All statistical tests were two-sided and statistical significance was defined as *P* less than 0.05.

Results

The aim of this study was to examine whether the *n*-GES; (1) had prognostic value in node-positive patients treated by chemotherapy independently of known prognostic parameters such as age, Scarff-Bloom-Richardson grade, tumoral size, ER or number of positive nodes (alone or combined into NPI and Adjuvant!); (2) could improve classification of NPI and Adjuvant!, especially for intermediate-risk patients; (3) confirmed its performance in node-positive independent cohort; (4) had also prognostic value in node-negative patients.

Establishment of the gene expression signature

Thirty eight genes were kept (Table 2). Control of false discovery rate (FDR) among the differentially expressed genes was assessed by 10,000 permutations: permutation *P* was <0.008 and FDR was <18% for all genes but one (*P* = 0.014, FDR = 24%) [18]. Calculation of 38-GES relapse score is defined below (Panel). NPI and Adjuvant! scores are calculated as shown in Supplementary Appendix 2. Optimal cutoff determination for 38-GES, NPI and Adjuvant! is described in supplementary Fig. 1.

Panel: Calculation of 38-GES score

$$38\text{-GES} = \frac{1}{30} \sum_{i=1}^{30} G_i - \frac{1}{8} \sum_{j=1}^8 G_j$$

G_i and G_j represent overexpressed and underexpressed gene-expression standardized values, respectively. No weight was assigned to genes in order to limit overfitting. 38-GES optimal cutoff in TC was 0.005.

Comparison of 38-GES with NPI and Adjuvant!

The unadjusted MFS and OS hazard ratios of classical bioclinical factors and best clinicopathologic risk classifications are shown in supplementary Tables 4 and 5, respectively. The prognostic value of the gene signature was stronger than each of traditional risk factors, NPI and Adjuvant! classifications. Optimal MFS unadjusted hazard ratio (HR) (high risk vs. low risk) for 38-GES, NPI and Adjuvant! were 4.86 (95% confidence interval [CI] 2.76–8.56; *P* < 0.0001), 4.48 (95% CI 2.62–7.66; *P* < 0.0001), 4.16 (95% CI 2.54–6.80; *P* < 0.0001), respectively (supplementary Table 4). AIC of the 3 classification schemes showed that the classification power of 38-GES (AIC = 641.44) was better than the NPI's one (AIC = 649.58), which itself was better than Adjuvant!'s one (AIC = 653.79) to explain the MFS. ROC analysis for MR within 5 years, as a defining point, showed that 38-GES global predictive performance (AUC = 0.779) was higher than NPI's one (AUC = 0.757) and Adjuvant!'s one (AUC = 0.751) with higher sensitivity (Fig. 1). Time-dependent ROC curves confirmed that the global predictive performance of the 38-GES was better than that of NPI and Adjuvant! (data not shown).

Independent prognostic value of 38-GES

The gene signature adjusted hazard ratios for NPI and for the 10-year OS probability Adjuvant! score were 3.30 (95% CI 1.81–5.99) and 3.40 (95% CI 1.85–6.24), respectively (supplementary Table 4). Moreover sensitivity analysis showed that the 38-GES kept its independent prognostic value whatever the definition of NPI and Adjuvant! high-risk group was (supplementary Fig. 2). These results were also confirmed for OS analysis (supplementary Table 5, supplementary Fig. 3). So, relevance of a clinicogenomic model combining 38-GES and bioclinical parameters was shown.

Clinicogenomic model establishment and classification

38-GES refined NPI and Adjuvant! classification, in particular for intermediate-risk patients (Fig. 2, supplementary

Table 2 The 38-gene expression signature for predicting breast cancer metastatic relapse

% Model <i>n</i> = 100	Permutation <i>P</i> <i>n</i> = 10,000	Gene symbol	Gene title	MR sense	Biological process (Gene ontology)	Genbank #
99	<1.10 ⁻⁷	<i>BTG2</i>	BTG family, member 2	—	DNA repair, transcription, regulation of transcription DNA-dependent, negative regulation of cell proliferation	NM_006763
96	<1.10 ⁻⁷	<i>UBE2C</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	+	Ubiquitin proteasome system, cell cycle	BC032677
96	0.0001	<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	+	Angiogenesis, regulation of progression, signal transduction	NM_001025366
94	0.0041	<i>SLC25A5</i>	Solute carrier family 25, member 5	+	Transport, mitochondrial transport	R56229
93	0.0010	<i>FABP5</i>	Fatty acid binding protein 5	+	Lipid metabolic process, transport	BG282526
89	0.0004	<i>ENO1</i>	Enolase 1, (alpha)	+	Glycolysis, transcription	AL833741
86	0.0004	<i>PSMB7</i>	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7	+	Ubiquitin proteasome system, cell cycle	R54562
81	0.0003	<i>TUBB6</i>	Tubulin, beta 6	+	Microtubule-based process, microtubule-based movement, protein polymerization	NM_032525
81	0.0016	<i>TACC3</i>	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	+	Progression, response to stress, hemopoiesis	BC106071
80	0.0001	<i>SURF4</i>	Surfeit 4	+	Unknown	NM_033161
77	0.0007	<i>RHOC</i>	Ras homolog gene family, member C	+	Glycolysis, signal transduction, regulation NF-kappaB cascade	AK094474
76	0.0004	<i>CHCHD2</i>	Coiled-coil-helix- coiled-coil-helix domain containing 2	+	Unknown	NM_016139
71	0.0011	<i>SFRS5</i>	Splicing factor, arginine/serine- rich 5	—	mRNA splice site selection, mRNA processing, RNA splicing	R28509
70	0.0004	<i>TNFSF13</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	—	Angiogenesis, cell proliferation, apoptosis, immune response	NM_003808
70	0.0024	<i>DDT</i>	D-dopachrome tautomerase	+	Melanin biosynthetic process from tyrosin	AI936198
67	0.0003	<i>C1orf64</i>	Chromosome 1 open reading frame 64	—	Unknown	AI732325
67	0.0040	<i>RAB10</i>	RAB10, member RAS oncogene family	+	Regulation of transcription DNA-dependent, intracellular protein transport, nucleocytoplasmic transport, signal transduction, small GTPase mediated signal transduction	AA074077
66	0.0011	<i>XIST</i>	X (inactive)-specific transcript	—	Unknown	H78857
65	0.0017	<i>TUBA4A</i>	Tubulin, alpha 4a	+	Microtubule-based process, microtubule-based movement, protein polymerization	AK054731
63	0.0041	<i>PPA1</i>	Pyrophosphatase (inorganic) 1	+	Phosphate metabolic process	BF694769
62	0.0011	<i>C4B</i>	Complement component 4 B	—	Inflammatory response, complement activation, innate immune response	NM_001002029
62	0.0018	<i>TUBB2C</i>	Tubulin, beta 2C	+	Cell motility, microtubule-based process, microtubule- based movement, natural killer cell mediated cytotoxicity, protein polymerization	BX648521
62	0.0071	<i>C3orf37</i>	Chromosome 3 open reading frame 37	+	Unknown	T65434

Table 2 continued

% Model <i>n</i> = 100	Permutation <i>P</i> <i>n</i> = 10,000	Gene symbol	Gene title	MR sense	Biological process (Gene ontology)	Genbank #
60	0.0017	<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3	—	Cell fate determination, transcription, regulation of transcription DNA-dependent, transcription from RNA polymerase II promoter, defense response	R16918
60	0.0039	<i>PGK1</i>	Phosphoglycerate kinase 1	+	Glycolysis, phosphorylation	H17787
59	0.0014	<i>PPP1CA</i>	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform	+	Carbohydrate metabolic process, protein amino-acid dephosphorylation, cell cycle	NM_001008709
59	0.0022	<i>BCL2A1</i>	BCL2-related protein A1	+	Anti-apoptosis, regulation of apoptosis	N28416
58	0.0005	<i>IL6ST</i>	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	—	Glycogen metabolic process, immune response, signal transduction, cell surface receptor linked signal transduction, positive regulation of cell proliferation	H04779
58	0.0017	<i>PSMB3</i>	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3	+	Ubiquitin-dependent protein catabolic process	R00911
58	0.0020	<i>RPN1</i>	Ribophorin I	+	Protein amino-acid glycosylation	NM_002950
57	0.0033	<i>ETFB</i>	Electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	+	Electron transport, transport	R55473
56	0.0006	<i>CYC1</i>	Cytochrome c-1	+	Electron transport, transport	BF569085
56	0.0144	<i>POR</i>	P450 (cytochrome) oxidoreductase	+	Electron transport	CD014011
55	0.0016	<i>TUBB3</i>	Tubulin, beta 3	+	Microtubule-based process, microtubule-based movement, mitosis, signal transduction, G-protein coupled receptor protein signaling pathway	CR596505
53	0.0060	<i>TMED9</i>	Transmembrane emp24 protein transport containing 9	+	Transport	NM_017510
52	0.0036	<i>TOE1</i>	Target of EGR1, member 1 (nuclear)	+	Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	H29584
52	0.0045	<i>C17orf37</i>	Chromosome 17 open reading frame 37	+	Cell redox homeostasis, protein homooligomerization	T84927
51	0.0073	<i>PSMA5</i>	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5	+	Ubiquitin-dependent protein catabolic process	H48425

MR metastatic relapse

Table 6). NPI 2 patients with 5-year MFS = 90.4% could be separated in 2/3 with 5-year MFS = 96.7% close to NPI 1 and 1/3 5-year MFS = 76.7% close to NPI 3 (HR = 6.97, $P < 0.0001$). Similarly, Adjuvant! 60–79% 10-year OS patients with 5-year MFS = 88.9% could be separated in 2/3 with 5-year MFS = 93.7% close to Adjuvant! $\geq 80\%$ 10-year OS group and 1/3 5-year MFS = 76.9% close to Adjuvant! $< 60\%$ 10-year OS group (HR = 4.34, $P < 0.0001$). The same successful stratification was obtained for NPI and Adjuvant! high-risk patients (supplementary Table 6, supplementary Fig. 4).

Validation of the 38-GES on independent node-positive patients

Correlation study permitted us to apply reduced 38-GES on external datasets with missing genes. Coefficients range was 0.973–0.989 with all $P < 0.00001$ (Supplementary Appendix 1).

38-GES significantly predicted metastatic evolution in pooled node-positive VC (HR = 2.95, 95% CI 1.74–5.01, $P < 0.0001$) with good sensitivity (0.84) and good global predictive performance (AUC = 0.73) (Fig. 3). ER was the

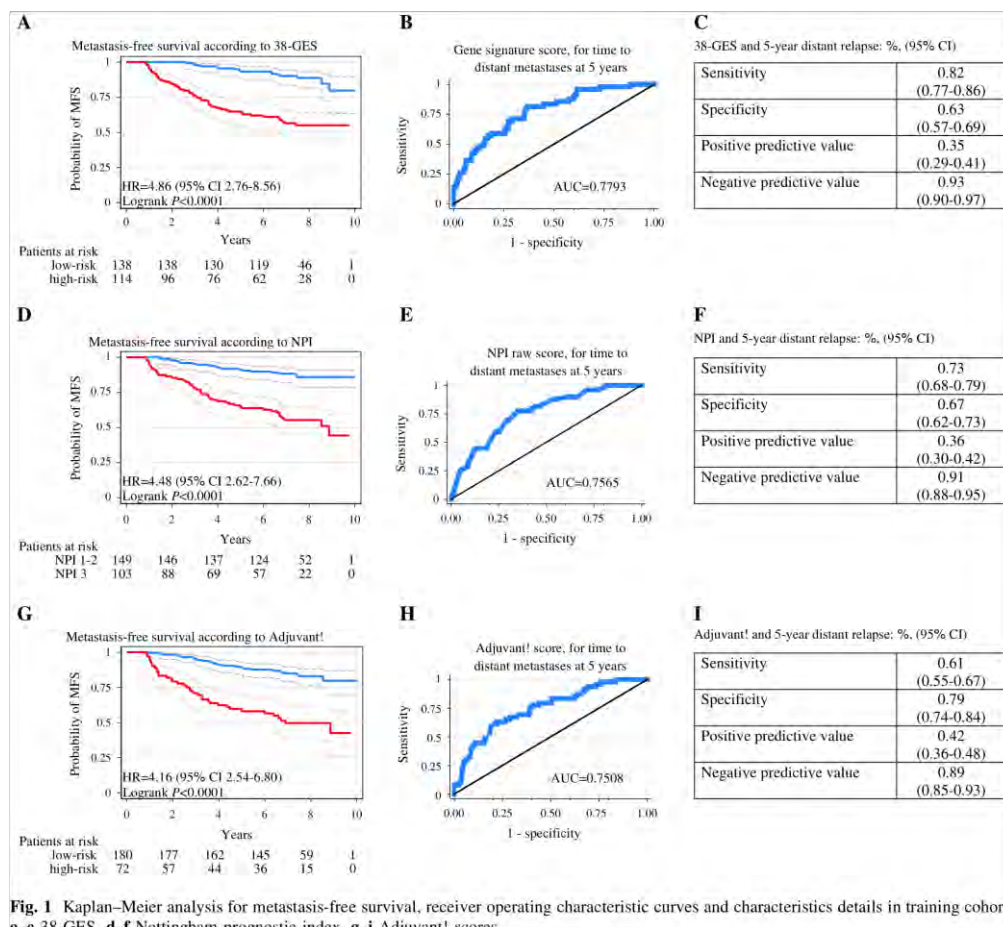


Fig. 1 Kaplan-Meier analysis for metastasis-free survival, receiver operating characteristic curves and characteristics details in training cohort. **a-c** 38-GES. **d-f** Nottingham prognostic index. **g-i** Adjuvant! scores

only parameter which was available in each VC. Even when ER adjusted, 38-GES kept strong prognostic value in pooled VC (HR = 2.63, 95% CI 1.50–4.62, $P < 0.0001$) and separate VCs (Fig. 4).

Assessment of the 38-GES performance on node-negative and “node-mixed” cohorts

38-GES significantly predicted MFS in pooled node-negative ECs (ER adjusted HR = 2.11, 95% CI 1.53–2.92, $P < 0.0001$) and time to disease event (local relapse, metastasis and death) in mixed node cohorts (ER adjusted HR = 2.77, 95% CI 1.93–3.97, $P < 0.0001$) (Fig. 4 and supplementary Fig. 5).

Molecular biology of the markers

A large majority (86%) of the 38 genes showed a significant Cox univariate P -value in at least one external subcohort or cohort (Table 3). Genes reaching or exceeding 50% of significance in the 10 groups are: *UBE2C*, *TACC3*, *IL6ST*, *TUBB2C*, *TUBB3*, *PGK1*, *PPP1CA* and *SLC25A5*. Results displayed in Table 3 and literature mining confirmed that the vast majority of the genes retained in our 38-GES are biologically relevant and linked to breast cancer. Several biological processes were identified by using Gene Ontology database (<http://www.geneontology.org/>). In order of representation, these were: transcription (6 genes), transport (6 genes), ubiquitin-proteasome system (4 genes),

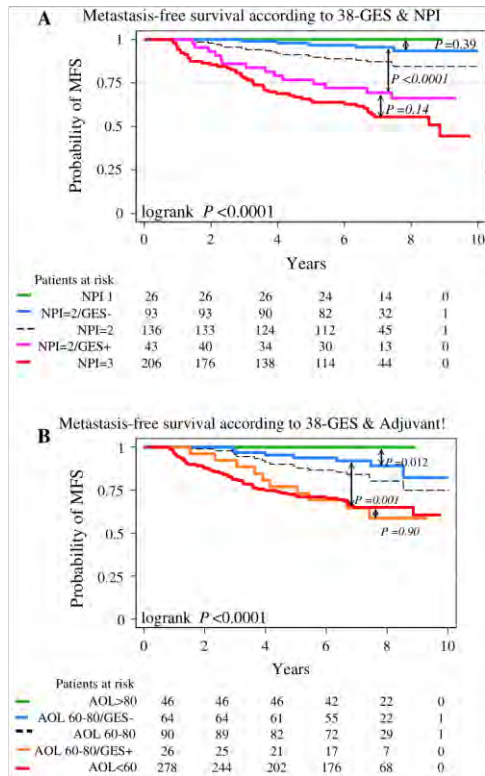


Fig. 2 Kaplan-Meier analysis for clinicogenomic models. **a** 38-GES and NPI. **b** 38-GES and Adjuvant!. 38-GES stratifies intermediate-risk patients based on NPI and Adjuvant! classifications

microtubule-based process (4 genes), signal transduction (4 genes), proliferation (3 genes), cell cycle (3 genes), glycolysis (3 genes), immune response (3 genes), electron transport (3 genes), apoptosis (2 genes), angiogenesis (2 genes) and progression (2 genes).

Discussion

The strengths of our study are detailed below. Our methodology was based on rigorous internal cross-validation for establishment of a GES on a training cohort (representative of node-positive population), followed by external validation using clinically relevant patients. Furthermore, the size of our training cohort ($n = 252$) limited overoptimistic performance estimation due to model overfit and multiple training/test partitions maximized the stability of the obtained 38-gene list. This cohort was homogeneous,

permitting identification of a GES not subject to potential confounding factors related to lymph node status or different systemic adjuvant treatment. Training and validation cohort homogeneity was verified and permitted extrapolation. Prognostic value of 38-GES was tested in pooled validation cohorts but also in each of validation subcohorts separately. As recommended for validation, predictor was fully developed from training cohort (including cutoff value), and predictive performance was verified using the same outcome definition. Our 38-GES was more powerful than the best classical prognostic references (NPI and Adjuvant!) and added independent prognostic information [19, 20]. Importantly, the prognostic performance of our 38-GES was confirmed in several independent data sets generated from different microarray platforms (Affymetrix, Agilent, academic cDNA [NCI]). Agreement study of the 38-GES gene expression significativities showed concordant results, which represents a response to skeptical view of microarray studies (Table 3). These results confirmed on one hand the preanalytical and analytical robustness (different cohorts, biobanks and genomic protocols [RNA isolation, probe preparation and labeling, hybridization, microarray platforms]) of the vast majority of the 38 selected genes, and on the other hand their critical role in breast cancer prediction.

Three main results therefore emerged from this study. First, the 38-GES represents a robust tool able to type systemic adjuvant treated node-positive patients at high risk of MR, and is especially powerful to refine NPI and Adjuvant! classifications. Hence, 38-GES high-risk patients should be orientated and included in new clinical trials testing new targeted therapies, while low-risk patients could still receive node-positive standard treatment. Second, genes, or cellular pathways, revealed by 38-GES might be used as targets for specific treatments of breast cancer. Third, after proper comparison with Mammaprint® and Oncotype Dx®, 38-GES could be used as a prognostic tools for node-negative breast cancer patients. Actually, since their initial description, prediction abilities of the two main GES in node-negative breast cancer (Mammaprint® [70-GES] and Oncotype Dx® [21-GES]) have evolved due to complementary studies. The 70-GES was developed for prognostic prediction of untreated node-negative breast cancer patients [3]. Soon after, this GES showed a prognostic value in node-positive patients who received adjuvant systemic treatment [4]. On the contrary, the Oncotype Dx assay was developed on a node-mixed cohort to predict distant relapse and validated in positive ER node-negative breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen [6]. Since then, prognostic and predictive performance of this test has been refined by using different breast cancer cohorts [21–27]. In this work, we observed a comparable enlargement of the prediction spectrum of our

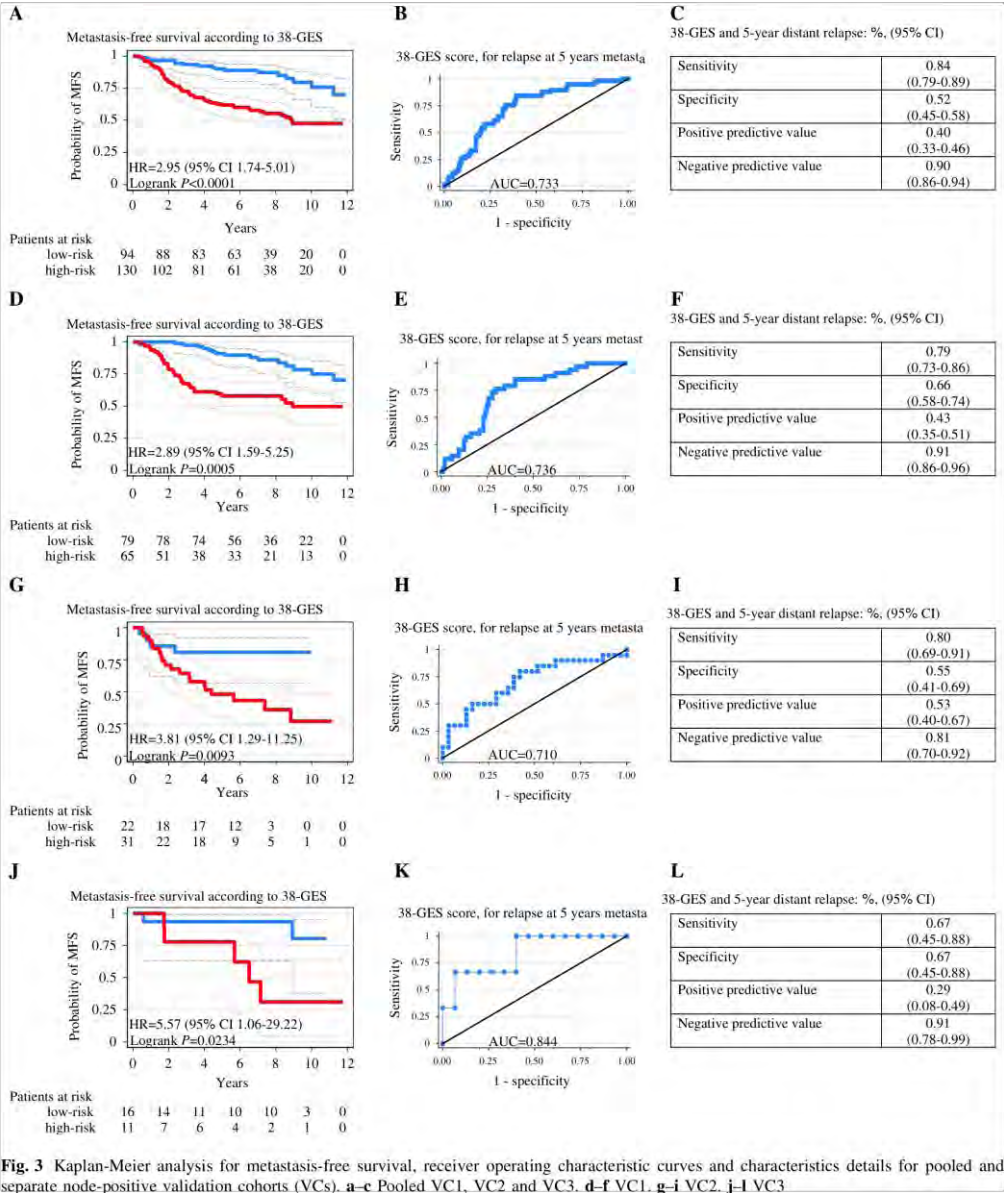


Fig. 3 Kaplan-Meier analysis for metastasis-free survival, receiver operating characteristic curves and characteristics details for pooled and separate node-positive validation cohorts (VCs). **a–c** Pooled VC1, VC2 and VC3. **d–f** VC1. **g–i** VC2. **j–l** VC3

GES. In an exploratory study, we evaluated its performance value on different and various breast cancer subcohorts and cohorts. These results show that the prediction ability of the 38-GES is not restricted to MR in

FEC100 treated node-positive breast cancer patients. What can explain this disparate and unexpected spectrum of prediction? The fact that our 38-GES bares predictive and prognostic performance is not so surprising. A predictor of

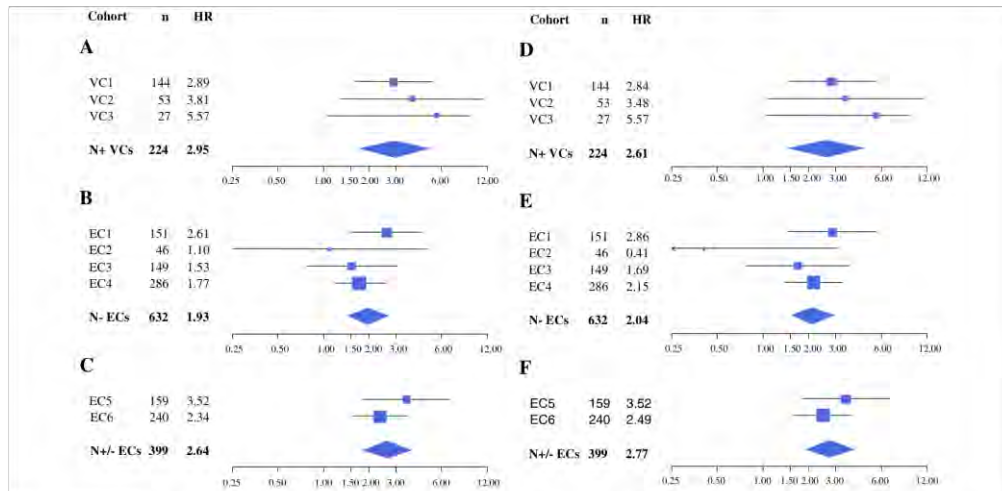


Fig. 4 Forest plots of 38-GES metastasis-free hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs) in high-risk vs low-risk groups for validation cohorts (VCs) and exploratory cohorts (ECs). **a–c** Unadjusted HR, **d–f** Estrogen receptor (ER) adjusted hazard ratio. **(a, d)** VC1 to VC3, **(b, e)** EC1 to EC4, **(c, f)** EC5 and EC6

Table 3 Classification of the 38-GES genes based on number of significant Cox univariate analysis *P* values in the different studied breast cancer cohorts

No of cohorts with significant expression	Gene	TC	VC1	VC2	VC3	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5	EC6
7	<i>UBE2C</i>	0.00005	0.00113	NS	NS ^a	0.00024	NS	0.01962	0.00066	0.00051	0.00025
6	<i>TACC3</i>	0.00127	0.02032	NS	NS	0.00033	NS	NS ^b	0.03920	0.00100	0.00018
5	<i>IL6ST</i>	0.00034	0.01533	NS	NS ^b	0.03427	NS	NS	0.00812	0.00076	NS
5	<i>TUBB2C</i>	0.00096	NS ^a	md	NS	0.00929	md	0.04814	NS	0.00003	0.00101
5	<i>TUBB3</i>	0.00146	NS	md	NS	NS	md	0.04956	0.03492	<0.00001	0.00083
5	<i>PGK1</i>	0.00322	0.00048	md	NS	0.00006	md	NS	NS	0.00005	0.02565
5	<i>PPP1CA</i>	0.00109	0.00349	NS	NS	0.01239	NS	NS	NS	0.00471	0.00024
5	<i>SLC25A5</i>	0.00191	NS ^a	0.01349	NS	0.02281	NS ^a	NS	NS	0.00039	0.00382
4	<i>BTG2</i>	0.00001	0.00543	NS ^a	NS ^{a,b}	0.00020	NS ^a	NS ^a	0.01687	NS	NS
4	<i>C4B</i>	0.00061	NS ^a	NS	0.01467	NS ^a	NS	NS	NS	0.00401	0.02725
4	<i>VEGFA</i>	0.00020	NS ^{a,b}	0.01384	NS	0.00294	NS ^a	NS	NS	NS ^b	0.04090
4	<i>SFRS5</i>	0.00077	NS ^a	NS	NS ^b	0.01678	NS	NS	0.03148	0.02179	NS
4	<i>ENO1</i>	0.00008	0.01194	md	NS	0.01341	md	NS	NS	0.02788	NS
4	<i>GATA3</i>	0.00060	NS ^a	0.02185	NS	0.02143	NS ^a	NS	NS	0.01549	NS
4	<i>TMED9</i>	0.00415	0.00025	NS	NS	NS ^a	NS	NS	0.00002	NS	0.00192
4	<i>POR</i>	0.01509	NS ^a	NS	NS	0.00959	NS	NS	NS	0.00001	0.03871
3	<i>PSMB3</i>	0.00177	NS ^{a,b}	NS	NS	NS ^a	NS	NS	NS	0.03941	0.00096
3	<i>CYC1</i>	0.00091	0.00148	NS	NS	NS ^{a,b}	NS ^b	NS ^b	NS	0.00105	NS ^b
3	<i>XIST</i>	0.00027	md	md	NS ^b	md	md	NS	NS	0.00913	0.00941
3	<i>C17orf37</i>	0.00272	md	md	md	md	md	md	md	0.03881	0.00073
2	<i>FABP5</i>	0.00058	NS	NS ^{a,b}	NS	NS	NS ^a	NS	0.01527	NS ^b	NS
2	<i>PSMB7</i>	0.00059	NS ^{a,b}	NS	NS	NS ^a	NS	0.04657	NS	NS	NS
2	<i>TUBA4A</i>	0.00153	NS	NS ^{a,b}	NS	NS	NS ^a	NS	NS	0.01089	NS

Table 3 continued

No of cohorts with significant expression	Gene	TC	VC1	VC2	VC3	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5	EC6
2	<i>DDT</i>	0.00124	0.04183	NS	NS	NS ^a	NS	NS	NS	NS ^b	NS ^b
2	<i>CHCHD2</i>	0.00035	md	md	NS	md	md	NS	NS	0.00016	NS ^b
2	<i>RAB10</i>	0.00218	NS ^b	NS	md	NS	NS	md	md	0.00065	NS
2	<i>RPN1</i>	0.00161	NS	md	NS	NS	md	NS	NS	NS ^b	0.00856
2	<i>ETFB</i>	0.00175	NS	0.01651	NS	NS	NS ^a	NS	NS	NS	NS ^b
2	<i>SURF4</i>	0.00018	md	md	md	md	md	md	md	0.00051	NS
2	<i>TNFSF13</i>	0.00013	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.00979	NS	NS
2	<i>PPA1</i>	0.00204	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.00778
2	<i>BCL2A1</i>	0.00215	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.01237	NS
2	<i>PSMA5</i>	0.00673	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.00589
1	<i>C1orf64</i>	0.00087	md	md	md	md	md	md	md	NS	NS ^b
1	<i>TUBB6</i>	0.00028	md	md	NS	md	md	NS	NS	NS ^b	NS
1	<i>C3orf37</i>	0.00291	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS ^b	NS
1	<i>TOE1</i>	0.00296	md	md	NS	md	md	NS	NS	NS	NS
1	<i>RHOC</i>	0.00047	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
No. of genes with:											
	$P < 0.05$	38	10	4	1	13	0	4	9	22	17
	$P < 0.10$	38	14	6	5	14	1	6	9	28	22

TC training cohort; VC validation cohort 1 to 3; EC exploratory cohort 1 to 6; NS non significant ($P > 0.05$); md missing data

^a $P < 0.05$ in $VC_i \cup EC_i$; $i = 1, 2$ or 3

^b $0.05 < P < 0.10$

evolution after a systemic adjuvant treatment logically might contain predictive and prognostic informativity; but to what extent? As other researchers, we think that such predictors might represent, to a large extent, a predictor of phenotype linked to prognosis [24, 28]. A last remark interests, once again, the wide spectrum of prediction. How is this performance possible despite breast cancer heterogeneity, revealed at the molecular level by numerous and concordant gene profiling studies? We propose that the information contained in our 38-GES relates to a common molecular background, in node-positive and node-negative patients, linked to bad outcome prediction, on the basis of all of our evaluation results, and especially to those obtained by using node-negative cohorts (e.g., Wang's cohort). Furthermore, the biological relevance of the majority of the selected genes strengthens this hypothesis. Disparity of prediction of our 38-GES could let us conclude that this GES is dominated by bad prognosis-associated genes which are also predictive of general chemotherapy sensitivity [29].

Acknowledgments This study was supported by SANOFI-AVENTIS-France, PFIZER-France and Cancéropôle Grand Ouest. A part of the tissues used in this work was provided by Institut Régional du Cancer Nantes-Atlantique tumor bank, funded by the Institut National du Cancer and the Cancéropôle Grand Ouest. We thank M. Martin, E. Ollivier, N. Roi and E. Beguet for technical assistance.

References

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–752. doi:10.1038/35021093
2. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10869–10874. doi:10.1073/pnas.191367098
3. Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530–536. doi:10.1038/415530a
4. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ et al (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347:1999–2009. doi:10.1056/NEJMoa021967
5. Wang Y, Klijn JGM, Zhang Y et al (2005) Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 365:671–679
6. Paik S, Shak S, Tang G et al (2004) A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351:2817–2826. doi:10.1056/NEJMoa041588
7. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD et al (2004) A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 5:607–616. doi:10.1016/j.ccr.2004.05.015
8. Roché H, Fumoleau P, Spielmann M et al (2006) Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the PACS01 trial. *J Clin Oncol* 24:5664–5671. doi:10.1200/JCO.2006.07.3916
9. Campone M, Campion L, Roché H et al (2008) Prediction of metastatic relapse in node-positive breast cancer: establishment

- of a clinicogenomic model after FEC100 adjuvant regimen. *Breast Cancer Res Treat* 109:491–501. doi:[10.1007/s10549-007-9673-x](https://doi.org/10.1007/s10549-007-9673-x)
10. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM et al (2003) Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10393–10398. doi:[10.1073/pnas.1732912100](https://doi.org/10.1073/pnas.1732912100)
 11. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S et al (2006) Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 98:262–272
 12. Pawitan Y, Bjohle J, Amler L et al (2005) Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts. *Breast Cancer Res* 7:R953–R964. doi:[10.1186/bcr1325](https://doi.org/10.1186/bcr1325)
 13. Ivshina AV, George J, Senko O et al (2006) Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. *Cancer Res* 66:10292–10301. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-05-4414](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4414)
 14. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ et al (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294–5299. doi:[10.1021/bi00591a005](https://doi.org/10.1021/bi00591a005)
 15. Magrangeas F, Nasser V, Avet-Loiseau H et al (2003) Gene expression profiling of multiple myeloma reveals molecular portraits in relation to the pathogenesis of the disease. *Blood* 101:4998–5006. doi:[10.1182/blood-2002-11-3385](https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3385)
 16. Decaux O, Lodé L, Magrangeas F et al (2008) Prediction of survival in multiple myeloma based on gene-expression profiles revealed cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients. *J Clin Oncol* 26:4798–4805. doi:[10.1200/JCO.2007.13.8545](https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.8545)
 17. Heagerty PJ, Lumley T, Pepe MS (2000) Time-dependent ROC curves for recurrence and 15-survival data and a diagnostic marker. *Biometrics* 56:337–344. doi:[10.1111/j.0006-341X.2000.00337.x](https://doi.org/10.1111/j.0006-341X.2000.00337.x)
 18. Dupuy A, Simon RM (2007) Critical review of published microarray studies for cancer outcome and guidelines on statistical analysis and reporting. *J Natl Cancer Inst* 99:147–157. doi:[10.1093/jnci/djk018](https://doi.org/10.1093/jnci/djk018)
 19. Simon R (2005) Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers. *J Clin Oncol* 23:7332–7341. doi:[10.1200/JCO.2005.02.8712](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.8712)
 20. Tinker AV, Boussioutas A, Bowtell DDL (2006) The challenges of gene expression microarrays for the study of human cancer. *Cancer Cell* 9:333–339. doi:[10.1016/j.ccr.2006.05.001](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.05.001)
 21. Sparano JA, Paik S (2008) Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 26:721–728. doi:[10.1200/JCO.2007.15.1068](https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.1068)
 22. Habel LA, Shak S, Jacobs MK et al (2006) A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res* 8:R25. doi:[10.1186/bcr1412](https://doi.org/10.1186/bcr1412)
 23. Gianni L, Zambetti M, Clark K et al (2005) Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 23:7265–7277. doi:[10.1200/JCO.2005.02.0818](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.0818)
 24. Fisher B, Dignam J, Wolmark N et al (1997) Tamoxifen and chemotherapy for lymph node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 89:1673–1682. doi:[10.1093/jnci/89.22.1673](https://doi.org/10.1093/jnci/89.22.1673)
 25. Paik S, Tang G, Shak S et al (2006) Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, Estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 24:3726–3734. doi:[10.1200/JCO.2005.04.7985](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.7985)
 26. Albain K, Barlow W, Shak S et al (2007) Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal, node-positive, ER-positive breast cancer (S8814,INT0100). Presented at 30th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio
 27. Goldstein LJ, Gray R, Badve S et al (2008) Prognostic utility of the 21-gene assay in hormone receptor positive operable breast cancer compared with Adjuvant! an integrator of clinicopathologic and treatment information. *J Clin Oncol* 26:4063–4071
 28. Van de Vijver MJ (2007) Gene-expression profiling and the future of adjuvant therapy. *Oncologist* 10(Suppl 2):30–34. doi:[10.1634/theoncologist.10-90002-30](https://doi.org/10.1634/theoncologist.10-90002-30)
 29. Pusztai L, Anderson K, Hess KR (2007) Pharmacogenomic predictor discovery in phase II clinical trials for breast cancer. *Clin Cancer Res* 13:6080–6086. doi:[10.1158/1078-0432.CCR-07-0809](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0809)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acehan, Devrim, Xuejun Jiang, David Gene Morgan, John E Heuser, Xiaodong Wang, et Christopher W Akey. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular Cell* 9, n°. 2 (Février): 423-432.

Adams, J M, et S Cory. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, n°. 9 (Février 26): 1324-1337.

Aggarwal, Bharat B, Ajaikumar B Kunnumakkara, Kuzhuvelil B Harikumar, Shan R Gupta, Sheeja T Tharakan, Cemile Koca, Sanjit Dey, et Bokyung Sung. 2009. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1171 (Août): 59-76.

Agus, David B, Robert W Akita, William D Fox, Gail D Lewis, Brian Higgins, Paul I Pisacane, Julie A Lofgren, et al. 2002. Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell* 2, n°. 2 (Août): 127-137.

Ahnstrom M, Nordenskjold B, Rutqvist LE, Skoog L, et Stal O. 2005. Role of cyclin D1 in ErbB2-positive breast cancer and tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat* 91: 145-151.

Akao, Y, Y Otsuki, S Kataoka, Y Ito, et Y Tsujimoto. 1994. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Research* 54, n° 9 (Mai 1): 2468-2471.

Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, et Yamamoto T. 1986. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 232: 1644-1646.

Akgul, C. 2009. Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 66, n°. 8 (Avril): 1326-1336.

Alessi, D R, M Andjelkovic, B Caudwell, P Cron, N Morrice, P Cohen, et B A Hemmings. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal* 15, n°. 23 (Décembre 2): 6541-6551.

Alessi, Dario R, Laura R Pearce, et Juan M García-Martínez. 2009. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Science Signaling* 2, n°. 67: pe27.

Ali, Simak, et R Charles Coombes. 2002. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature Reviews. Cancer* 2, n°. 2 (Février): 101-112.

Amanullah, Arshad, Dan A Liebermann, et Barbara Hoffman. 2002. Deregulated c-Myc prematurely recruits both Type I and II CD95/Fas apoptotic pathways associated with terminal myeloid differentiation. *Oncogene* 21, n°. 10 (Février 28): 1600-1610.

Amundson, S A, T G Myers, et A J Fornace. 1998. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 17, n°. 25 (Décembre 24): 3287-3299.

Andrade, M A, et P Bork. 1995. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature Genetics* 11, n°. 2 (Octobre): 115-116.

Andrechek ER, Hardy WR, Siegel PM, Rudnicki MA, Cardiff RD, et Muller WJ. 2000. Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3444-3449.

Anido, Judit, Maurizio Scaltriti, Joan Josep Bech Serra, Belén Santiago Josefát, Federico Rojo Todo, José Baselga, et Joaquín Arribas. 2006. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *The EMBO Journal* 25, n°. 13 (Juillet 12): 3234-3244.

Annis, Matthew G, Erinn L Soucie, Paulina J Dlugosz, Jorge A Cruz-Aguado, Linda Z Penn, Brian Leber, et David W Andrews. 2005. Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *The EMBO Journal* 24, n°. 12 (Juin 15): 2096-2103.

Antonsson, B, S Montessuit, B Sanchez, et J C Martinou. 2001. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276, n°. 15 (Avril 13): 11615-11623.

Aranda V, Haire T, Nolan ME, Calarco JP, Rosenberg AZ, et Fawcett JP. 2006. Par6-aPKC uncouples ErbB2 induced disruption of polarized epithelial organization from proliferation control. *Nat Cell Biol* 8: 1235-1245.

Aristarkhov, A, E Eytan, A Moghe, A Admon, A Hershko, et J V Ruderman. 1996. E2-C, a cyclin-selective ubiquitin carrier protein required for the destruction of mitotic cyclins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, n°. 9 (Avril 30): 4294-4299.

Arnold, Alan A, Amro Aboukameel, Jianyong Chen, Dajun Yang, Shaomeng Wang, Ayad Al-Katib, et Ramzi M Mohammad. 2008. Preclinical studies of Apogossypolone: a new nonpeptidic pan small-molecule inhibitor of Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 proteins in Follicular Small Cleaved Cell Lymphoma model. *Molecular Cancer* 7: 20.

Arnoult, Damien, Brigitte Gaume, Mariusz Karbowski, Juanita C Sharpe, Francesco Cecconi, et Richard J Youle. 2003. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *The EMBO Journal* 22, n°. 17 (Septembre 1): 4385-4399.

Arnoult, Damien, Neggy Rismanchi, Alain Grodet, Roland G Roberts, Daniel P Seeburg, Jérôme Estaquier, Morgan Sheng, et Craig Blackstone. 2005. Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Current Biology: CB* 15, n°. 23 (Décembre 6): 2112-2118.

Arokium, Hubert, Nadine Camougrand, François M Vallette, et Stéphen Manon. 2004. Studies of the interaction of substituted mutants of BAX with yeast mitochondria reveal that the C-terminal hydrophobic alpha-helix is a second ART sequence and plays a role in the interaction with anti-apoptotic Bcl-xL. *The Journal of Biological Chemistry* 279, n°. 50 (Décembre 10): 52566-52573.

Arpino, Grazia, Lisa Wiechmann, C Kent Osborne, et Rachel Schiff. 2008. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocrine Reviews* 29, n°. 2 (Avril): 217-233.

Asanuma, Hiroko, Toshihiko Torigoe, Kenjiro Kamiguchi, Yoshihiko Hirohashi, Tousei Ohmura, Koichi Hirata, Masaaki Sato, et Noriyuki Sato. 2005a. Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Research* 65, n°. 23 (Décembre 1): 11018-11025.

Ashkenazi, A, et V M Dixit. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N. Y.)* 281, n°. 5381 (Août 28): 1305-1308.

Bae, J, C P Leo, S Y Hsu, et A J Hsueh. 2000. MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *The Journal of Biological Chemistry* 275, n°. 33 (Août 18): 25255-25261.

Baker, S J, et E P Reddy. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17, n°. 25 (Décembre 24): 3261-3270.

Balasenthil, Seetharaman, Christopher J Barnes, Suresh K Rayala, et Rakesh Kumar. 2004. Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS Letters* 567, n°. 2 (Juin 4): 243-247.

Banerjee, Sanjeev, Minsig Choi, Amro Aboukameel, Zhiwei Wang, Mussop Mohammad, Jianyong Chen, Dajun Yang, Fazlul H Sarkar, et Ramzi M Mohammad. 2010. Preclinical studies of apogossypolone, a novel pan inhibitor of bcl-2 and mcl-1, synergistically potentiates cytotoxic effect of gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Pancreas* 39, n°. 3 (Avril): 323-331.

Barry, M, J A Heibein, M J Pinkoski, S F Lee, R W Moyer, D R Green, et R C Bleackley. 2000. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Molecular and Cellular Biology* 20, n°. 11 (Juin): 3781-3794.

Basañez, Gorka, Juanita C Sharpe, Jennifer Galanis, Teresa B Brandt, J Marie Hardwick, et Joshua Zimmerberg. 2002. Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *The Journal of Biological Chemistry* 277, n°. 51 (Décembre 20): 49360-49365.

Baselga, José, et Sandra M Swain. 2009. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature Reviews. Cancer* 9, n°. 7 (Juillet): 463-475.

Baudino, T A, et J L Cleveland. 2001. The Max network gone mad. *Molecular and Cellular Biology* 21, n°. 3 (Février): 691-702.

Beerli RR, Wels W, et Hynes NE. 1994. Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation. *J Biol Chem* 269: 23931-23936.

Bellot, G, P-F Cartron, E Er, L Oliver, P Juin, L C Armstrong, P Bornstein, K Mihara, S Manon, et F M Vallette. 2007. TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax. *Cell Death and Differentiation* 14, n°. 4 (Avril): 785-794.

Benlimame N, He Q, Jie S, Xiao D, Xu YJ, et Loignon M. 2005. FAK signaling is critical for ErbB-2//ErbB-3 receptor cooperation for oncogenic transformation and invasion. *J Cell Biol* 171: 505-516.

Bennett, M, K Macdonald, S W Chan, J P Luzio, R Simari, et P Weissberg. 1998. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 282, n°. 5387 (Octobre 9): 290-293.

Bensaad, Karim, Atsushi Tsuruta, Mary A Selak, M Nieves Calvo Vidal, Katsunori Nakano, Ramon Bartrons, Eyal Gottlieb, et Karen H Vousden. 2006. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126, n°. 1 (Juillet 14): 107-120.

Benz, C C, G K Scott, J C Sarup, R M Johnson, D Tripathy, E Coronado, H M Shepard, et C K Osborne. 1992. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Research and Treatment* 24, n°. 2: 85-95.

Berger MB, Mendrola JM, et Lemmon MA. 2004. ErbB3//HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Lett* 569: 332-336.

Bernal, A, et D A Kimbrell. 2000. Drosophila Thor participates in host immune defense and connects a translational regulator with innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, n°. 11 (Mai 23): 6019-6024.

Bettaieb, Ali, Laurence Dubrez-Daloz, Sophie Launay, Stéphanie Plenchette, Cédric Rébé, Séverine Cathelin, et Eric Solary. 2003. Bcl-2 proteins: targets and tools for chemosensitisation of tumor cells. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents* 3, n°. 4 (Juillet): 307-318.

Bild, Andrea H, Joel S Parker, Adam M Gustafson, Chaitanya R Acharya, Katherine A Hoadley, Carey Anders, P Kelly Marcom, et al. 2009. An integration of complementary strategies for gene-expression analysis to reveal novel therapeutic opportunities for breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR* 11, n°. 4: R55.

Bild, Andrea H, Guang Yao, Jeffrey T Chang, Quanli Wang, Anil Potti, Dawn Chasse, Mary-Beth Joshi, et al. 2006. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 439, n°. 7074 (Janvier 19): 353-357.

Bingle, C D, R W Craig, B M Swales, V Singleton, P Zhou, et M K Whyte. 2000. Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology domain 3 only gene product that promotes cell death. *The Journal of Biological Chemistry* 275, n°. 29 (Juillet 21): 22136-22146.

Bivona, Trevor G, Steven E Quatela, Brian O Bodemann, Ian M Ahearn, Michael J Soskis, Adam Mor, John Miura, et al. 2006. PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-xL on mitochondria and induces apoptosis. *Molecular Cell* 21, n°. 4 (Février 17): 481-493.

Boise, L H, M González-García, C E Postema, L Ding, T Lindsten, L A Turka, X Mao, G Nuñez, et C B Thompson. 1993. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, n°. 4 (Août 27): 597-608.

Boonstra, Johannes, et Jan Andries Post. 2004. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337 (Août 4): 1-13.

Bosotti, R, A Isacchi, et E L Sonnhhammer. 2000. FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends in Biochemical Sciences* 25, n°. 5 (Mai): 225-227.

Bossy-Wetzel, E, D D Newmeyer, et D R Green. 1998. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *The EMBO Journal* 17, n°. 1 (Janvier 2): 37-49.

Bouchard L, Lamarre L, Tremblay PJ, et Jolicoeur P. 1989. Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV//c-neu oncogene. *Cell* 57: 931-936.

Bouchard, Caroline, Soyoung Lee, Viola Paulus-Hock, Christoph Loddenkemper, Martin Eilers, et Clemens A Schmitt. 2007. FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf. *Genes & Development* 21, n°. 21 (Novembre 1): 2775-2787.

Bouillet, P, L C Zhang, D C Huang, G C Webb, C D Bottema, P Shore, H J Eyre, G R Sutherland, et J M Adams. 2001. Gene structure alternative splicing, and chromosomal localization of pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 12, n°. 2 (Février): 163-168.

Boyd, J M, G J Gallo, B Elangovan, A B Houghton, S Malstrom, B J Avery, R G Ebb, T Subramanian, T Chittenden, et R J Lutz. 1995. Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* 11, n°. 9 (Novembre 2): 1921-1928.

Bray, Kevin, Hsin-Yi Chen, Cristina M Karp, Michael May, Shridar Ganesan, Vassiliki Karantza-Wadsworth, Robert S DiPaola, et Eileen White. 2009. Bcl-2 modulation to activate apoptosis in prostate cancer. *Molecular Cancer Research: MCR* 7, n°. 9 (Septembre): 1487-1496.

Brugarolas, J, C Chandrasekaran, J I Gordon, D Beach, T Jacks, et G J Hannon. 1995. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377, n°. 6549 (Octobre 12): 552-557.

Brugarolas, James, Kui Lei, Rebecca L Hurley, Brendan D Manning, Jan H Reiling, Ernst Hafen, Lee A Witters, Leif W Ellisen, et William G Kaelin. 2004. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & Development* 18, n°. 23 (Décembre 1): 2893-2904.

Brunn, G J, C C Hudson, A Sekulić, J M Williams, H Hosoi, P J Houghton, J C Lawrence, et R T Abraham. 1997. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science (New York, N.Y.)* 277, n°. 5322 (Juillet 4): 99-101.

Brunner, Thomas, et Seamus J Martin. 2004. c-Myc: where death and division collide. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 3, n°. 4 (Avril): 456-459.

Bryant, Helen E, Niklas Schultz, Huw D Thomas, Kayan M Parker, Dan Flower, Elena Lopez, Suzanne Kyle, Mark Meuth, Nicola J Curtin, et Thomas Helleday. 2005. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, n°. 7035 (Avril 14): 913-917.

Bunone, G, P A Briand, R J Miksicek, et D Picard. 1996. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *The EMBO Journal* 15, n°. 9 (Mai 1): 2174-2183.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, et Leahy DJ. 2003. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF//ErbB receptors. *Mol Cell* 12: 541-552.

Burnett, P E, R K Barrow, N A Cohen, S H Snyder, et D M Sabatini. 1998. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, n°. 4 (Février 17): 1432-1437.

Cahill, D P, C Lengauer, J Yu, G J Riggins, J K Willson, S D Markowitz, K W Kinzler, et B Vogelstein. 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392, n°. 6673 (Mars 19): 300-303.

Cain, Kelvin, Shawn B Bratton, et Gerald M Cohen. 2002. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84, n°. 2 (Mars): 203-214.

Campàs, Clara, Ana M Cosialls, Montserrat Barragán, Daniel Iglesias-Serret, Antonio F Santidrián, Llorenç Coll-Mulet, Mercè de Frias, Alicia Domingo, Gabriel Pons, et Joan Gil. 2006. Bcl-2 inhibitors induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Experimental Hematology* 34, n°. 12 (Décembre): 1663-1669.

Campbell, R A, P Bhat-Nakshatri, N M Patel, D Constantinidou, S Ali, et H Nakshatri. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *The Journal of Biological Chemistry* 276, n°. 13 (Mars 30): 9817-9824.

Campone, Mario, Loïc Campion, Henry Roché, Wilfried Gouraud, Catherine Charbonnel, Florence Magrangeas, Stéphane Minvielle, et al. 2008. Prediction of metastatic relapse in node-positive breast cancer: establishment of a clinicogenomic model after FEC100 adjuvant regimen. *Breast Cancer Research and Treatment* 109, n°. 3 (Juin): 491-501.

Campone M, Noel B, Gouraud W, Jézéquel P, Barillé-Nion S, Juin P. mTORC1 Activity Contributes to the Mcl-1 Dependence of HER2 Amplified Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 2009; 69 (Suppl.): (24). December 15, abstract: 2161.

Cao, Xuefang, Richard L Bennett, et W Stratford May. 2008. c-Myc and caspase-2 are involved in activating Bax during cytotoxic drug-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 283, n°. 21 (Mai 23): 14490-14496..

Cao, Xuefang, Xingming Deng, et W Stratford May. 2003. Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. *Blood* 102, n°. 7 (Octobre 1): 2605-2614.

Carracedo, Arkaitz, Li Ma, Julie Teruya-Feldstein, Federico Rojo, Leonardo Salmena, Andrea Alimonti, Ainara Egia, et al. 2008. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 118, n°. 9 (Septembre): 3065-3074.

Carter, P, L Presta, C M Gorman, J B Ridgway, D Henner, W L Wong, A M Rowland, C Kotts, M E Carver, et H M Shepard. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, n°. 10 (Mai 15): 4285-4289.

Cartron, Pierre-François, Lisa Oliver, Stéphane Martin, Carole Moreau, Marie-Thérèse LeCabellec, Pascal Jezequel, Khaled Meflah, et François M Vallette. 2002. The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. *Human Molecular Genetics* 11, n°. 6 (Mars 15): 675-687.

Cartron, Pierre-François, Philippe Juin, Lisa Oliver, Stéphane Martin, Khaled Meflah, et François M Vallette. 2003. Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 23, n°. 13 (Juillet): 4701-4712.

Cartron, Pierre-François, Muriel Priault, Lisa Oliver, Khaled Meflah, Stephen Manon, et François M Vallette. 2003. The N-terminal end of Bax contains a mitochondrial-targeting signal. *The Journal of Biological Chemistry* 278, n°. 13 (Mars 28): 11633-11641.

Cartron, Pierre-François, Lisa Oliver, Philippe Juin, Khaled Meflah, et François M Vallette. 2004. The p18 truncated form of Bax behaves like a Bcl-2 homology domain 3-only protein. *The Journal of Biological Chemistry* 279, n°. 12 (Mars 19): 11503-11512.

Cartron, Pierre-François, Tristan Gallenne, Gwenola Bougras, Fabien Gautier, Florence Manero, Patricia Vusio, Khaled Meflah, François M Vallette, et Philippe Juin. 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, n°. 5 (Décembre 3): 807-818

Cartron, Pierre François, Lisa Oliver, Ebrahim Mayat, Khaled Meflah, et François M Vallette. 2004. Impact of pH on Bax alpha conformation, oligomerisation and mitochondrial integration. *FEBS Letters* 578, n°. 1 (Décembre 3): 41-46.

Cartron, Pierre-François, Hubert Arokium, Lisa Oliver, Khaled Meflah, Stephen Manon, et François M Vallette. 2005. Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 280, n°. 11 (Mars 18): 10587-10598.

Cecconi, F. 1999. Apaf1 and the apoptotic machinery. *Cell Death and Differentiation* 6, n°. 11 (Novembre): 1087-1098.

Certo, Michael, Victoria Del Gaizo Moore, Mari Nishino, Guo Wei, Stanley Korsmeyer, Scott A Armstrong, et Anthony Letai. 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9, n°. 5 (Mai): 351-365.

Chan, Shing-Leng, Mei Chin Lee, Kuan Onn Tan, Lay-Kien Yang, Alex S Y Lee, Horst Flotow, Nai Yang Fu, et al. 2003. Identification of chelerythrine as an inhibitor of BclXL function. *The Journal of Biological Chemistry* 278, n°. 23 (Juin 6): 20453-20456.

Chan, Shing-Leng, et Victor C Yu. 2004. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 31, n°. 3 (Mars): 119-128.

Chan, T A, H Hermeking, C Lengauer, K W Kinzler, et B Vogelstein. 1999. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401, n°. 6753 (Octobre 7): 616-620.

Chauhan, D, M Velankar, M Brahmandam, T Hideshima, K Podar, P Richardson, R Schlossman, et al. 2007. A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma. *Oncogene* 26, n°. 16 (Avril 5): 2374-2380.

Chazin VR, Kaleko M, Miller AD, et Slamon DJ. 1992. Transformation mediated by the human HER-2 gene independent of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 7: 1859-1866.

Chen, C, L C Edelstein, et C Gélinas. 2000. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Molecular and Cellular Biology* 20, n°. 8 (Avril): 2687-2695.

Chen, J, X F Zheng, E J Brown, et S L Schreiber. 1995. Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, n°. 11 (Mai 23): 4947-4951.

Chen, Lin, Simon N Willis, Andrew Wei, Brian J Smith, Jamie I Fletcher, Mark G Hinds, Peter M Colman, Catherine L Day, Jerry M Adams, et David C S Huang. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell* 17, n°. 3 (Février 4): 393-403.

Chen, Shuang, Yun Dai, Hisashi Harada, Paul Dent, et Steven Grant. 2007. Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Research* 67, n°. 2 (Janvier 15): 782-791.

Cheng, E H, D G Kirsch, R J Clem, R Ravi, M B Kastan, A Bedi, K Ueno, et J M Hardwick. 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science (New York, N.Y.)* 278, n°. 5345 (Décembre 12): 1966-1968.

Chin, P L, J Momand, et G P Pfeifer. 1997. In vivo evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation. *Oncogene* 15, n°. 1 (Juillet 3): 87-99.

Chipuk, Jerry E, Tomomi Kuwana, Lisa Bouchier-Hayes, Nathalie M Droin, Donald D Newmeyer, Martin Schuler, et Douglas R Green. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 303, n°. 5660 (Février 13): 1010-1014.

Chittenden, T, E A Harrington, R O'Connor, C Flemington, R J Lutz, G I Evan, et B C Guild. 1995. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, n°. 6524 (Avril 20): 733-736.

Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, et Denney Jr DW. 2003. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421: 756-760.

Choi, J, J Chen, S L Schreiber, et J Clardy. 1996. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science (New York, N.Y.)* 273, n°. 5272 (Juillet 12): 239-242.

Choi, Jae H, Paula G Bertram, Ryan Drenan, John Carvalho, Heather H Zhou, et X F Steven Zheng. 2002. The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase. *EMBO Reports* 3, n°. 10 (Octobre): 988-994.

Chonghaile, T Ni, et A Letai. 2008a. Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* 27 Suppl 1 (Décembre): S149-157.

Chou, J J, H Li, G S Salvesen, J Yuan, et G Wagner. 1999. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 96, n°. 5 (Mars 5): 615-624.

Chung, Yih-Lin, Meei-Ling Sheu, Shun-Chun Yang, Chi-Hung Lin, et Sang-Hue Yen. 2002. Resistance to tamoxifen-induced apoptosis is associated with direct interaction between Her2/neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 97, n°. 3 (Janvier 20): 306-312.

Cimmino, Amelia, George Adrian Calin, Muller Fabbri, Marilena V Iorio, Manuela Ferracin, Masayoshi Shimizu, Sylwia E Wojcik, et al. 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, n°. 39 (Septembre 27): 13944-13949.

Clem, R J, E H Cheng, C L Karp, D G Kirsch, K Ueno, A Takahashi, M B Kastan, et al. 1998. Modulation of cell death by Bcl-xL through caspase interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, n°. 2 (Janvier 20): 554-559.

Clynes, R A, T L Towers, L G Presta, et J V Ravetch. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine* 6, n°. 4 (Avril): 443-446.

Collins, Sean R, Kyle M Miller, Nancy L Maas, Assen Roguev, Jeffrey Fillingham, Clement S Chu, Maya Schuldiner, et al. 2007. Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* 446, n°. 7137 (Avril 12): 806-810.

Corradetti, Michael N, Ken Inoki, et Kun-Liang Guan. 2005. The stress-induced proteins RTP801 and RTP801L are negative regulators of the mammalian target of rapamycin pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 280, n°. 11 (Mars 18): 9769-9772.

Crichton, Diane, Simon Wilkinson, Jim O'Prey, Nelofer Syed, Paul Smith, Paul R Harrison, Milena Gasco, Ornella Garrone, Tim Crook, et Kevin M Ryan. 2006. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126, n°. 1 (Juillet 14): 121-134.

Crino, Peter B, Katherine L Nathanson, et Elizabeth Petri Henske. 2006. The tuberous sclerosis complex. *The New England Journal of Medicine* 355, n°. 13 (Septembre 28): 1345-1356.

Croxton, Rhonda, Yihong Ma, Lanxi Song, Eric B Haura, et W Douglas Cress. 2002. Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene* 21, n°. 9 (Février 21): 1359-1369.

Cuddeback, S M, H Yamaguchi, K Komatsu, T Miyashita, M Yamada, C Wu, S Singh, et H G Wang. 2001. Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *The Journal of Biological Chemistry* 276, n°. 23 (Juin 8): 20559-20565.

Cuello, M, S A Ettenberg, A S Clark, M M Keane, R H Posner, M M Nau, P A Dennis, et S Lipkowitz. 2001. Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Research* 61, n°. 12 (Juin 15): 4892-4900.

Cunningham, John T, Joseph T Rodgers, Daniel H Arlow, Francisca Vazquez, Vamsi K Mootha, et Pere Puigserver. 2007. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450, n°. 7170 (Novembre 29): 736-740.

Dai, Zunyan, Shujun Liu, Guido Marcucci, et Wolfgang Sadee. 2006. 5-Aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide synergistically induce expression of BIK (BCL2-interacting killer). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351, n°. 2 (Décembre 15): 455-461.

Dang, Chi V, Kathryn A O'donnell, et Tarja Juopperi. 2005. The great MYC escape in tumorigenesis. *Cancer Cell* 8, n°. 3 (Septembre): 177-178.

Dang, Chi V, Kathryn A O'Donnell, Karen I Zeller, Tam Nguyen, Rebecca C Osthus, et Feng Li. 2006. The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology* 16, n°. 4 (Août): 253-264.

Datta, R, D Banach, H Kojima, R V Talanian, E S Alnemri, W W Wong, et D W Kufe. 1996. Activation of the CPP32 protease in apoptosis induced by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. *Blood* 88, n°. 6 (Septembre 15): 1936-1943.

Day, Catherine L, Lin Chen, Sarah J Richardson, Penny J Harrison, David C S Huang, et Mark G Hinds. 2005. Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *The Journal of Biological Chemistry* 280, n°. 6 (Février 11): 4738-4744.

Day, Catherine L, Callum Smits, F Cindy Fan, Erinna F Lee, W Douglas Fairlie, et Mark G Hinds. 2008. Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1. *Journal of Molecular Biology* 380, n°. 5 (Juillet 25): 958-971.

De Giorgi, FrancescaA, Lydia Lartigue, Manuel K A Bauer, Alexis Schubert, Stefan Grimm, George T Hanson, S James Remington, Richard J Youle, et François Ichas. 2002. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16, n°. 6 (Avril): 607-609.

DeBerardinis, Ralph J, Anthony Mancuso, Evgueni Daikhin, Ilana Nissim, Marc Yudkoff, Suzanne Wehrli, et Craig B Thompson. 2007. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, n°. 49 (Décembre 4): 19345-19350.

Degterev, A, A Lugovskoy, M Cardone, B Mulley, G Wagner, T Mitchison, et J Yuan. 2001. Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nature Cell Biology* 3, n°. 2 (Février): 173-182.

Dejean, Laurent M, Sonia Martinez-Caballero, Stephen Manon, et Kathleen W Kinnally. 2006. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1762, n°. 2 (Février): 191-201.

Deng, C, P Zhang, J W Harper, S J Elledge, et P Leder. 1995. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, n°. 4 (Août 25): 675-684.

Deng, Jing, Nicole Carlson, Kunihiro Takeyama, Paola Dal Cin, Margaret Shipp, et Anthony Letai. 2007. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* 12, n°. 2 (Août): 171-185.

Deng, Xingming, Fengqin Gao, Tammy Flagg, et W Stratford May. 2004. Mono- and multisite phosphorylation enhances Bcl2's antiapoptotic function and inhibition of cell cycle entry functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, n°. 1 (Janvier 6): 153-158.

Denko, N C, A J Giaccia, J R Stringer, et P J Stambrook. 1994. The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, n°. 11 (Mai 24): 5124-5128.

Denoyelle, Christophe, George Abou-Rjaily, Vladimir Bezrookove, Monique Verhaegen, Timothy M Johnson, Douglas R Fullen, Jenny N Pointer, et al. 2006. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nature Cell Biology* 8, n°. 10 (Octobre): 1053-1063.

Desagher, S, et J C Martinou. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 10, n°. 9 (Septembre): 369-377.

Desagher, S, A Osen-Sand, A Nichols, R Eskes, S Montessuit, S Lauper, K Maundrell, B Antonsson, et J C Martinou. 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 144, n°. 5 (Mars 8): 891-901.

Deveraux, Q L, et J C Reed. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes & Development* 13, n°. 3 (Février 1): 239-252.

Deverman, Benjamin E, Brian L Cook, Scott R Manson, Robert A Niederhoff, Ellen M Langer, Ivana Rosová, Laura A Kulans, et al. 2002. Bcl-xL deamidation is a critical switch in the regulation of the response to DNA damage. *Cell* 111, n°. 1 (Octobre 4): 51-62.

DeYoung, Maurice Phillip, Peter Horak, Avi Sofer, Dennis Sgroi, et Leif W Ellisen. 2008. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes & Development* 22, n°. 2 (Janvier 15): 239-251.

Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, et Aaronson SA. 1987. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH//3T3 cells. *Science* 237: 178-182.

Ding, Li, Matthew J Ellis, Shunqiang Li, David E Larson, Ken Chen, John W Wallis, Christopher C Harris, et al. 2010. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* 464, n°. 7291 (Avril 15): 999-1005.

Di Micco, Raffaella, Marzia Fumagalli, Angelo Cicalese, Sara Piccinin, Patrizia Gasparini, Chiara Luise, Catherine Schurra, et al. 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, n°. 7119 (Novembre 30): 638-642.

Diermeier, Simone, Gábor Horváth, Ruth Knuechel-Clarke, Ferdinand Hofstaedter, János Szöllosi, et Gero Brockhoff. 2005. Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Experimental Cell Research* 304, n°. 2 (Avril 1): 604-619.

Dijkers, P F, R H Medema, J W Lammers, L Koenderman, et P J Coffey. 2000. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Current Biology: CB* 10, n°. 19 (Octobre 5): 1201-1204.

Donovan JC, Milic A, et Slingerland JM. 2001. Constitutive MEK//MAPK activation leads to p27(Kip1) deregulation and antiestrogen resistance in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 276: 40888-40895.

Doshi, Jignesh M, Defeng Tian, et Chengguo Xing. 2006. Structure-activity relationship studies of ethyl 2-amino-6-bromo-4-(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethyl)-4H-chromene-3-carboxylate (HA 14-1), an antagonist for antiapoptotic Bcl-2 proteins to overcome drug resistance in cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* 49, n°. 26 (Décembre 28): 7731-7739.

Dowling, Ryan J.O., Ivan Topisirovic, Bruno D. Fonseca, et Nahum Sonenberg. 2010. Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1804, n°. 3 (Mars): 433-439.

Dowsett, Mitch, Ian E Smith, Stephen R Ebbs, J Michael Dixon, Anthony Skene, Roger A'Hern, Janine Salter, Simone Detre, Margaret Hills, et Geraldine Walsh. 2007. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 99, n°. 2 (Janvier 17): 167-170.

Duan, H, et V M Dixit. 1997. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 385, n°. 6611 (Janvier 2): 86-89.

Dumont, C, A Dürrbach, N Bidère, M Rouleau, G Kroemer, G Bernard, F Hirsch, B Charpentier, S A Susin, et A Senik. 2000. Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood T lymphocytes: reversibility at low apoptotic insult. *Blood* 96, n°. 3 (Août 1): 1030-1038.

Efeyan, Alejo, et David M Sabatini. 2010. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Current Opinion in Cell Biology* 22, n°. 2 (Avril): 169-176.

Eisenman, R N. 2000. The Max network: coordinated transcriptional regulation of cell growth and proliferation. *Harvey Lectures* 96: 1-32.

Eischen, C M, G Packham, J Nip, B E Fee, S W Hiebert, G P Zambetti, et J L Cleveland. 2001. Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. *Oncogene* 20, n°. 48 (Octobre 25): 6983-6993.

Enyedy, I J, Y Ling, K Nacro, Y Tomita, X Wu, Y Cao, R Guo, et al. 2001. Discovery of small-molecule inhibitors of Bcl-2 through structure-based computer screening. *Journal of Medicinal Chemistry* 44, n°. 25 (Décembre 6): 4313-4324.

Er, Emine, Lisa Oliver, Pierre-François Cartron, Philippe Juin, Stephen Manon, et François M Vallette. 2006. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1757, n°. 9 (Octobre): 1301-1311.

- Ettxebarria, Aitor, Olatz Landeta, Bruno Antonsson, et Gorka Basañez. 2008. Regulation of antiapoptotic MCL-1 function by gossypol: mechanistic insights from in vitro reconstituted systems. *Biochemical Pharmacology* 76, n°. 11 (Décembre 1): 1563-1576.
- Evan, G, et T Littlewood. 1998. A matter of life and cell death. *Science (New York, N.Y.)* 281, n°. 5381 (Août 28): 1317-1322.
- Evan, G I, et T D Littlewood. 1993. The role of c-myc in cell growth. *Current Opinion in Genetics & Development* 3, n°. 1 (Février): 44-49.
- Evan, Gerard I. 2006a. Can't kick that oncogene habit. *Cancer Cell* 10, n°. 5 (Novembre): 345-347.
- Farmer, Hannah, Nuala McCabe, Christopher J Lord, Andrew N J Tutt, Damian A Johnson, Tobias B Richardson, Manuela Santarosa, et al. 2005. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, n°. 7035 (Avril 14): 917-921.
- Farrow, S N, J H White, I Martinou, T Raven, K T Pun, C J Grinham, J C Martinou, et R Brown. 1995. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374, n°. 6524 (Avril 20): 731-733. doi:10.1038/374731a0.
- Felsher, D W, et J M Bishop. 1999. Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, n°. 7 (Mars 30): 3940-3944.
- Feng, Zhaohui, Wenwei Hu, Elisa de Stanchina, Angelika K Teresky, Shengkan Jin, Scott Lowe, et Arnold J Levine. 2007. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Research* 67, n°. 7 (Avril 1): 3043-3053.
- Figtree, Gemma A, Denise McDonald, Hugh Watkins, et Keith M Channon. 2003. Truncated estrogen receptor alpha 46-kDa isoform in human endothelial cells: relationship to acute activation of nitric oxide synthase. *Circulation* 107, n°. 1 (Janvier 7): 120-126.
- Fleishman SJ, Schlessinger J, et Ben-Tal N. 2002. A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15937-15940.
- Font de Mora, J, et M Brown. 2000. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Molecular and Cellular Biology* 20, n°. 14 (Juillet): 5041-5047.

Fortin, Andre, Jason G MacLaurin, Nicole Arbour, Sean P Cregan, Neena Kushwaha, Steven M Callaghan, David S Park, Paul R Albert, et Ruth S Slack. 2004. The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *The Journal of Biological Chemistry* 279, n°. 27 (Juillet 2): 28706-28714.

Foster, Fiona M, Thomas W Owens, Jolanta Tanianis-Hughes, Robert B Clarke, Keith Brennan, Nigel J Bundred, et Charles H Streuli. 2009. Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with ErbB antagonists in breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR* 11, n°. 3: R41.

Frank, S, B Gaume, E S Bergmann-Leitner, W W Leitner, E G Robert, F Catez, C L Smith, et R J Youle. 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental Cell* 1, n°. 4 (Octobre): 515-525.

Franke, T F. 2008. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27, n°. 50 (Octobre 27): 6473-6488.

Frias, Maria A, Carson C Thoreen, Jacob D Jaffe, Wayne Schroder, Tom Sculley, Steven A Carr, et David M Sabatini. 2006. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Current Biology: CB* 16, n°. 18 (Septembre 19): 1865-1870.

Fujise, K, D Zhang, J Liu, et E T Yeh. 2000. Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL-1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *The Journal of Biological Chemistry* 275, n°. 50 (Décembre 15): 39458-39465.

Fulda, S. 2009a. Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 23, n°. 3 (Mars): 467-476.

Gallenne, Tristan, Fabien Gautier, Lisa Oliver, Eric Hervouet, Belinda Noël, John A Hickman, Olivier Geneste, et al. 2009. Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members. *The Journal of Cell Biology* 185, n°. 2 (Avril 20): 279-290.

Gambaletta D, Marchetti A, Benedetti L, Mercurio AM, Sacchi A, et Falcioni R. 2000. Cooperative signaling between alpha(6)beta(4) integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol 3-kinase-dependent invasion. *J Biol Chem* 275: 10604-10610.

Ganem, Neil J, Zuzana Storchova, et David Pellman. 2007. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 17, n°. 2 (Avril): 157-162.

Ganley, Ian G, Du H Lam, Junru Wang, Xiaojun Ding, She Chen, et Xuejun Jiang. 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of Biological Chemistry* 284, n°. 18 (Mai 1): 12297-12305.

García-Martínez, Juan M, et Dario R Alessi. 2008. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *The Biochemical Journal* 416, n°. 3 (Décembre 15): 375-385.

García-Sáez, Ana J, Manuela Coraiola, Mauro Dalla Serra, Ismael Mingarro, Peter Müller, et Jesús Salgado. 2006. Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *The FEBS Journal* 273, n°. 5 (Mars): 971-981.

Gardai, Shyra J, David A Hildeman, Steve K Frankel, Ben B Whitlock, S Courtney Frasch, Niels Borregaard, Philippa Marrack, Donna L Bratton, et Peter M Henson. 2004. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry* 279, n°. 20 (Mai 14): 21085-21095.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, et Lovrecz GO. 2003. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 11: 495-505.

Gatza, Michael L, Joseph E Lucas, William T Barry, Jong Wook Kim, Quanli Wang, Matthew D Crawford, Michael B Datto, et al. 2010. A pathway-based classification of human breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, n°. 15 (Avril 13): 6994-6999.

Gee, J M W, M E Harper, I R Hutcheson, T A Madden, D Barrow, J M Knowlden, R A McClelland, N Jordan, A E Wakeling, et R I Nicholson. 2003. The antiepidermal growth factor receptor agent gefitinib (ZD1839/Iressa) improves antihormone response and prevents development of resistance in breast cancer in vitro. *Endocrinology* 144, n°. 11 (Novembre): 5105-5117.

Gilley, Jonathan, Paul J Coffey, et Jonathan Ham. 2003. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *The Journal of Cell Biology* 162, n°. 4 (Août 18): 613-622.

Gingras, A C, B Raught, et N Sonenberg. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual Review of Biochemistry* 68: 913-963.

Goldstein, J C, N J Waterhouse, P Juin, G I Evan, et D R Green. 2000. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biology* 2, n°. 3 (Mars): 156-162.

Goping, I S, A Gross, J N Lavoie, M Nguyen, R Jemmerson, K Roth, S J Korsmeyer, et G C Shore. 1998. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *The Journal of Cell Biology* 143, n°. 1 (Octobre 5): 207-215.

Graff, Jeremy R, Bruce W Konicek, Julia H Carter, et Eric G Marcusson. 2008. Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Research* 68, n°. 3 (Février 1): 631-634.

Green, Douglas R., et Guido Kroemer. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458, n°. 7242 (Avril 30): 1127-1130.

Guertin, David A., et David M. Sabatini. 2007. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell* 12, n°. 1 (Juillet 10): 9-22.

Guihard, Gilles, Gregory Bellot, Carole Moreau, Gilbert Pradal, Nicolas Ferry, Raphael Thomy, Paulette Fichet, Khaled Meflah, et François Marie Vallette. 2004. The mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) corresponds to a late apoptotic event. *The Journal of Biological Chemistry* 279, n°. 45 (Novembre 5): 46542-46550.

Guillouf, C, X Graña, M Selvakumaran, A De Luca, A Giordano, B Hoffman, et D A Liebermann. 1995. Dissection of the genetic programs of p53-mediated G1 growth arrest and apoptosis: blocking p53-induced apoptosis unmasks G1 arrest. *Blood* 85, n°. 10 (Mai 15): 2691-2698.

Guo, Bin, Dayong Zhai, Edelmira Cabezas, Kate Welsh, Shahrzad Nouraini, Arnold C Satterthwait, et John C Reed. 2003. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* 423, n°. 6938 (Mai 22): 456-461.

Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, et Muller WJ. 1992. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10578-10582.

Häcki, J, L Egger, L Monney, S Conus, T Rossé, I Fellay, et C Borner. 2000. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* 19, n°. 19 (Mai 4): 2286-2295.

Haghighat, A, S Mader, A Pause, et N Sonenberg. 1995. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *The EMBO Journal* 14, n°. 22 (Novembre 15): 5701-5709.

Hakem, R, A Hakem, G S Duncan, J T Henderson, M Woo, M S Soengas, A Elia, et al. 1998. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, n°. 3 (Août 7): 339-352.

Hall, J M, et D P McDonnell. 1999. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140, n°. 12 (Décembre): 5566-5578.

Han, J, C Flemington, A B Houghton, Z Gu, G P Zambetti, R J Lutz, L Zhu, et T Chittenden. 2001. Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, n°. 20 (Septembre 25): 11318-11323.

Hannan, Katherine M, Yves Brandenburger, Anna Jenkins, Kerith Sharkey, Alice Cavanaugh, Lawrence Rothblum, Tom Moss, et al. 2003. mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Molecular and Cellular Biology* 23, n°. 23 (Décembre): 8862-8877.

Hara, Kenta, Yoshiko Maruki, Xiaomeng Long, Ken-ichi Yoshino, Noriko Oshiro, Sujuti Hidayat, Chiharu Tokunaga, Joseph Avruch, et Kazuyoshi Yonezawa. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, n°. 2 (Juillet 26): 177-189.

Harada, H, B Becknell, M Wilm, M Mann, L J Huang, S S Taylor, J D Scott, et S J Korsmeyer. 1999. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Molecular Cell* 3, n°. 4 (Avril): 413-422.

Harper, J Wade, et Stephen J Elledge. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell* 28, n°. 5 (Décembre 14): 739-745.

Harrington, Laura S, Greg M Findlay, Alex Gray, Tatiana Tolacheva, Simon Wigfield, Heike Rebholz, Jill Barnett, et al. 2004. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *The Journal of Cell Biology* 166, n°. 2 (Juillet 19): 213-223.

- Hartley, David, et Geoffrey M Cooper. 2002. Role of mTOR in the degradation of IRS-1: regulation of PP2A activity. *Journal of Cellular Biochemistry* 85, n°. 2: 304-314.
- Hartwell, L H, et M B Kastan. 1994. Cell cycle control and cancer. *Science (New York, N.Y.)* 266, n°. 5192 (Décembre 16): 1821-1828.
- Haruta, T, T Uno, J Kawahara, A Takano, K Egawa, P M Sharma, J M Olefsky, et M Kobayashi. 2000. A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 14, n°. 6 (Juin): 783-794.
- Hashimoto, Y, Y Ito, T Niikura, Z Shao, M Hata, F Oyama, et I Nishimoto. 2001. Mechanisms of neuroprotection by a novel rescue factor humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283, n°. 2 (Mai 4): 460-468.
- Haupt, Y, R Maya, A Kazaz, et M Oren. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, n°. 6630 (Mai 15): 296-299.
- Hawley, Simon A, Jérôme Boudeau, Jennifer L Reid, Kirsty J Mustard, Lina Udd, Tomi P Mäkelä, Dario R Alessi, et D Grahame Hardie. 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology* 2, n°. 4: 28.
- Hawley, Simon A, David A Pan, Kirsty J Mustard, Louise Ross, Jenny Bain, Arthur M Edelman, Bruno G Frenguelli, et D Grahame Hardie. 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism* 2, n°. 1 (Juillet): 9-19.
- Hay, Nissim, et Nahum Sonenberg. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* 18, n°. 16 (Août 15): 1926-1945.
- Heibein, J A, I S Goping, M Barry, M J Pinkoski, G C Shore, D R Green, et R C Bleackley. 2000. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *The Journal of Experimental Medicine* 192, n°. 10 (Novembre 20): 1391-1402.
- Heitman, J, N R Movva, et M N Hall. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science (New York, N.Y.)* 253, n°. 5022 (Août 23): 905-909.

Hemann, Michael T, Anka Bric, Julie Teruya-Feldstein, Andreas Herbst, Jonas A Nilsson, Carlos Cordon-Cardo, John L Cleveland, William P Tansey, et Scott W Lowe. 2005. Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* 436, n°. 7052 (Août 11): 807-811.

Hemminki, A, E Avizienyte, S Roth, A Loukola, L A Aaltonen, H Järvinen, et A de la Chapelle. 1998. [A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome]. *Duodecim; Lääketieteellinen Aikakauskirja* 114, n°. 7: 667-668.

Hengartner, M O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, n°. 6805 (Octobre 12): 770-776.

Henriksson, M, et B Lüscher. 1996. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Advances in Cancer Research* 68: 109-182.

Henson, Elizabeth S, Xiaojie Hu, et Spencer B Gibson. 2006. Herceptin sensitizes ErbB2-overexpressing cells to apoptosis by reducing antiapoptotic Mcl-1 expression. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12, n°. 3 (Février 1): 845-853.

Hershko, A, et A Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* 67: 425-479.

Hershko, Tzippi, et Doron Ginsberg. 2004. Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 279, n°. 10 (Mars 5): 8627-8634.

Hinds, M G, C Smits, R Fredericks-Short, J M Risk, M Bailey, D C S Huang, et C L Day. 2007. Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death and Differentiation* 14, n°. 1 (Janvier): 128-136.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Franklin WA, Veve R, Chen L, et Helfrich B. 2002. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 86: 1449-1456.

Hoffman, B, et D A Liebermann. 1998. The proto-oncogene c-myc and apoptosis. *Oncogene* 17, n°. 25 (Décembre 24): 3351-3357.

Hofmann, K, P Bucher, et J Tschopp. 1997. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends in Biochemical Sciences* 22, n°. 5 (Mai): 155-156.

- Honda, R, H Tanaka, et H Yasuda. 1997. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters* 420, n°. 1 (Décembre 22): 25-27.
- Hong, S H, et M L Privalsky. 2000. The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export. *Molecular and Cellular Biology* 20, n°. 17 (Septembre): 6612-6625.
- Hopp, Torsten A, Heidi L Weiss, Irma S Parra, Yukun Cui, C Kent Osborne, et Suzanne A W Fuqua. 2004. Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10, n°. 22 (Novembre 15): 7490-7499.
- Hosokawa, Nao, Taichi Hara, Takeshi Kaizuka, Chieko Kishi, Akito Takamura, Yutaka Miura, Shun-ichiro Iemura, et al. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell* 20, n°. 7 (Avril): 1981-1991.
- Hresko, Richard C, et Mike Mueckler. 2005. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 280, n°. 49 (Décembre 9): 40406-40416.
- Hsu, S Y, A Kaipia, E McGee, M Lomeli, et A J Hsueh. 1997. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, n°. 23 (Novembre 11): 12401-12406.
- Hsu, Y T, et R J Youle. 1997. Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *The Journal of Biological Chemistry* 272, n°. 21 (Mai 23): 13829-13834.
- Huang, D C, L A O'Reilly, A Strasser, et S Cory. 1997. The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *The EMBO Journal* 16, n°. 15 (Août 1): 4628-4638.
- Huang, Suyun. 2007. Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13, n°. 5 (Mars 1): 1362-1366.
- Huang, Jingxiang, et Brendan D Manning. 2008. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *The Biochemical Journal* 412, n°. 2 (Juin 1): 179-190.

Huang, Shengbing, et Frank A Sinicrope. 2008. BH3 mimetic ABT-737 potentiates TRAIL-mediated apoptotic signaling by unsequestering Bim and Bak in human pancreatic cancer cells. *Cancer Research* 68, n°. 8 (Avril 15): 2944-2951.

Hübner, Anette, Tamera Barrett, Richard A Flavell, et Roger J Davis. 2008. Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. *Molecular Cell* 30, n°. 4 (Mai 23): 415-425.

Hudziak RM, Schlessinger J, et Ullrich A. 1987. Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7159-7163.

Huettnner, C S, P Zhang, R A Van Etten, et D G Tenen. 2000. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nature Genetics* 24, n°. 1 (Janvier): 57-60.

Huffman, Todd A, Isabelle Mothe-Satney, et John C Lawrence. 2002. Insulin-stimulated phosphorylation of lipin mediated by the mammalian target of rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, n°. 2 (Janvier 22): 1047-1052.

Hurley, Rebecca L, Kristin A Anderson, Jeanne M Franzone, Bruce E Kemp, Anthony R Means, et Lee A Witters. 2005. The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 280, n°. 32 (Août 12): 29060-29066.

Hurlin, Peter J, et Jie Huang. 2006. The MAX-interacting transcription factor network. *Seminars in Cancer Biology* 16, n°. 4 (Août): 265-274.

Iaccarino, I, D Hancock, G Evan, et J Downward. 2003. c-Myc induces cytochrome c release in Rat1 fibroblasts by increasing outer mitochondrial membrane permeability in a Bid-dependent manner. *Cell Death and Differentiation* 10, n°. 5 (Mai): 599-608.

Ignatoski KM, Maehama T, Markwart SM, Dixon JE, Livant DL, et Ethier SP. 2000. ERBB-2 overexpression confers PI 3[prime] kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br J Cancer* 82: 666-674.

Inohara, N, L Ding, S Chen, et G Núñez. 1997. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *The EMBO Journal* 16, n°. 7 (Avril 1): 1686-1694.

Inoki, Ken, Yong Li, Tian Xu, et Kun-Liang Guan. 2003. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & Development* 17, n°. 15 (Août 1): 1829-1834.

Inoki, Ken, Tianqing Zhu, et Kun-Liang Guan. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, n°. 5 (Novembre 26): 577-590.

Ishizawar, R C, T Miyake, et S J Parsons. 2007. c-Src modulates ErbB2 and ErbB3 heterocomplex formation and function. *Oncogene* 26, n°. 24 (Mai 24): 3503-3510

Jacinto, Estela, Valeria Facchinetti, Dou Liu, Nelyn Soto, Shiniu Wei, Sung Yun Jung, Qiaojia Huang, Jun Qin, et Bing Su. 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127, n°. 1 (Octobre 6): 125-137.

Jacinto, Estela, et Michael N Hall. 2003. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4, n°. 2 (Février): 117-126.

Jacinto, Estela, Robbie Loewith, Anja Schmidt, Shuo Lin, Markus A Rüegg, Alan Hall, et Michael N Hall. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology* 6, n°. 11 (Novembre): 1122-1128.

Jain, Meenakshi, Constadina Arvanitis, Kenneth Chu, William Dewey, Edith Leonhardt, Maxine Trinh, Christopher D Sundberg, J Michael Bishop, et Dean W Felsner. 2002. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science (New York, N.Y.)* 297, n°. 5578 (Juillet 5): 102-104.

Jefferies, H B, S Fumagalli, P B Dennis, C Reinhard, R B Pearson, et G Thomas. 1997. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *The EMBO Journal* 16, n°. 12 (Juin 16): 3693-3704.

Jeong, Seon-Yong, Brigitte Gaume, Yang-Ja Lee, Yi-Te Hsu, Seung-Wook Ryu, Soo-Han Yoon, et Richard J Youle. 2004. Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers. *The EMBO Journal* 23, n°. 10 (Mai 19): 2146-2155.

Jézéquel, Pascal, Mario Campone, Henri Roché, Wilfried Gouraud, Catherine Charbonnel, Gabriel Ricolleau, Florence Magrangeas, et al. 2009. A 38-gene expression signature to predict metastasis risk in node-positive breast cancer after systemic adjuvant chemotherapy: a genomic substudy of PACS01 clinical trial. *Breast Cancer Research and Treatment* 116, n°. 3 (Août): 509-520.

Jiang, Chen Chen, David Wroblewski, Fan Yang, Peter Hersey, et Xu Dong Zhang. 2009. Human melanoma cells under endoplasmic reticulum stress are more susceptible to apoptosis induced by the BH3 mimetic obatoclax. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 11, n°. 9 (Septembre): 945-955.

Jo, Minji, Shinako Takimoto, Valerie Montel, et Steven L Gonias. 2009. The urokinase receptor promotes cancer metastasis independently of urokinase-type plasminogen activator in mice. *The American Journal of Pathology* 175, n°. 1 (Juillet): 190-200.

Joazeiro, C A, et A M Weissman. 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, n°. 5 (Septembre 1): 549-552.

Johnston, Stephen Rd. 2005. Combinations of endocrine and biological agents: present status of therapeutic and presurgical investigations. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11, n°. 2 (Janvier 15): 889s-99s.

Jonas, Elizabeth A, John A Hickman, Mushtaque Chachar, Brian M Polster, Teresa A Brandt, Yihru Fannjiang, Iva Ivanovska, et al. 2004. Proapoptotic N-truncated Bcl-xL protein activates endogenous mitochondrial channels in living synaptic terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, n°. 37 (Septembre 14): 13590-13595.

Jordan, Nicola J, Julia M W Gee, Denise Barrow, Alan E Wakeling, et Robert I Nicholson. 2004. Increased constitutive activity of PKB/Akt in tamoxifen resistant breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 87, n°. 2 (Septembre): 167-180.

Jordan, V Craig. 2004. Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* 5, n°. 3 (Mars): 207-213.

Joza, N, S A Susin, E Daugas, W L Stanford, S K Cho, C Y Li, T Sasaki, et al. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, n°. 6828 (Mars 29): 549-554.

Juin, P, A O Hueber, T Littlewood, et G Evan. 1999. c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes & Development* 13, n°. 11 (Juin 1): 1367-1381.

Juin, Philippe, Abigail Hunt, Trevor Littlewood, Beatrice Griffiths, Lamorna Brown Swigart, Stanley Korsmeyer, et Gerard Evan. 2002. c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 22, n°. 17 (Septembre): 6158-6169.

Jung, Chang Hwa, Chang Bong Jun, Seung-Hyun Ro, Young-Mi Kim, Neil Michael Otto, Jing Cao, Mondira Kundu, et Do-Hyung Kim. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular Biology of the Cell* 20, n°. 7 (Avril): 1992-2003.

Jürgensmeier, J M, Z Xie, Q Deveraux, L Ellerby, D Bredesen, et J C Reed. 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, n°. 9 (Avril 28): 4997-5002.

Kamada, S, A Shiono, Y Shinto, T Tsujimura, T Takahashi, T Noda, Y Kitamura, H Kondoh, et Y Tsujimoto. 1995. bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. *Cancer Research* 55, n°. 2 (Janvier 15): 354-359.

Kandt, R S, J L Haines, M Smith, H Northrup, R J Gardner, M P Short, K Dumars, E S Roach, S Steingold, et S Wall. 1992. Linkage of an important gene locus for tuberous sclerosis to a chromosome 16 marker for polycystic kidney disease. *Nature Genetics* 2, n°. 1 (Septembre): 37-41.

Kang, Min H, Zesheng Wan, Yun Hee Kang, Richard Sposto, et C Patrick Reynolds. 2008. Mechanism of synergy of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and ABT-737 in acute lymphoblastic leukemia cell lines: Mcl-1 inactivation. *Journal of the National Cancer Institute* 100, n°. 8 (Avril 16): 580-595.

Kang, Se Hun, Keon Wook Kang, Kyung-Hee Kim, Bumi Kwon, Seok-Ki Kim, Ho-Young Lee, Sun-Young Kong, Eun Sook Lee, Sang-Geun Jang, et Byong Chul Yoo. 2008. Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability. *BMC Cancer* 8: 286.

Karbowski, Mariusz, Yang-Ja Lee, Brigitte Gaume, Seon-Yong Jeong, Stephan Frank, Amotz Nechushtan, Ansgar Santel, Margaret Fuller, Carolyn L Smith, et Richard J Youle. 2002. Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 159, n°. 6 (Décembre 23): 931-938.

Karbowski, Mariusz, Kristi L Norris, Megan M Cleland, Seon-Yong Jeong, et Richard J Youle. 2006. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443, n°. 7112 (Octobre 12): 658-662.

Karl, E, Z Zhang, Z Dong, K G Neiva, M S Soengas, A E Koch, P J Polverini, G Núñez, et J E Nör. 2007. Unidirectional crosstalk between Bcl-xL and Bcl-2 enhances the angiogenic phenotype of endothelial cells. *Cell Death and Differentiation* 14, n°. 9 (Septembre): 1657-1666.

Kasibhatla, S, H M Beere, T Brunner, F Echeverri, et D R Green. 2000. A 'non-canonical' DNA-binding element mediates the response of the Fas-ligand promoter to c-Myc. *Current Biology: CB* 10, n°. 19 (Octobre 5): 1205-1208.

Kato, S, H Endoh, Y Masuhiro, T Kitamoto, S Uchiyama, H Sasaki, S Masushige, et al. 1995. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science (New York, N.Y.)* 270, n°. 5241 (Décembre 1): 1491-1494.

Kaufmann, Thomas, Lin Tai, Paul G Ekert, David C S Huang, Fiona Norris, Ralph K Lindemann, Ricky W Johnstone, Vishva M Dixit, et Andreas Strasser. 2007. The BH3-only protein bid is dispensable for DNA damage- and replicative stress-induced apoptosis or cell-cycle arrest. *Cell* 129, n°. 2 (Avril 20): 423-433.

Kelekar, A, et C B Thompson. 1998. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 8, n°. 8 (Août): 324-330.

Kerr, J F, A H Wyllie, et A R Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, n°. 4 (Août): 239-257.

Khan AJ, King BL, Smith BD, Smith GL, DiGiovanna MP, et Carter D. 2002. Characterization of the HER-2//neu oncogene by immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 8: 540-548.

Kiefer, M C, M J Brauer, V C Powers, J J Wu, S R Umansky, L D Tomei, et P J Barr. 1995. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374, n°. 6524 (Avril 20): 736-739.

Kim HH, Vijapurkar U, Hellyer NJ, Bravo D, et Koland JG. 1998. Signal transduction by epidermal growth factor and heregulin via the kinase-deficient ErbB3 protein. *Biochem J* 334: 189-195.

Kim, Bong-Jo, Seung-Wook Ryu, et Byoung-Joon Song. 2006. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 281, n°. 30 (Juillet 28): 21256-21265.

Kim, Do-Hyung, D D Sarbassov, Siraj M Ali, Jessie E King, Robert R Latek, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, et David M Sabatini. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, n°. 2 (Juillet 26): 163-175.

Kim, Jae Eun, et Jie Chen. 2004. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* 53, n°. 11 (Novembre): 2748-2756.

Kim, S H, D Kim, J S Han, C S Jeong, B S Chung, C D Kang, et G C Li. 1999. Ku autoantigen affects the susceptibility to anticancer drugs. *Cancer Research* 59, n°. 16 (Août 15): 4012-4017.

Kimura, Naoki, Chiharu Tokunaga, Sushila Dalal, Christine Richardson, Ken-ichi Yoshino, Kenta Hara, Bruce E Kemp, Lee A Witters, Osamu Mimura, et Kazuyoshi Yonezawa. 2003. A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 8, n°. 1 (Janvier): 65-79.

King CR, Kraus MH, et Aaronson SA. 1985. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229: 974-976.

King, R W, J M Peters, S Tugendreich, M Rolfe, P Hieter, et M W Kirschner. 1995. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81, n°. 2 (Avril 21): 279-288.

Kinzler, K W, et B Vogelstein. 1997. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386, n°. 6627 (Avril 24): 761, 763.

Kirkegaard, Tove, Liane M McGlynn, Fiona M Campbell, Sven Müller, Sian M Tovey, Barbara Dunne, Kirsten V Nielsen, Timothy G Cooke, et John M S Bartlett. 2007. Amplified in breast cancer 1 in human epidermal growth factor receptor - positive tumors of tamoxifen-treated breast cancer patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13, n°. 5 (Mars 1): 1405-1411.

Klein, Jeffrey A, Chantal M Longo-Guess, Marlies P Rossmann, Kevin L Seburn, Ronald E Hurd, Wayne N Frankel, Roderick T Bronson, et Susan L Ackerman. 2002. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, n°. 6905 (Septembre 26): 367-374.

Klinge, C M, S C Jernigan, S L Smith, V V Tyulmenkov, et P C Kulakosky. 2001. Estrogen response element sequence impacts the conformation and transcriptional activity of estrogen receptor alpha. *Molecular and Cellular Endocrinology* 174, n°. 1 (Mars 28): 151-166.

Knowlden, J M, I R Hutcheson, D Barrow, J M W Gee, et R I Nicholson. 2005. Insulin-like growth factor-I receptor signaling in tamoxifen-resistant breast cancer: a supporting role to the epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 146, n°. 11 (Novembre): 4609-4618.

Knowlden, Janice M, Iain R Hutcheson, Helen E Jones, Tracieann Madden, Julia M W Gee, Maureen E Harper, Denise Barrow, Alan E Wakeling, et Robert I Nicholson. 2003. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* 144, n°. 3 (Mars): 1032-1044.

Knudson, C M, K S Tung, W G Tourtellotte, G A Brown, et S J Korsmeyer. 1995. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science (New York, N.Y.)* 270, n°. 5233 (Octobre 6): 96-99.

Komarova, Natalia L, Christoph Lengauer, Bert Vogelstein, et Martin A Nowak. 2002. Dynamics of genetic instability in sporadic and familial colorectal cancer. *Cancer Biology & Therapy* 1, n°. 6 (Décembre): 685-692.

Konopleva, Marina, Rooha Contractor, Twee Tsao, Ismael Samudio, Peter P Ruvolo, Shinichi Kitada, Xingming Deng, et al. 2006. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10, n°. 5 (Novembre): 375

Korsmeyer, S J, J R Shutter, D J Veis, D E Merry, et Z N Oltvai. 1993. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Seminars in Cancer Biology* 4, n°. 6 (Décembre): 327-332.

Koseki, T, N Inohara, S Chen, et G Núñez. 1998. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, n°. 9 (Avril 28): 5156-5160.

Krajewski, S, S Bodrug, M Krajewska, A Shabaik, R Gascoyne, K Berean, et J C Reed. 1995. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *The American Journal of Pathology* 146, n°. 6 (Juin): 1309-1319.

Krajewski, S, M Krajewska, A Shabaik, H G Wang, S Irie, L Fong, et J C Reed. 1994. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Research* 54, n°. 21 (Novembre 1): 5501-5507.

Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, et Aaronson SA. 1989. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB//epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9193-9197.

Kroemer, Guido, et Jacques Pouyssegur. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13, n°. 6 (Juin): 472-482.

Kubbutat, M H, S N Jones, et K H Vousden. 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, n°. 6630 (Mai 15): 299-303.

Kuida, K, T F Haydar, C Y Kuan, Y Gu, C Taya, H Karasuyama, M S Su, P Rakic, et R A Flavell. 1998. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, n°. 3 (Août 7): 325-337.

Kumar, Rakesh, Rui-An Wang, Abhijit Mazumdar, Amjad H Talukder, Mahitosh Mandal, Zhibo Yang, Rozita Bagheri-Yarmand, et al. 2002. A naturally occurring MTA1 variant sequesters oestrogen receptor-alpha in the cytoplasm. *Nature* 418, n°. 6898 (Août 8): 654-657.

Kumar, S. 2007. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* 14, n°. 1 (Janvier): 32-43.

Kushner, P J, D A Agard, G L Greene, T S Scanlan, A K Shiau, R M Uht, et P Webb. 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74, n°. 5 (Novembre 30): 311-317.

Kutuk, Ozgur, et Anthony Letai. 2008. Alteration of the mitochondrial apoptotic pathway is key to acquired paclitaxel resistance and can be reversed by ABT-737. *Cancer Research* 68, n°. 19 (Octobre 1): 7985-7994.

Kuwana, Tomomi, Lisa Bouchier-Hayes, Jerry E Chipuk, Christine Bonzon, Barbara A Sullivan, Douglas R Green, et Donald D Newmeyer. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell* 17, n°. 4 (Février 18): 525-535.

Lalier, L, P-F Cartron, F Pedelaborde, C Olivier, D Loussouarn, S A Martin, K Meflah, J Menanteau, et F M Vallette. 2007. Increase in PGE2 biosynthesis induces a Bax dependent apoptosis correlated to patients' survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 26, n°. 34 (Juillet 26): 4999-5009.

Lalier, Lisenn, Pierre-François Cartron, Philippe Juin, Svetlana Nedelkina, Stephen Manon, Burkhardt Bechinger, et François M Vallette. 2007. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 12, n°. 5 (Mai): 887-896.

Lanave, Cecilia, Monica Santamaria, et Cecilia Saccone. 2004. Comparative genomics: the evolutionary history of the Bcl-2 family. *Gene* 333 (Mai 26): 71-79.

Land, Stephen C, et Andrew R Tee. 2007. Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *The Journal of Biological Chemistry* 282, n°. 28 (Juillet 13): 20534-20543.

Lane, H A, I Beuvink, A B Motoyama, J M Daly, R M Neve, et N E Hynes. 2000. ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Molecular and Cellular Biology* 20, n°. 9 (Mai): 3210-3223.

Latif Z, Watters AD, Dunn I, Grigor KM, Underwood MA, et Bartlett JM. 2003. HER2//neu overexpression in the development of muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 89: 1305-1309.

Le, Xiao-Feng, Franz Pruefer, et Robert C Bast. 2005. HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 via multiple signaling pathways. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 4, n°. 1 (Janvier): 87-95.

Lee JW, Soung YH, Seo SH, Kim SY, Park CH, et Wang YP. 2006. Somatic mutations of ERBB2 kinase domain in gastric, colorectal, and breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 12: 57-61.

Lee, A C, B E Fenster, H Ito, K Takeda, N S Bae, T Hirai, Z X Yu, V J Ferrans, B H Howard, et T Finkel. 1999. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry* 274, n°. 12 (Mars 19): 7936-7940.

Lee, A V, X Cui, et S Oesterreich. 2001. Cross-talk among estrogen receptor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor signaling in breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 7, n°. 12 (Décembre): 4429s-4435s; discussion 4411s-4412s.

Lee, H H, H Dadgostar, Q Cheng, J Shu, et G Cheng. 1999. NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, n°. 16 (Août 3): 9136-9141.

Lee, Susan, Frank I Comer, Atsuo Sasaki, Ian X McLeod, Yung Duong, Koichi Okumura, John R Yates, Carole A Parent, et Richard A Firtel. 2005. TOR complex 2 integrates cell movement during chemotaxis and signal relay in Dictyostelium. *Molecular Biology of the Cell* 16, n°. 10 (Octobre): 4572-4583.

Lenferink AE, Busse D, Flanagan WM, Yakes FM, et Arteaga CL. 2001. ErbB2//neu kinase modulates cellular p27(Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways. *Cancer Res* 61: 6583-6591.

Leo, C, et J D Chen. 2000. The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245, n°. 1 (Mars 7): 1-11.

Letai, Anthony, Michael C Bassik, Loren D Walensky, Mia D Sorcinelli, Solly Weiler, et Stanley J Korsmeyer. 2002a. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, n°. 3 (Septembre): 183-192.

Leu, J I-Ju, Patrick Dumont, Michael Hafey, Maureen E Murphy, et Donna L George. 2004. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl-1 complex. *Nature Cell Biology* 6, n°. 5 (Mai): 443-450.

Levin, Ellis R, et Richard J Pietras. 2008. Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 108, n°. 3 (Avril): 351-361.

Lewis, Joan S, Kathleen Meeke, Clodia Osipo, Eric A Ross, Noman Kidawi, Tianyu Li, Eric Bell, Navdeep S Chandel, et V Craig Jordan. 2005. Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. *Journal of the National Cancer Institute* 97, n°. 23 (Décembre 7): 1746-1759.

Li, H, H Zhu, C J Xu, et J Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, n°. 4 (Août 21): 491-501.

Li, L Y, X Luo, et X Wang. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, n°. 6842 (Juillet 5): 95-99.

Li, P, D Nijhawan, I Budihardjo, S M Srinivasula, M Ahmad, E S Alnemri, et X Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, n°. 4 (Novembre 14): 479-489.

Li, Xiaoming, Yili Yang, et Jonathan D Ashwell. 2002. TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416, n°. 6878 (Mars 21): 345-347.

Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, et Han K. 2002. PKB//Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8: 1153-1160.

Lickliter, J D, N J Wood, L Johnson, G McHugh, J Tan, F Wood, J Cox, et N W Wickham. 2003. HA14-1 selectively induces apoptosis in Bcl-2-overexpressing leukemia/lymphoma cells, and enhances cytarabine-induced cell death. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 17, n°. 11 (Novembre): 2074-2080.

Lim, Elgene, François Vaillant, Di Wu, Natasha C Forrest, Bhupinder Pal, Adam H Hart, Marie-Liesse Asselin-Labat, et al. 2009. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature Medicine* 15, n°. 8 (Août): 907-913.

Lin, T A, X Kong, T A Haystead, A Pause, G Belsham, N Sonenberg, et J C Lawrence. 1994. PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science (New York, N.Y.)* 266, n°. 5185 (Octobre 28): 653-656.

Lindsten, T, A J Ross, A King, W X Zong, J C Rathmell, H A Shiels, E Ulrich, et al. 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Molecular Cell* 6, n°. 6 (Décembre): 1389-1399.

Linseman, Daniel A, Brent D Butts, Thomas A Precht, Reid A Phelps, Shoshona S Le, Tracey A Laessig, Ron J Bouchard, Maria L Florez-McClure, et Kim A Heidenreich. 2004. Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24, n°. 44 (Novembre 3): 9993-10002.

Lipponen, P, T Pietiläinen, V M Kosma, S Aaltomaa, M Eskelinen, et K Syrjänen. 1995. Apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. *The Journal of Pathology* 177, n°. 1 (Septembre): 49-55.

Lithgow, T, R van Driel, J F Bertram, et A Strasser. 1994. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 5, n°. 4 (Avril): 411-417.

Liu, Xinqi, Shaodong Dai, Yanan Zhu, Philippa Marrack, et John W Kappler. 2003. The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* 19, n°. 3 (Septembre): 341-352.

Liu, Y, L Naumovski, et P Hanawalt. 1997. Nucleotide excision repair capacity is attenuated in human promyelocytic HL60 cells that overexpress BCL2. *Cancer Research* 57, n°. 9 (Mai 1): 1650-1653.

Loden M, Perris F, Nielsen NH, Emdin SO, et Landberg G. 2003. C-erbB2, p27 and G1/S aberrations in human primary breast cancer. *Anticancer Res* 23: 2053-2061.

Loewith, Robbie, Estela Jacinto, Stephan Wullschleger, Anja Lorberg, José L Crespo, Débora Bonenfant, Wolfgang Oppliger, Paul Jenoe, et Michael N Hall. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell* 10, n°. 3 (Septembre): 457-468.

Lomonosova, E, et G Chinnadurai. 2008. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27 Suppl 1 (Décembre): S2-19.

Loussouarn, D, L Campion, F Leclair, M Campone, C Charbonnel, G Ricolleau, W Gouraud, R Bataille, et P Jézéquel. 2009. Validation of UBE2C protein as a prognostic marker in node-positive breast cancer. *British Journal of Cancer* 101, n°. 1 (Juillet 7): 166-173.

Lowe, Scott W., Enrique Cepero, et Gerard Evan. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, n°. 7015 (Novembre 18): 307-315.

Lu, Qing, David C Pallas, Howard K Surks, Wendy E Baur, Michael E Mendelsohn, et Richard H Karas. 2004. Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, n°. 49 (Décembre 7): 17126-17131.

- Lu, Y, X Zi, Y Zhao, D Mascarenhas, et M Pollak. 2001. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *Journal of the National Cancer Institute* 93, n°. 24 (Décembre 19): 1852-1857.
- Luciano, Frederic, Dayong Zhai, Xiuwen Zhu, Beatrice Bailly-Maitre, Jean-Ehrland Ricci, Arnold C Satterthwait, et John C Reed. 2005. Cytoprotective peptide humanin binds and inhibits proapoptotic Bcl-2/Bax family protein BimEL. *The Journal of Biological Chemistry* 280, n°. 16 (Avril 22): 15825-15835.
- Luo, Ji, Nicole L Solimini, et Stephen J Elledge. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136, n°. 5 (Mars 6): 823-837.
- Luo, X, I Budihardjo, H Zou, C Slaughter, et X Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, n°. 4 (Août 21): 481-490.
- Lüscher, B. 2001. Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene* 277, n°. 1 (Octobre 17): 1-14.
- Ma, Li, Zhenbang Chen, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, et Pier Paolo Pandolfi. 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121, n°. 2 (Avril 22): 179-193.
- Ma, Wenzhe, Ho Joong Sung, Joon Y Park, Satoaki Matoba, et Paul M Hwang. 2007. A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39, n°. 3 (Juin): 243-246.
- Mader, S, H Lee, A Pause, et N Sonenberg. 1995. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Molecular and Cellular Biology* 15, n°. 9 (Septembre): 4990-4997.
- Mailleux, Arnaud A, Michael Overholtzer, et Joan S Brugge. 2008. Lumen formation during mammary epithelial morphogenesis: insights from in vitro and in vivo models. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7, n°. 1 (Janvier 1): 57-62.

Maiuri, M Chiara, Gaëtane Le Toumelin, Alfredo Criollo, Jean-Christophe Rain, Fabien Gautier, Philippe Juin, Ezgi Tasdemir, et al. 2007. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO Journal* 26, n°. 10 (Mai 16): 2527-2539.

Maiuri, Maria Chiara, Alfredo Criollo, Ezgi Tasdemir, José Miguel Vicencio, Nicolas Tajeddine, John A Hickman, Olivier Geneste, et Guido Kroemer. 2007. BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* 3, n°. 4 (Août): 374-376.

Manero, Florence, Fabien Gautier, Tristan Gallenne, Nicolas Cauquil, Danielle Grée, Pierre-François Cartron, Olivier Geneste, René Grée, François M Vallette, et Philippe Juin. 2006. The small organic compound HA14-1 prevents Bcl-2 interaction with Bax to sensitize malignant glioma cells to induction of cell death. *Cancer Research* 66, n°. 5 (Mars 1): 2757-2764.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, et Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934.

Marangoni, E, N Lecomte, L Durand, G de Pinieux, D Decaudin, C Chomienne, F Smadja-Joffe, et M-F Poupon. 2009. CD44 targeting reduces tumour growth and prevents post-chemotherapy relapse of human breast cancers xenografts. *British Journal of Cancer* 100, n°. 6 (Mars 24): 918-922.

Marches, Radu, et Jonathan W Uhr. 2004. Enhancement of the p27Kip1-mediated antiproliferative effect of trastuzumab (Herceptin) on HER2-overexpressing tumor cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 112, n°. 3 (Novembre 10):

Marcotrigiano, J, A C Gingras, N Sonenberg, et S K Burley. 1999. Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Molecular Cell* 3, n°. 6 (Juin): 707-716.

Márquez, D C, J Lee, T Lin, et R J Pietras. 2001. Epidermal growth factor receptor and tyrosine phosphorylation of estrogen receptor. *Endocrine* 16, n°. 2 (Novembre): 73-81.

Márquez, D C, et R J Pietras. 2001. Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells. *Oncogene* 20, n°. 39 (Septembre 6): 5420-5430.

Márquez, Diana C, Hsiao-Wang Chen, Edward M Curran, Wade V Welshons, et Richard J Pietras. 2006. Estrogen receptors in membrane lipid rafts and signal transduction in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology* 246, n°. 1 (Février 26): 91-100.

Martin, Dietmar E, Alexandre Soulard, et Michael N Hall. 2004. TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* 119, n°. 7 (Décembre 29): 969-979.

Martinou, J-C, et R J Youle. 2006. Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death and Differentiation* 13, n°. 8 (Août): 1291-1295.

Martins, Carla P, Lamorna Brown-Swigart, et Gerard I Evan. 2006. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* 127, n°. 7 (Décembre 29): 1323-1334.

Marzo, I, C Brenner, N Zamzami, J M Jürgensmeier, S A Susin, H L Vieira, M C Prévost, et al. 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 281, n°. 5385 (Septembre 25): 2027-2031.

Maser, Richard S, et Ronald A DePinho. 2002. Keeping telomerase in its place. *Nature Medicine* 8, n°. 9 (Septembre): 934-936.

Matsui, Hirotaka, Hiroya Asou, et Toshiya Inaba. 2007. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Molecular Cell* 25, n°. 1 (Janvier 12): 99-112.

Mayer, Christine, Jian Zhao, Xuejun Yuan, et Ingrid Grummt. 2004. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes & Development* 18, n°. 4 (Février 15): 423-434.

McCarthy, J V, J Ni, et V M Dixit. 1998. RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 273, n°. 27 (Juillet 3): 16968-16975.

McDonnell, J M, D Fushman, C L Milliman, S J Korsmeyer, et D Cowburn. 1999. Solution structure of the proapoptotic molecule BID: a structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell* 96, n°. 5 (Mars 5): 625-634.

McKenna, N J, R B Lanz, et B W O'Malley. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews* 20, n°. 3 (Juin): 321-344.

Mendelsohn J, et Baselga J. 2000. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19: 6550-6565.

Merlin, J-L, M Barberi-Heyob, et N Bachmann. 2002. In vitro comparative evaluation of trastuzumab (Herceptin) combined with paclitaxel (Taxol) or docetaxel (Taxotere) in HER2-expressing human breast cancer cell lines. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 13, n°. 11 (Novembre): 1743-1748.

Michalak, Ewa, Andreas Villunger, Miriam Erlacher, et Andreas Strasser. 2005. Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, n°. 3 (Juin 10): 786-798.

Michels, Jorg, Jason W O'Neill, Claire L Dallman, Amalia Mouzakiti, Fay Habens, Matthew Brimmell, Kam Y J Zhang, et al. 2004. Mcl-1 is required for Akata6 B-lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene* 23, n°. 28 (Juin 17): 4818-4827.

Mihara, Motohiro, Susan Erster, Alexander Zaika, Oleksi Petrenko, Thomas Chittenden, Petr Pancoska, et Ute M Moll. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell* 11, n°. 3 (Mars): 577-590.

Mills, John R, Yoshitaka Hippo, Francis Robert, Samuel M H Chen, Abba Malina, Chen-Ju Lin, Ulrike Trojahn, et al. 2008. mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, n°. 31 (Août 5): 10853-10858.

Mimura K, Kono K, Hanawa M, Mitsui F, Sugai H, et Miyagawa N. 2005. Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 92: 1253-1260.

Minko, T, S S Dharap, et A T Fabbricatore. 2003. Enhancing the efficacy of chemotherapeutic drugs by the suppression of antiapoptotic cellular defense. *Cancer Detection and Prevention* 27, n°. 3: 193-202.

Miramar, M D, P Costantini, L Ravagnan, L M Saraiva, D Haouzi, G Brothers, J M Penninger, M L Peleato, G Kroemer, et S A Susin. 2001. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *The Journal of Biological Chemistry* 276, n°. 19 (Mai 11): 16391-16398.

Miron, M, J Verdú, P E Lachance, M J Birnbaum, P F Lasko, et N Sonenberg. 2001. The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in Drosophila. *Nature Cell Biology* 3, n°. 6 (Juin): 596-601.

Mitchell, K O, M S Ricci, T Miyashita, D T Dicker, Z Jin, J C Reed, et W S El-Deiry. 2000. Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Research* 60, n°. 22 (Novembre 15): 6318-6325.

Miyashita, T, et J C Reed. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, n°. 2 (Janvier 27): 293-299.

Moasser, M M. 2007. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26, n°. 45 (Avril 30): 6469-6487.

Mohammad, Ramzi M, Anton Scott Goustin, Amro Aboukameel, Ben Chen, Sanjeev Banerjee, Guoping Wang, Zaneta Nikolovska-Coleska, Shaomeng Wang, et Ayad Al-Katib. 2007. Preclinical studies of TW-37, a new nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2, in diffuse large cell lymphoma xenograft model reveal drug action on both Bcl-2 and Mcl-1. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13, n°. 7 (Avril 1): 2226-2235.

Moldoveanu, Tudor, Qian Liu, Ante Tocilj, Mark Watson, Gordon Shore, et Kalle Gehring. 2006. The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site. *Molecular Cell* 24, n°. 5 (Décembre 8): 677-688.

Molina, M A, J Codony-Servat, J Albanell, F Rojo, J Arribas, et J Baselga. 2001. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Research* 61, n°. 12 (Juin 15): 4744-4749.

Montagne, J, M J Stewart, H Stocker, E Hafen, S C Kozma, et G Thomas. 1999. Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science (New York, N.Y.)* 285, n°. 5436 (Septembre 24): 2126-2129.

Moody SE, Sarkisian CJ, Hahn KT, Gunther EJ, Pickup S, et Dugan KD. 2002. Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis. *Cancer Cell* 2: 451-461.

Moreau, Carole, Pierre-François Cartron, Abigail Hunt, Khaled Meflah, Douglas R Green, Gerard Evan, François M Vallette, et Philippe Juin. 2003. Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 278, n°. 21 (Mai 23): 19426-19435.

Moroni, M C, E S Hickman, E Lazzerini Denchi, G Caprara, E Colli, F Cecconi, H Müller, et K Helin. 2001. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nature Cell Biology* 3, n°. 6 (Juin): 552-558.

Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, Cohn DE, Kelbick N, et Copeland L. 2006. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *J Clin Onc* 24: 2376-2385.

Mosley, Jonathan D, John T Poirier, Darcie D Seachrist, Melissa D Landis, et Ruth A Keri. 2007. Rapamycin inhibits multiple stages of c-Neu/ErbB2 induced tumor progression in a transgenic mouse model of HER2-positive breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, n°. 8 (Août): 2188-2197.

Motoyama, N, F Wang, K A Roth, H Sawa, K Nakayama, K Nakayama, I Negishi, S Senju, Q Zhang, et S Fujii. 1995. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)* 267, n°. 5203 (Mars 10): 1506-1510.

Muchmore, S W, M Sattler, H Liang, R P Meadows, J E Harlan, H S Yoon, D Nettesheim, et al. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, n°. 6580 (Mai 23): 335-341.

Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R, et Leder P. 1988. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* 54: 105-115.

Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, n°. 3 (Février 7): 355-365.

Nagata, Yoichi, Keng-Hsueh Lan, Xiaoyan Zhou, Ming Tan, Francisco J Esteva, Aysegul A Sahin, Kristine S Klos, et al. 2004. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6, n°. 2 (Août): 117-127.

Nagy, Peter, Elza Friedländer, Minna Tanner, Anita I Kapanen, Kermit L Carraway, Jorma Isola, et Thomas M Jovin. 2005. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Research* 65, n°. 2 (Janvier 15): 473-482.

Nahta, Rita, Linda X H Yuan, Bing Zhang, Ryuji Kobayashi, et Francisco J Esteva. 2005. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Research* 65, n°. 23 (Décembre 1): 11118-11128.

Nakano, K, et K H Vousden. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular Cell* 7, n°. 3 (Mars): 683-694.

Nakayama, K, K Nakayama, L B Dustin, et D Y Loh. 1995. T-B cell interaction inhibits spontaneous apoptosis of mature lymphocytes in Bcl-2-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine* 182, n°. 4 (Octobre 1): 1101-1109.

Narita, M, S Shimizu, T Ito, T Chittenden, R J Lutz, H Matsuda, et Y Tsujimoto. 1998. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, n°. 25 (Décembre 8): 14681-14686.

Nechushtan, A, C L Smith, Y T Hsu, et R J Youle. 1999. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *The EMBO Journal* 18, n°. 9 (Mai 4): 2330-2341.

Nechushtan, A, C L Smith, I Lamensdorf, S H Yoon, et R J Youle. 2001. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 153, n°. 6 (Juin 11): 1265-1276.

Neer, E J, C J Schmidt, R Nambudripad, et T F Smith. 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371, n°. 6495 (Septembre 22): 297-300.

Negrini, Simona, Vassilis G Gorgoulis, et Thanos D Halazonetis. 2010. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11, n°. 3 (Mars): 220-228.

Nemere, Ilka, Richard J Pietras, et Peter F Blackmore. 2003. Membrane receptors for steroid hormones: signal transduction and physiological significance. *Journal of Cellular Biochemistry* 88, n°. 3 (Février 15): 438-445.

Nicholson, R I, C Staka, F Boyns, I R Hutcheson, et J M W Gee. 2004. Growth factor-driven mechanisms associated with resistance to estrogen deprivation in breast cancer: new opportunities for therapy. *Endocrine-Related Cancer* 11, n°. 4 (Décembre): 623-641.

- Nijhawan, Deepak, Min Fang, Elie Traer, Qing Zhong, Wenhua Gao, Fenghe Du, et Xiaodong Wang. 2003. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes & Development* 17, n°. 12 (Juin 15): 1475-1486.
- Nikiforov, Mikhail A, Marybeth Riblett, Wen-Hua Tang, Vladimir Gratchouck, Dazhong Zhuang, Yolanda Fernandez, Monique Verhaegen, et al. 2007a. Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, n°. 49 (Décembre 4): 19488-19493.
- Nilsson, Jonas A, et John L Cleveland. 2003. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22, n°. 56 (Décembre 8): 9007-9021.
- Noh, Woo-Chul, Wallace H Mondesire, Junying Peng, Weiguo Jian, Haixia Zhang, JinJiang Dong, Gordon B Mills, Mien-Chie Hung, et Funda Meric-Bernstam. 2004. Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10, n°. 3 (Février 1): 1013-1023.
- Nomura, Masaya, Shigeomi Shimizu, Tomoyasu Sugiyama, Masashi Narita, Toshinori Ito, Hikaru Matsuda, et Yoshihide Tsujimoto. 2003. 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *The Journal of Biological Chemistry* 278, n°. 3 (Janvier 17): 2058-2065.
- Nuñez, G, M A Benedict, Y Hu, et N Inohara. 1998. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17, n°. 25 (Décembre 24): 3237-3245.
- O'Connor, L, A Strasser, L A O'Reilly, G Hausmann, J M Adams, S Cory, et D C Huang. 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The EMBO Journal* 17, n°. 2 (Janvier 15): 384-395.
- Ohtsuka, Takao, Hoon Ryu, Yohji A Minamishima, Salvador Macip, Junji Sagara, Keiichi I Nakayama, Stuart A Aaronson, et Sam W Lee. 2004. ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nature Cell Biology* 6, n°. 2 (Février): 121-128.
- Okami, Jiro, Diane M Simeone, et Craig D Logsdon. 2004. Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cancer. *Cancer Research* 64, n°. 15 (Août 1): 5338-5346.
- Oliver, Christopher L, Michelle B Miranda, Sanjeev Shangary, Stephanie Land, Shaomeng Wang, et Daniel E Johnson. 2005. (-)-Gossypol acts directly on the mitochondria to overcome Bcl-2- and Bcl-X(L)-mediated apoptosis resistance. *Molecular Cancer Therapeutics* 4, n°. 1 (Janvier): 23-31.

Oliver, Lisa, Béatrice Mahé, René Grée, François M Vallette, et Philippe Juin. 2007. HA14-1, a small molecule inhibitor of Bcl-2, bypasses chemoresistance in leukaemia cells. *Leukemia Research* 31, n°. 6 (Juin): 859-863.

Olopade, O I, M O Adeyanju, A R Safa, F Hagos, R Mick, C B Thompson, et W M Recant. 1997. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *The Cancer Journal from Scientific American* 3, n°. 4 (Août): 230-237.

Olovnikov, Ivan A, Julia E Kravchenko, et Peter M Chumakov. 2009. Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Seminars in Cancer Biology* 19, n°. 1 (Février): 32-41.

Oltersdorf, Tilman, Steven W Elmore, Alexander R Shoemaker, Robert C Armstrong, David J Augeri, Barbara A Belli, Milan Bruncko, et al. 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435, n°. 7042 (Juin 2): 677-681.

Oltvai, Z N, C L Milliman, et S J Korsmeyer. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, n°. 4 (Août 27): 609-619.

Opferman, Joseph T, Hiromi Iwasaki, Christy C Ong, Heikyoung Suh, Shin-ichi Mizuno, Koichi Akashi, et Stanley J Korsmeyer. 2005. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 307, n°. 5712 (Février 18): 1101-1104.

Osborne, C K, R Schiff, S A Fuqua, et J Shou. 2001. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 7, n°. 12 (Décembre): 4338s-4342s; discussion 4411s-4412s.

Osborne, C Kent, Valerie Bardou, Torsten A Hopp, Gary C Chamness, Susan G Hilsenbeck, Suzanne A W Fuqua, Jiemin Wong, D Craig Allred, Gary M Clark, et Rachel Schiff. 2003. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 95, n°. 5 (Mars 5): 353-361.

Oster, Sara K, Cynthia S W Ho, Erinn L Soucie, et Linda Z Penn. 2002. The myc oncogene: Marvelously Complex. *Advances in Cancer Research* 84: 81-154.

Oster, Sara K, Daniel Y L Mao, James Kennedy, et Linda Z Penn. 2003. Functional analysis of the N-terminal domain of the Myc oncoprotein. *Oncogene* 22, n°. 13 (Avril 3): 1998-2010.

O'Reilly, Kathryn E, Fredi Rojo, Qing-Bai She, David Solit, Gordon B Mills, Debra Smith, Heidi Lane, et al. 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Research* 66, n°. 3 (Février 1): 1500-1508.

Ottenhoff-Kalff AE, Rijksen G, van Beurden EA, Hennipman A, Michels AA, et Staal GE. 1992. Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer: involvement of the c-src oncogene product. *Cancer Res* 52: 4773-4778.

Page, C, M Huang, X Jin, K Cho, J Lilja, R K Reynolds, et J Lin. 2000. Elevated phosphorylation of AKT and Stat3 in prostate, breast, and cervical cancer cells. *International Journal of Oncology* 17, n°. 1 (Juillet): 23-28.

Pagliari, Lisa J, Tomomi Kuwana, Christine Bonzon, Donald D Newmeyer, Shine Tu, Helen M Beere, et Douglas R Green. 2005. The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, n°. 50 (Décembre 13): 17975-17980.

Paik, Paul K, Charles M Rudin, Andrew Brown, Naiyer A Rizvi, Naoko Takebe, William Travis, Leonard James, et al. 2010. A phase I study of obatoclax mesylate, a Bcl-2 antagonist, plus topotecan in solid tumor malignancies. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (Février 18).

Pályi-Krek, Zsuzsanna, Márk Barok, Jorma Isola, Markku Tammi, János Szöllosi, et Peter Nagy. 2007. Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 43, n°. 16 (Novembre): 2423-2433.

Papp, Balázs, Csaba Pál, et Laurence D Hurst. 2003. Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast. *Nature* 424, n°. 6945 (Juillet 10): 194-197.

Patel, Parthiv H, Nitika Thapar, Lea Guo, Monica Martinez, John Maris, Chia-Ling Gau, Judith A Lengyel, et Fuyuhiko Tamanoi. 2003. Drosophila Rheb GTPase is required for cell cycle progression and cell growth. *Journal of Cell Science* 116, n°. 17 (Septembre 1): 3601-3610.

Pause, A, G J Belsham, A C Gingras, O Donzé, T A Lin, J C Lawrence, et N Sonenberg. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371, n°. 6500 (Octobre 27): 762-767.

Pedram, Ali, Mahnaz Razandi, Mark Aitkenhead, Christopher C W Hughes, et Ellis R Levin. 2002. Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *The Journal of Biological Chemistry* 277, n°. 52 (Décembre 27): 50768-50775.

Pedram, Ali, Mahnaz Razandi, et Ellis R Levin. 2006. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 20, n°. 9 (Septembre): 1996-2009.

Pedram, Ali, Mahnaz Razandi, Richard C A Sainson, Jin K Kim, Christopher C Hughes, et Ellis R Levin. 2007. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 282, n°. 31 (Août 3): 22278-22288.

Pegram, Mark D, Tadeusz Pienkowski, Donald W Northfelt, Wolfgang Eiermann, Ravi Patel, Pierre Fumoleau, Eleonor Quan, et al. 2004. Results of two open-label, multicenter phase II studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in HER2-positive advanced breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 96, n°. 10 (Mai 19): 759-769.

Pei, Xin-Yan, Yun Dai, et Steven Grant. 2004. The small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 interacts synergistically with flavopiridol to induce mitochondrial injury and apoptosis in human myeloma cells through a free radical-dependent and Jun NH2-terminal kinase-dependent mechanism. *Molecular Cancer Therapeutics* 3, n°. 12 (Décembre): 1513-1524.

Pelengaris, S, T Littlewood, M Khan, G Elia, et G Evan. 1999. Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Molecular Cell* 3, n°. 5 (Mai): 565-577.

Pérez-Galán, Patricia, Gaël Roué, Neus Villamor, Elias Campo, et Dolors Colomer. 2007. The BH3-mimetic GX15-070 synergizes with bortezomib in mantle cell lymphoma by enhancing Noxa-mediated activation of Bak. *Blood* 109, n°. 10 (Mai 15): 4441-4449.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, et Rees CA. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752.

Perou, C M, T Sørli, M B Eisen, M van de Rijn, S S Jeffrey, C A Rees, J R Pollack, et al. 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, n°. 6797 (Août 17): 747-752.

Perry, G, A K Raina, A Nunomura, T Wataya, L M Sayre, et M A Smith. 2000. How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 28, n°. 5 (Mars 1): 831-834.

Peterson, R T, P A Beal, M J Comb, et S L Schreiber. 2000. FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *The Journal of Biological Chemistry* 275, n°. 10 (Mars 10): 7416-7423.

Peterson, Timothy R, Mathieu Laplante, Carson C Thoreen, Yasemin Sancak, Seong A Kang, W Michael Kuehl, Nathanael S Gray, et David M Sabatini. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, n°. 5 (Mai 29): 873-886.

Petros, A M, A Medek, D G Nettesheim, D H Kim, H S Yoon, K Swift, E D Matayoshi, T Oltersdorf, et S W Fesik. 2001. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, n°. 6 (Mars 13): 3012-3017.

Pietras, R J, J Arboleda, D M Reese, N Wongvipat, M D Pegram, L Ramos, C M Gorman, M G Parker, M X Sliwkowski, et D J Slamon. 1995. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 10, n°. 12 (Juin 15): 2435-2446.

Piskernik, Christina, Susanne Haindl, Tricia Behling, Zanon Gerald, Ingeborg Kehrer, Heinz Redl, et Andrey V Kozlov. 2008. Antimycin A and lipopolysaccharide cause the leakage of superoxide radicals from rat liver mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1782, n°. 4 (Avril): 280-285.

Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, et Foy L. 1993. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1746-1750.

Polager, Shirley, et Doron Ginsberg. 2009. p53 and E2f: partners in life and death. *Nature Reviews. Cancer* 9, n°. 10 (Octobre): 738-748.

Pompeia, Celine, David R Hodge, Christoph Plass, Yue-Zhong Wu, Victor E Marquez, James A Kelley, et William L Farrar. 2004. Microarray analysis of epigenetic silencing of gene expression in the KAS-6/1 multiple myeloma cell line. *Cancer Research* 64, n°. 10 (Mai 15): 3465-3473.

Porstmann, Thomas, Claudio R Santos, Beatrice Griffiths, Megan Cully, Mary Wu, Sally Leever, John R Griffiths, Yuen-Li Chung, et Almut Schulze. 2008. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metabolism* 8, n°. 3 (Septembre): 224-236.

Potti, Anil, Holly K Dressman, Andrea Bild, Richard F Riedel, Gina Chan, Robyn Sayer, Janiel Cragun, et al. 2006. Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics. *Nature Medicine* 12, n°. 11 (Novembre): 1294-1300.

Poulin, F, A C Gingras, H Olsen, S Chevalier, et N Sonenberg. 1998. 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *The Journal of Biological Chemistry* 273, n°. 22 (Mai 29): 14002-14007.

Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, et Ullrich A. 2001. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 8: 11-31.

Print, C G, K L Loveland, L Gibson, T Meehan, A Stylianou, N Wreford, D de Kretser, et al. 1998. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, n°. 21 (Octobre 13): 12424-12431.

Pugazhenth, S, A Nesterova, C Sable, K A Heidenreich, L M Boxer, L E Heasley, et J E Reusch. 2000. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* 275, n°. 15 (Avril 14): 10761-10766.

Putcha, G V, K L Moulder, J P Golden, P Bouillet, J A Adams, A Strasser, et E M Johnson. 2001. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* 29, n°. 3 (Mars): 615-628.

Puthalakath, H, D C Huang, L A O'Reilly, S M King, et A Strasser. 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular Cell* 3, n°. 3 (Mars): 287-296.

Puthalakath, H, et A Strasser. 2002. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death and Differentiation* 9, n°. 5 (Mai): 505-512.

Puthalakath, H, A Villunger, L A O'Reilly, J G Beaumont, L Coultas, R E Cheney, D C Huang, et A Strasser. 2001. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science (New York, N.Y.)* 293, n°. 5536 (Septembre 7): 1829-1832.

Qi, Xiao-Jun, Gary M Wildey, et Philip H Howe. 2006. Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function. *The Journal of Biological Chemistry* 281, n°. 2 (Janvier 13): 813-823.

Radimerski, Thomas, Jacques Montagne, Felix Rintelen, Hugo Stocker, Jeroen van der Kaay, C Peter Downes, Ernst Hafen, et George Thomas. 2002. dS6K-regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1. *Nature Cell Biology* 4, n°. 3 (Mars): 251-255.

Raught, B, A C Gingras, S P Gygi, H Imataka, S Morino, A Gradi, R Aebersold, et N Sonenberg. 2000. Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4G1. *The EMBO Journal* 19, n°. 3 (Février 1): 434-444.

Raught, Brian, Franck Peiretti, Anne-Claude Gingras, Mark Livingstone, David Shahbazian, Greg L Mayeur, Roberto D Polakiewicz, Nahum Sonenberg, et John W B Hershey. 2004. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *The EMBO Journal* 23, n°. 8 (Avril 21): 1761-1769.

Ray, P, S K Ghosh, D H Zhang, et A Ray. 1997. Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor. *FEBS Letters* 409, n°. 1 (Juin 2): 79-85.

Rayala, Suresh K, Amjad H Talukder, Seetharaman Balasenthil, Robbin Tharakan, Christopher J Barnes, Rui-An Wang, C Marcelo Aldaz, Sohaib Khan, et Rakesh Kumar. 2006. P21-activated kinase 1 regulation of estrogen receptor-alpha activation involves serine 305 activation linked with serine 118 phosphorylation. *Cancer Research* 66, n°. 3 (Février 1): 1694-1701.

Razandi, M, A Pedram, G L Greene, et E R Levin. 1999. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 13, n°. 2 (Février): 307-319.

Razandi, M, A Pedram, et E R Levin. 2000. Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 14, n°. 9 (Septembre): 1434-1447.

Razandi, Mahnaz, Philip Oh, Ali Pedram, Jan Schnitzer, et Ellis R Levin. 2002. ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 16, n°. 1 (Janvier): 100-115.

Razandi, Mahnaz, Ali Pedram, Istvan Merchenthaler, Geoffrey L Greene, et Ellis R Levin. 2004. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 18, n°. 12 (Décembre): 2854-2865.

Razandi, Mahnaz, Ali Pedram, Eliot M Rosen, et Ellis R Levin. 2004. BRCA1 inhibits membrane estrogen and growth factor receptor signaling to cell proliferation in breast cancer. *Molecular and Cellular Biology* 24, n°. 13 (Juillet): 5900-5913.

Real, Pedro J, Cristina Sanz, Olga Gutierrez, Carlos Pipaon, Ana M Zubiaga, et Jose L Fernandez-Luna. 2006. Transcriptional activation of the proapoptotic bik gene by E2F proteins in cancer cells. *FEBS Letters* 580, n°. 25 (Octobre 30): 5905-5909.

Real, Pedro J, Angels Sierra, Ana De Juan, Jose C Segovia, Jose M Lopez-Vega, et Jose L Fernandez-Luna. 2002. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene* 21, n°. 50 (Octobre 31): 7611-7618.

Reed, J C. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, n°. 25 (Décembre 24): 3225-3236.

Ricci, M Stacey, Zhaoyu Jin, Michael Dews, Duonan Yu, Andrei Thomas-Tikhonenko, David T Dicker, et Wafik S El-Deiry. 2004. Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity. *Molecular and Cellular Biology* 24, n°. 19 (Octobre): 8541-8555.

Ricci, M Stacey, Seok-Hyun Kim, Kazuhiro Ogi, John P Plastaras, Jianhua Ling, Wenge Wang, Zhaoyu Jin, et al. 2007. Reduction of TRAIL-induced Mcl-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death. *Cancer Cell* 12, n°. 1 (Juillet): 66-80.

Riccio, A, S Ahn, C M Davenport, J A Blendy, et D D Ginty. 1999. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science (New York, N.Y.)* 286, n°. 5448 (Décembre 17): 2358-2361.

Richardson, Paul G, Constantine Mitsiades, Teru Hideshima, et Kenneth C Anderson. 2006. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annual Review of Medicine* 57: 33-47.

Rinkenberger, J L, S Horning, B Klocke, K Roth, et S J Korsmeyer. 2000. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes & Development* 14, n°. 1 (Janvier 1): 23-27.

Ritter, Christoph A, Marianela Perez-Torres, Cammie Rinehart, Marta Guix, Teresa Dugger, Jeffrey A Engelman, et Carlos L Arteaga. 2007. Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13, n°. 16 (Août 15): 4909-4919.

Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, et Ayers M. 2003. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 8: 307-325.

Rottmann, S, et B Lüscher. 2006. The Mad side of the Max network: antagonizing the function of Myc and more. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 302: 63-122.

Roux, Philippe P, Bryan A Ballif, Rana Anjum, Steven P Gygi, et John Blenis. 2004. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, n°. 37 (Septembre 14): 13489-13494.

Saeki, T, A Cristiano, M J Lynch, M Brattain, N Kim, N Normanno, N Kenney, F Ciardiello, et D S Salomon. 1991. Regulation by estrogen through the 5'-flanking region of the transforming growth factor alpha gene. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 5, n°. 12 (Décembre): 1955-1963.

Saelens, Xavier, Nele Festjens, Lieselotte Vande Walle, Maria van Gurp, Geert van Loo, et Peter Vandenabeele. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, n°. 16 (Avril 12): 2861-2874.

Safe, S. 2001. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitamins and Hormones* 62: 231-252.

Saito, M, S J Korsmeyer, et P H Schlesinger. 2000. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nature Cell Biology* 2, n°. 8 (Août): 553-555.

Salomon, D S, R Brandt, F Ciardiello, et N Normanno. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 19, n°. 3 (Juillet): 183-232.

Sancak, Yasemin, Carson C Thoreen, Timothy R Peterson, Robert A Lindquist, Seong A Kang, Eric Spooner, Steven A Carr, et David M Sabatini. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular Cell* 25, n°. 6 (Mars 23): 903-915.

Sanchez, Rocio, Denis Nguyen, Walter Rocha, John H White, et Sylvie Mader. 2002. Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 24, n°. 3 (Mars): 244-254.

Sanz, C, B Mellstrom, W A Link, J R Naranjo, et J L Fernandez-Luna. 2001. Interleukin 3-dependent activation of DREAM is involved in transcriptional silencing of the apoptotic Hrk gene in hematopoietic progenitor cells. *The EMBO Journal* 20, n°. 9 (Mai 1): 2286-2292.

Sarbassov, D D, Siraj M Ali, Do-Hyung Kim, David A Guertin, Robert R Latek, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, et David M Sabatini. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology: CB* 14, n°. 14 (Juillet 27): 1296-1302.

Sarbassov, D D, David A Guertin, Siraj M Ali, et David M Sabatini. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)* 307, n°. 5712 (Février 18): 1098-1101.

Sattler, M, H Liang, D Nettesheim, R P Meadows, J E Harlan, M Eberstadt, H S Yoon, et al. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 275, n°. 5302 (Février 14): 983-986.

Sawada, Motoshi, Paulette Hayes, et Shigemi Matsuyama. 2003. Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nature Cell Biology* 5, n°. 4 (Avril): 352-357.

Sawada, Motoshi, Weiyong Sun, Paulette Hayes, Konstantin Leskov, David A Boothman, et Shigemi Matsuyama. 2003. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nature Cell Biology* 5, n°. 4 (Avril): 320-329.

Sax, Joanna K, Peiwen Fei, Maureen E Murphy, Eric Bernhard, Stanley J Korsmeyer, et Wafik S El-Deiry. 2002. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nature Cell Biology* 4, n°. 11 (Novembre): 842-849.

Schafer, F Q, et G R Buettner. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine* 30, n°. 11 (Juin 1): 1191-1212.

Schalm, Stefanie S, Diane C Fingar, David M Sabatini, et John Blenis. 2003. TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Current Biology: CB* 13, n°. 10 (Mai 13): 797-806.

Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, et Francke U. 1985. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 229: 976-978.

Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, et Greene MI. 1984. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312: 513-516.

Schieke, Stefan M, Darci Phillips, J Philip McCoy, Angel M Aponte, Rong-Fong Shen, Robert S Balaban, et Toren Finkel. 2006. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *The Journal of Biological Chemistry* 281, n°. 37 (Septembre 15): 27643-27652.

Schiff, Rachel, Suleiman Massarweh, Jiang Shou, et C Kent Osborne. 2003. Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 9, n°. 1 (Janvier): 447S-54S.

Schiff, Rachel, Suleiman A Massarweh, Jiang Shou, Lavina Bharwani, Syed K Mohsin, et C Kent Osborne. 2004. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10, n°. 1 (Janvier 1): 331S-6S.

Scorrano, Luca, Scott A Oakes, Joseph T Opferman, Emily H Cheng, Mia D Sorcinelli, Tullio Pozzan, et Stanley J Korsmeyer. 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 300, n°. 5616 (Avril 4): 135-139.

Sedlak, T W, Z N Oltvai, E Yang, K Wang, L H Boise, C B Thompson, et S J Korsmeyer. 1995. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, n°. 17 (Août 15): 7834-7838.

Segatto O, King CR, Pierce JH, Di Fiore PP, et Aaronson SA. 1988. Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Mol Cell Biol* 8: 5570-5574.

Sekulić, A, C C Hudson, J L Homme, P Yin, D M Otterness, L M Karnitz, et R T Abraham. 2000. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Research* 60, n°. 13 (Juillet 1): 3504-3513.

Sengupta, Surojeet, et V Craig Jordan. 2008. Selective estrogen modulators as an anticancer tool: mechanisms of efficiency and resistance. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 630: 206-219.

Seton-Rogers SE, Lu Y, Hines LM, Koundinya M, LaBaer J, et Muthuswamy SK. 2004. Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1257-1262.

Séveno C, Campone M, Juin P, Barillé-Nion S, 2009. Blockage of Notch signalling by GSI induces apoptosis in Human breast cancer cells through various molecular mechanisms involving surviving and BH3-Only Members of the Bcl-2 family. *Cancer Res* 2009; 69 (Suppl.): (24). December 15, abstract: 2160.

Sharma, Sreenath V, Michael A Fischbach, Daniel A Haber, et Jeffrey Settleman. 2006. "Oncogenic shock": explaining oncogene addiction through differential signal attenuation. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12, n°. 14 (Juillet 15): 4392s-4395s.

Sharma, Sreenath V, et Jeffrey Settleman. 2007. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes & Development* 21, n°. 24 (Décembre 15): 3214-3231.

Shattuck, David L, Jamie K Miller, Kermit L Carraway, et Colleen Sweeney. 2008. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Research* 68, n°. 5 (Mars 1): 1471-1477.

Shaw, James, Natalia Yurkova, Tong Zhang, Hongying Gang, Floribeth Aguilar, Danielle Weidman, Carly Scramstad, Harvey Weisman, et Lorrie A Kirshenbaum. 2008. Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF-kappaB is essential for basal cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, n°. 52 (Décembre 30): 20734-20739.

Shaw, Reuben J, Monica Kosmatka, Nabeel Bardeesy, Rebecca L Hurley, Lee A Witters, Ronald A DePinho, et Lewis C Cantley. 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, n°. 10 (Mars 9): 3329-3335.

Shiau, A K, D Barstad, P M Loria, L Cheng, P J Kushner, D A Agard, et G L Greene. 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, n°. 7 (Décembre 23): 927-937.

Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majmudar K, Suzuki M, et Lee H. 2005. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 65: 1642-1646.

Shih C, Padhy LC, Murray M, et Weinberg RA. 1981. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290: 261-264.

Shima, H, M Pende, Y Chen, S Fumagalli, G Thomas, et S C Kozma. 1998. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *The EMBO Journal* 17, n°. 22 (Novembre 16): 6649-6659.

Shimizu, S, M Narita, et Y Tsujimoto. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, n°. 6735 (Juin 3): 483-487.

Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, et Baselga J. 2002. PKB//Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8: 1145-1152.

Shinjyo, T, R Kuribara, T Inukai, H Hosoi, T Kinoshita, A Miyajima, P J Houghton, A T Look, K Ozawa, et T Inaba. 2001. Downregulation of Bim, a proapoptotic relative of Bcl-2, is a pivotal step in cytokine-initiated survival signaling in murine hematopoietic progenitors. *Molecular and Cellular Biology* 21, n°. 3 (Février): 854-864.

Shiozaki, Eric N, Jijie Chai, Daniel J Rigotti, Stefan J Riedl, Pingwei Li, Srinivasa M Srinivasula, Emad S Alnemri, Robert Fairman, et Yigong Shi. 2003. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Molecular Cell* 11, n°. 2 (Février): 519-527.

Shou, Jiang, Suleiman Massarweh, C Kent Osborne, Alan E Wakeling, Simale Ali, Heidi Weiss, et Rachel Schiff. 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 96, n°. 12 (Juin 16): 926-935.

Slichenmyer, W J, et D W Fry. 2001. Anticancer therapy targeting the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Seminars in Oncology* 28, n°. 5 (Octobre): 67-79.

Sliwkowski MX. 2003. Ready to partner. *Nat Struct Biol* 10: 158-159.

Sofer, Avi, Kui Lei, Cory M Johannessen, et Leif W Ellisen. 2005. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Molecular and Cellular Biology* 25, n°. 14 (Juillet): 5834-5845.

Song, Robert X, Christopher J Barnes, Zhenguo Zhang, Yongde Bao, Rakesh Kumar, et Richard J Santen. 2004. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, n°. 7 (Février 17): 2076-2081.

Speidel, Daniel. 2010. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends in Cell Biology* 20, n°. 1 (Janvier): 14-24.

Speirs, V, P J Carder, et M R J Lansdown. 2002. Oestrogen receptor beta: how should we measure this? *British Journal of Cancer* 87, n°. 6 (Septembre 9): 687; author reply 688-689.

Sporn, Michael B, et Nanjoo Suh. 2002. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nature Reviews. Cancer* 2, n°. 7 (Juillet): 537-543.

Srinivasula, S M, M Ahmad, M MacFarlane, Z Luo, Z Huang, T Fernandes-Alnemri, et E S Alnemri. 1998. Generation of constitutively active recombinant caspases-3 and -6 by rearrangement of their subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 273, n°. 17 (Avril 24): 10107-10111.

Srinivasula, Srinivasa M, Sanjeev Gupta, Pinaki Datta, ZhiJia Zhang, Ramesh Hegde, NaEun Cheong, Teresa Fernandes-Alnemri, et Emad S Alnemri. 2003. Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *The Journal of Biological Chemistry* 278, n°. 34 (Août 22): 31469-31472.

Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkins S, Davies H, et Teague J. 2004. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 431: 525-526.

Stocker, Hugo, Thomas Radimerski, Benno Schindelholtz, Franz Wittwer, Priyanka Belawat, Pierre Daram, Sebastian Breuer, George Thomas, et Ernst Hafen. 2003. Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nature Cell Biology* 5, n°. 6 (Juin): 559-565.

Subramanian, T, S Vijayalingam, Elena Lomonosova, Ling-jun Zhao, et G Chinnadurai. 2007. Evidence for involvement of BH3-only proapoptotic members in adenovirus-induced apoptosis. *Journal of Virology* 81, n°. 19 (Octobre): 10486-10495.

Sunters, Andrew, Silvia Fernández de Mattos, Marie Stahl, Jan J Brosens, Georgia Zoumpoulidou, Catherine A Saunders, Paul J Coffey, René H Medema, R Charles Coombes, et Eric W-F Lam. 2003. FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *The Journal of Biological Chemistry* 278, n°. 50 (Décembre 12): 49795-49805.

Suzuki, M, R J Youle, et N Tjandra. 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, n°. 4 (Novembre 10): 645-654.

Szatrowski, T P, et C F Nathan. 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Research* 51, n°. 3 (Février 1): 794-798.

Tahir, Stephen K, Xiufen Yang, Mark G Anderson, Susan E Morgan-Lappe, Aparna V Sarthy, Jun Chen, Robert B Warner, et al. 2007. Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737. *Cancer Research* 67, n°. 3 (Février 1): 1176-1183.

Takahashi, T, K Hara, H Inoue, Y Kawa, C Tokunaga, S Hidayat, K Yoshino, Y Kuroda, et K Yonezawa. 2000. Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 5, n°. 9 (Septembre): 765-775.

Takahashi, Yoshinori, Mariusz Karbowski, Hirohito Yamaguchi, Aslamuzzaman Kazi, Jie Wu, Saïd M Sebt, Richard J Youle, et Hong-Gang Wang. 2005. Loss of Bif-1 suppresses Bax/Bak conformational change and mitochondrial apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 25, n°. 21 (Novembre): 9369-9382.

Takano, A, I Usui, T Haruta, J Kawahara, T Uno, M Iwata, et M Kobayashi. 2001. Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Molecular and Cellular Biology* 21, n°. 15 (Août): 5050-5062.

Tee, Andrew R, Brendan D Manning, Philippe P Roux, Lewis C Cantley, et John Blenis. 2003. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Current Biology: CB* 13, n°. 15 (Août 5): 1259-1268.

Thiantanawat, Apinya, Brian J Long, et Angela M Brodie. 2003. Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Research* 63, n°. 22 (Novembre 15): 8037-8050.

Thornberry, N A, et Y Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science (New York, N.Y.)* 281, n°. 5381 (Août 28): 1312-1316.

Timms JF, White SL, O'Hare MJ, et Waterfield MD. 2002. Effects of ErbB-2 overexpression on mitogenic signalling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells. *Oncogene* 21: 6573-6586.

Tinel, Antoine, et Jürg Tschopp. 2004. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science (New York, N.Y.)* 304, n°. 5672 (Mai 7): 843-846.

Tokunaga, Chiharu, Ken-ichi Yoshino, et Kazuyoshi Yonezawa. 2004. mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, n°. 2 (Janvier 9): 443-446.

Torres, Eduardo M, Tanya Sokolsky, Cheryl M Tucker, Leon Y Chan, Monica Boselli, Maitreya J Dunham, et Angelika Amon. 2007a. Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science (New York, N.Y.)* 317, n°. 5840 (Août 17): 916-924.

Torres, Eduardo M, Bret R Williams, et Angelika Amon. 2008. Aneuploidy: cells losing their balance. *Genetics* 179, n°. 2 (Juin): 737-746.

Townsley, Fiona M., Alexander Aristarkhov, Sharon Beck, Avram Herskho, et Joan V. Ruderman. 1997. Dominant-negative cyclin-selective ubiquitin carrier protein E2-C/UbcH10 blocks cells in metaphase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, n°. 6 (Mars 18): 2362-2367.

- Trachootham, Duniyaporn, Jerome Alexandre, et Peng Huang. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews. Drug Discovery* 8, n°. 7 (Juillet): 579-591.
- Treins, C, P H Warne, M A Magnuson, M Pende, et J Downward. 2010. Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1. *Oncogene* 29, n°. 7 (Février 18): 1003-1016.
- Tremblais, K, L Oliver, P Juin, T M Le Cabellec, K Meflah, et F M Vallette. 1999. The C-terminus of bax is not a membrane addressing/anchoring signal. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260, n°. 3 (Juillet 14): 582-591.
- Trudel, Suzanne, Zhi Hua Li, Jennifer Rauw, Rodger E Tiedemann, Xiao Yan Wen, et A Keith Stewart. 2007. Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood* 109, n°. 12 (Juin 15): 5430-5438.
- Tsafrir, Dafna, Manny Bacolod, Zachariah Selvanayagam, Ilan Tsafrir, Jinru Shia, Zhaoshi Zeng, Hao Liu, et al. 2006. Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer Research* 66, n°. 4 (Février 15): 2129-2137.
- Tsujimoto, Y, L R Finger, J Yunis, P C Nowell, et C M Croce. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science (New York, N.Y.)* 226, n°. 4678 (Novembre 30): 1097-1099.
- Tzung, S P, K M Kim, G Basañez, C D Giedt, J Simon, J Zimmerberg, K Y Zhang, et D M Hockenbery. 2001. Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nature Cell Biology* 3, n°. 2 (Février): 183-191.
- Valabrega, Giorgio, Filippo Montemurro, Ivana Sarotto, Annalisa Petrelli, Patrizia Rubini, Carlo Tacchetti, Massimo Aglietta, Paolo Maria Comoglio, et Silvia Giordano. 2005. TGFalpha expression impairs Trastuzumab-induced HER2 downregulation. *Oncogene* 24, n°. 18 (Avril 21): 3002-3010.
- Vander Haar, Emilie, Seong-II Lee, Sricharan Bandhakavi, Timothy J Griffin, et Do-Hyung Kim. 2007. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature Cell Biology* 9, n°. 3 (Mars): 316-323.

Veis, D J, C M Sorenson, J R Shutter, et S J Korsmeyer. 1993. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, n°. 2 (Octobre 22): 229-240.

Ventura, Andrea, David G Kirsch, Margaret E McLaughlin, David A Tuveson, Jan Grimm, Laura Lintault, Jamie Newman, Elizabeth E Reczek, Ralph Weissleder, et Tyler Jacks. 2007. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, n°. 7128 (Février 8): 661-665.

Verma, S, L J Zhao, et G Chinnadurai. 2001. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 276, n°. 7 (Février 16): 4671-4676.

Vervoorts, Jörg, Juliane Lüscher-Firzlaff, et Bernhard Lüscher. 2006. The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* 281, n°. 46 (Novembre 17): 34725-34729.

Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, et Califano D. 2002. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB//Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 8: 1136-1144.

Villunger, Andreas, Ewa M Michalak, Leigh Coultas, Franziska Müllauer, Gunther Böck, Michael J Ausserlechner, Jerry M Adams, et Andreas Strasser. 2003. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science (New York, N.Y.)* 302, n°. 5647 (Novembre 7): 1036-1038.

Vousden, Karen H, et Xin Lu. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews. Cancer* 2, n°. 8 (Août): 594-604.

Walensky, L D. 2006. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death and Differentiation* 13, n°. 8 (Août): 1339-1350.

Walensky, Loren D, Andrew L Kung, Iris Escher, Thomas J Malia, Scott Barbuto, Renee D Wright, Gerhard Wagner, Gregory L Verdine, et Stanley J Korsmeyer. 2004. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science (New York, N.Y.)* 305, n°. 5689 (Septembre 3): 1466-1470.

Wang, H G, N Pathan, I M Ethell, S Krajewski, Y Yamaguchi, F Shibasaki, F McKeon, T Bobo, T F Franke, et J C Reed. 1999. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science (New York, N.Y.)* 284, n°. 5412 (Avril 9): 339-343.

Wang, J L, D Liu, Z J Zhang, S Shan, X Han, S M Srinivasula, C M Croce, E S Alnemri, et Z Huang. 2000. Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, n°. 13 (Juin 20): 7124-7129.

Wang, K, A Gross, G Waksman, et S J Korsmeyer. 1998. Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. *Molecular and Cellular Biology* 18, n°. 10 (Octobre): 6083-6089.

Wang, K, X M Yin, D T Chao, C L Milliman, et S J Korsmeyer. 1996. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes & Development* 10, n°. 22 (Novembre 15): 2859-2869.

Wang, Zhaoyi, Xintian Zhang, Peng Shen, Brian W Loggie, Yunchao Chang, et Thomas F Deuel. 2006. A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, n°. 24 (Juin 13): 9063-9068.

WARBURG, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)* 123, n°. 3191 (Février 24): 309-314.

Wei, M C, T Lindsten, V K Mootha, S Weiler, A Gross, M Ashiya, C B Thompson, et S J Korsmeyer. 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & Development* 14, n°. 16 (Août 15): 2060-2071.

Wei, M C, W X Zong, E H Cheng, T Lindsten, V Panoutsakopoulou, A J Ross, K A Roth, G R MacGregor, C B Thompson, et S J Korsmeyer. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)* 292, n°. 5517 (Avril 27): 727-730.

Weigel, N L, et Y Zhang. 1998. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 76, n°. 7 (Juin): 469-479.

Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, et Ewend MG. 2005. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res* 65: 9155-9158.

Weinstein EJ, Kitsberg DI, et Leder P. 2000. A mouse model for breast cancer induced by amplification and overexpression of the neu promoter and transgene. *Mol Med* 6: 4-16.

Weinstein IB. 2002. CANCER: Enhanced: Addiction to Oncogenes - the Achilles Heal of Cancer. *Science* 297: 63-64.

Weinstein, I B. 2000. Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* 21, n°. 5 (Mai): 857-864.

Weinstein, I B, M Begemann, P Zhou, E K Han, A Sgambato, Y Doki, N Arber, M Ciaparrone, et H Yamamoto. 1997. Disorders in cell circuitry associated with multistage carcinogenesis: exploitable targets for cancer prevention and therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 3, n°. 12 (Décembre): 2696-2702.

Weinstein, I Bernard, et Andrew K Joe. 2006. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice. Oncology* 3, n°. 8 (Août): 448-457.

Wesarg, Emmanuelle, Sandra Hoffarth, Rainer Wiewrodt, Monika Kröll, Stefan Biesterfeld, Christoph Huber, et Martin Schuler. 2007. Targeting BCL-2 family proteins to overcome drug resistance in non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 121, n°. 11 (Décembre 1): 2387-2394.

Whitesell, Luke, et Susan L Lindquist. 2005a. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews. Cancer* 5, n°. 10 (Octobre): 761-772.

Whitfield, J, S J Neame, L Paquet, O Bernard, et J Ham. 2001. Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* 29, n°. 3 (Mars): 629-643.

Williams, Bret R, Vineet R Prabhu, Karen E Hunter, Christina M Glazier, Charles A Whittaker, David E Housman, et Angelika Amon. 2008. Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)* 322, n°. 5902 (Octobre 31): 703-709.

Willis, Simon N, Lin Chen, Grant Dewson, Andrew Wei, Edwina Naik, Jamie I Fletcher, Jerry M Adams, et David C S Huang. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes & Development* 19, n°. 11 (Juin 1): 1294-1305.

Willis, Simon N, Jamie I Fletcher, Thomas Kaufmann, Mark F van Delft, Lin Chen, Peter E Czabotar, Helen Ierino, et al. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science (New York, N.Y.)* 315, n°. 5813 (Février 9): 856-859.

Wong, Chi-Wai, Christopher McNally, Elliot Nickbarg, Barry S Komm, et Boris J Cheskis. 2002. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, n°. 23 (Novembre 12): 14783-14788.

Woods Ignatoski KM, Grewal NK, Markwart S, Livant DL, et Ethier SP. 2003. p38MAPK induces cell surface alpha4 integrin downregulation to facilitate erbB-2-mediated invasion. *Neoplasia* 5: 128-134.

Woods, Angela, Kristina Dickerson, Richard Heath, Seung-Pyo Hong, Milica Momcilovic, Stephen R Johnstone, Marian Carlson, et David Carling. 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metabolism* 2, n°. 1 (Juillet): 21-33.

Woods, Angela, Stephen R Johnstone, Kristina Dickerson, Fiona C Leiper, Lee G D Fryer, Dietbert Neumann, Uwe Schlattner, Theo Wallimann, Marian Carlson, et David Carling. 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current Biology: CB* 13, n°. 22 (Novembre 11): 2004-2008.

Wu, Hao, Jurg Tschopp, et Su-Chang Lin. 2007. Smac mimetics and TNFalpha: a dangerous liaison? *Cell* 131, n°. 4 (Novembre 16): 655-658.

Wu, Ray-Chang, Jun Qin, Yoshihiro Hashimoto, Jiemin Wong, Jianming Xu, Sophia Y Tsai, Ming-Jer Tsai, et Bert W O'Malley. 2002. Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase. *Molecular and Cellular Biology* 22, n°. 10 (Mai): 3549-3561.

Wu, Ray-Chang, Jun Qin, Ping Yi, Jiemin Wong, Sophia Y Tsai, Ming-Jer Tsai, et Bert W O'Malley. 2004. Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Molecular Cell* 15, n°. 6 (Septembre 24): 937-949.

Wu, Y, J W Mehew, C A Heckman, M Arcinas, et L M Boxer. 2001. Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 20, n°. 2 (Janvier 11): 240-251.

Xia, Wenle, Lei-Hua Liu, Peter Ho, et Neil L Spector. 2004. Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene* 23, n°. 3 (Janvier 22): 646-653.

Xiao, Changchun, Lakshmi Srinivasan, Dinis Pedro Calado, Heide Christine Patterson, Baochun Zhang, Jing Wang, Joel M Henderson, Jeffrey L Kutok, et Klaus Rajewsky. 2008. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nature Immunology* 9, n°. 4 (Avril): 405-414.

Xing, Chengguo, Liangyou Wang, XiaoHu Tang, et Yuk Y Sham. 2007. Development of selective inhibitors for anti-apoptotic Bcl-2 proteins from BHI-1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15, n°. 5 (Mars 1): 2167-2176.

Yamashita, Masakatsu, Makoto Kuwahara, Akane Suzuki, Kiyoshi Hirahara, Ryo Shinnaksu, Hiroyuki Hosokawa, Akihiro Hasegawa, Shinichiro Motohashi, Atsushi Iwama, et Toshinori Nakayama. 2008. Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the Noxa gene. *The Journal of Experimental Medicine* 205, n°. 5 (Mai 12): 1109-1120.

Yang C, Ionescu-Tiba V, Burns K, Gadd M, Zukerberg L, et Louis DN. 2004. The role of the cyclin D1-dependent kinases in ErbB2-mediated breast cancer. *Am J Pathol* 164: 1031-1038.

Yang HY, Zhou BP, Hung MC, et Lee MH. 2000. Oncogenic signals of HER-2/neu in regulating the stability of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *J Biol Chem* 275: 24735-24739.

Yang, Qi-Heng, Robin Church-Hajduk, Jinyu Ren, Michelle L Newton, et Chunying Du. 2003. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes & Development* 17, n°. 12 (Juin 15): 1487-1496.

Yang, Qian, Ken Inoki, Tsuneo Ikenoue, et Kun-Liang Guan. 2006. Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes & Development* 20, n°. 20 (Octobre 15): 2820-2832.

Yang, T, K M Kozopas, et R W Craig. 1995. The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *The Journal of Cell Biology* 128, n°. 6 (Mars): 1173-1184.

Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, et Nakanishi M. 2006. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep* 15: 65-71.

- Yokogami, K, S Wakisaka, J Avruch, et S A Reeves. 2000. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Current Biology: CB* 10, n°. 1 (Janvier 13): 47-50.
- Youn, Cha-Kyung, Hyun-Ju Cho, Soo-Hyun Kim, Hong-Beum Kim, Mi-Hwa Kim, In-Youb Chang, Jung-Sup Lee, Myung-Hee Chung, Kyung-Soo Hahm, et Ho Jin You. 2005. Bcl-2 expression suppresses mismatch repair activity through inhibition of E2F transcriptional activity. *Nature Cell Biology* 7, n°. 2 (Février): 137-147.
- Yu, H, R W King, J M Peters, et M W Kirschner. 1996. Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. *Current Biology: CB* 6, n°. 4 (Avril 1): 455-466.
- Yu, J, L Zhang, P M Hwang, K W Kinzler, et B Vogelstein. 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular Cell* 7, n°. 3 (Mars): 673-682.
- Yu, Seong-Woon, Hongmin Wang, Marc F Poitras, Carmen Coombs, William J Bowers, Howard J Federoff, Guy G Poirier, Ted M Dawson, et Valina L Dawson. 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science (New York, N.Y.)* 297, n°. 5579 (Juillet 12): 259-263.
- Yuan, T L, et L C Cantley. 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, n°. 41 (Septembre 18): 5497-5510.
- Yuan, Guogang, Lu Qian, Ming Shi, Feng Lu, Dan Li, Meiru Hu, Ming Yu, Beifen Shen, et Ning Guo. 2008. HER2-dependent MMP-7 expression is mediated by activated STAT3. *Cellular Signalling* 20, n°. 7 (Juillet): 1284-1291.
- Zeitlin, Benjamin D, Esther Joo, Zhihong Dong, Kristy Warner, Guoping Wang, Zaneta Nikolovska-Coleska, Shaomeng Wang, et Jacques E Nör. 2006. Antiangiogenic effect of TW37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2. *Cancer Research* 66, n°. 17 (Septembre 1): 8698-8706.
- Zha, J, H Harada, K Osipov, J Jockel, G Waksman, et S J Korsmeyer. 1997. BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *The Journal of Biological Chemistry* 272, n°. 39 (Septembre 26): 24101-24104.
- Zha, J, H Harada, E Yang, J Jockel, et S J Korsmeyer. 1996a. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, n°. 4 (Novembre 15): 619-628.

- Zha, J, S Weiler, K J Oh, M C Wei, et S J Korsmeyer. 2000. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)* 290, n°. 5497 (Décembre 1): 1761-1765.
- Zhai, Dayong, Frederic Luciano, Xiuwen Zhu, Bin Guo, Arnold C Satterthwait, et John C Reed. 2005. Humanin binds and nullifies Bid activity by blocking its activation of Bax and Bak. *The Journal of Biological Chemistry* 280, n°. 16 (Avril 22): 15815-15824.
- Zhan L, Xiang B, et Muthuswamy SK. 2006. Controlled activation of ErbB1//ErbB2 heterodimers promote invasion of three-dimensional organized epithelia in an ErbB1-dependent manner: implications for progression of ErbB2-overexpressing tumors. *Cancer Res* 66: 5201-5208.
- Zhan, Yonghua, Guangfeng Jia, Daocheng Wu, Yiqing Xu, et Liang Xu. 2009. Design and synthesis of a gossypol derivative with improved antitumor activities. *Archiv Der Pharmazie* 342, n°. 4 (Avril): 223-229.
- Zhang, H, S W Cowan-Jacob, M Simonen, W Greenhalf, J Heim, et B Meyhack. 2000. Structural basis of BFL-1 for its interaction with BAX and its anti-apoptotic action in mammalian and yeast cells. *The Journal of Biological Chemistry* 275, n°. 15 (Avril 14): 11092-11099.
- Zhang, Hongbing, Natalia Bajraszewski, Erxi Wu, Hongwei Wang, Annie P Moseman, Sandra L Dabora, James D Griffin, et David J Kwiatkowski. 2007. PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *The Journal of Clinical Investigation* 117, n°. 3 (Mars): 730-738.
- Zhang, Honglai, Jin Koo Kim, Chris A Edwards, Zhaohui Xu, Russell Taichman, et Cun-Yu Wang. 2005. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nature Cell Biology* 7, n°. 9 (Septembre): 909-915.
- Zhang, Yong, Xinsheng Gao, Leslie J Saucedo, Binggen Ru, Bruce A Edgar, et Duoia Pan. 2003. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nature Cell Biology* 5, n°. 6 (Juin): 578-581.
- Zhang, Yong-Hong, Anirban Bhunia, Kah Fei Wan, Mei Chin Lee, Shing-Leng Chan, Victor C-K Yu, et Yu-Keung Mok. 2006. Chelerythrine and sanguinarine dock at distinct sites on BclXL that are not the classic BH3 binding cleft. *Journal of Molecular Biology* 364, n°. 3 (Décembre 1): 536-549.

Zhou, B B, et S J Elledge. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, n°. 6811 (Novembre 23): 433-439.

Zhou, X M, Y Liu, G Payne, R J Lutz, et T Chittenden. 2000. Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on Ser155. *The Journal of Biological Chemistry* 275, n°. 32 (Août 11): 25046-25051.

Zhou, Xiaoyan, Ming Tan, Valerie Stone Hawthorne, Kristine S Klos, Keng-Hsueh Lan, Ying Yang, Wentao Yang, Terry L Smith, Daren Shi, et Dihua Yu. 2004. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10, n°. 20 (Octobre 15): 6779-6788.

Zhu, W, A Cowie, G W Wasfy, L Z Penn, B Leber, et D W Andrews. 1996. Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *The EMBO Journal* 15, n°. 16 (Août 15): 4130-4141.

Zimmermann, Angela K, F Alexandra Loucks, Shoshona S Le, Brent D Butts, Maria L Florez-McClure, Ron J Bouchard, Kim A Heidenreich, et Daniel A Linseman. 2005. Distinct mechanisms of neuronal apoptosis are triggered by antagonism of Bcl-2/Bcl-x(L) versus induction of the BH3-only protein Bim. *Journal of Neurochemistry* 94, n°. 1 (Juillet): 22-36.

Zindy, F, C M Eischen, D H Randle, T Kamijo, J L Cleveland, C J Sherr, et M F Roussel. 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes & Development* 12, n°. 15 (Août 1): 2424-2433.

Zong, W X, T Lindsten, A J Ross, G R MacGregor, et C B Thompson. 2001. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & Development* 15, n°. 12 (Juin 15): 1481-1486.

Zou, H, W J Henzel, X Liu, A Lutschg, et X Wang. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, n°. 3 (Août 8): 405-413.

Zou, H, Y Li, X Liu, et X Wang. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of Biological Chemistry* 274, n°. 17 (Avril 23): 11549-11556.

Zsebik, Barbara, Ami Citri, Jorma Isola, Yosef Yarden, János Szöllosi, et György Vereb. 2006. Hsp90 inhibitor 17-AAG reduces ErbB2 levels and inhibits proliferation of the trastuzumab resistant breast tumor cell line JIMT-1. *Immunology Letters* 104, n°. 1 (Avril 15): 146-155.

Zwart, Wilbert, Alexander Griekspoor, Valeria Berno, Kim Lakeman, Kees Jalink, Michael Mancini, Jacques Neefjes, et Rob Michalides. 2007. PKA-induced resistance to tamoxifen is associated with an altered orientation of ERalpha towards co-activator SRC-1. *The EMBO Journal* 26, n°. 15 (Août 8): 3534-3544.

Titre : Implication des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans la dépendance aux signaux de survie des cancers du sein des sous-types HER2 et Luminal.

Mots-clefs : oncogènes, apoptose, protéines de la famille de Bcl-2.

Le cancer du sein est une maladie hétérogène notamment dans sa diversité et sa dépendance aux voies de signalisation oncogéniques (par exemple, voie HER2). Ces dépendances traduisent l'activation par les oncogènes de signaux antagonistes, de mort et de survie, de prolifération et d'arrêt cellulaire. Les protéines de la famille Bcl-2 constituent un point d'intégration majeur des signaux de survie et de mort des cellules cancéreuses. La fonction des protéines anti-apoptotiques repose sur leur capacité à interagir physiquement avec leurs contreparties apoptotiques. Cette interaction est manipulable pharmacologiquement. Nous avons étudié si la survie des cellules tumorales mammaires dépendait de l'activité anti-apoptotique de certains homologues de Bcl-2 et si leur inhibition était susceptible d'avoir un effet thérapeutique. Par une première approche *in vitro*, nous avons mis en évidence que la survie de cellules surexprimant HER2 dépendait de Mcl-1 et qu'elle était liée à l'expression constitutive de la protéine pro-apoptotique Bim, elle-même liée au facteur de transcription c-Myc, situé en aval de HER2. Cette étude montre que l'équilibre Bim/Mcl-1 joue un rôle clé dans la régulation de la survie des cellules de cancer du sein surexprimant HER2. Dans une seconde approche, *ex-vivo*, nous avons exposé des prélèvements de tumeurs du sein de patientes à l'ABT-737, un inhibiteur de Bcl-2 et Bcl-xL. Nos résultats montrent qu'il induit une apoptose massive dans certaines tumeurs mammaires et a peu d'effet dans d'autres cas. Nous concluons que la voie HER2 peut induire un signal de mort qui rend nécessaire des signaux compensatoires de survie reposant sur l'activité des homologues de Bcl-2, instaurant un état de dépendance aiguë à ces signaux. Les approches fonctionnelles réalisées *ex-vivo* confirment cette notion tout en montrant qu'elle ne s'applique pas systématiquement. Elles fournissent l'outil méthodologique qui permet de détecter de telles dépendances, et d'étudier les voies qui les installent ou les inhibent.

Title : Implication of anti-apoptotic protein Bcl-2 in dependence on survival signals of breast cancer subtypes Luminal and HER2.

Keys words : oncogene, apoptosis, Bcl-2 family

Breast cancer is a heterogeneous disease, including its diversity and its dependence on oncogenic signaling pathways (eg, HER2). These dependencies reflect antagonist signal activation by oncogenes: death and survival, cell proliferation and arrest. Proteins of the Bcl-2 family represent a major point of integration of signals for survival and death of cancer cells. The function of anti-apoptotic proteins is based on their ability to physically interact with their apoptotic counterparts. This interaction can be manipulated pharmacologically. We studied if the survival of breast cancer cells depended on the activity of some anti-apoptotic Bcl-2 counterparts and if their inhibition might have a therapeutic effect. In an initial *in vitro* approach, we demonstrated that the survival of overexpressing HER2 cells depended on Mcl-1 and was linked to the constitutive expression of pro-apoptotic protein Bim, itself linked to c-Myc transcription factor, situated downstream to HER2. This study shows that Bim/Mcl-1 equilibrium plays a key role in regulating cell survival of overexpressing HER2 breast cancer cells. In a second approach, *ex-vivo*, we exposed samples of breast tumors of patients to ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 and Bcl-xL. Our results showed that, as a single agent, ABT-737 induced massive apoptosis in some breast tumors and have little effect in others. We conclude that HER2 pathway can induce death signal, which makes necessary compensatory survival signals on the activity of Bcl-2 homologues, creating a state of acute dependence of these signals. *Ex-vivo* functional approaches confirmed this notion while showing it is not the only one. Furthermore, they provide, a methodological tool that enables detection of such dependencies and the studying of pathways that inhibit or stimulate them.