

**Implication de l'oncogène STAT3
dans la réponse aux traitements de chimiothérapies :
Application au cancer colorectal**

THESE DE DOCTORAT
Spécialité Biologie Cellulaire et Moléculaire

ÉCOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement
Le 24 Novembre 2010
À Angers
Par : Sandy Courapied

Devant le jury ci-dessous :

Hubert HONDERMARCK, Professeur, Faculté de Lille, Lille
Fabrice GOUILLEUX, Directeur de Recherche CNRS, Tours
Philippe JUIN, Directeur de Recherche INSERM, Nantes
Erick GAMELIN, Professeur, Faculté de médecine, Angers
Olivier COQUERET, Professeur, Faculté d'Angers, Angers

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Directeur de thèse : Pr. Olivier COQUERET
U892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers
Centre Régional de Lutte Contre le Cancer CRLCC Paul PAPIN
2 rue Moll
49033 Angers cedex 09

Remerciements

Mon intérêt pour la recherche m'a incité à réaliser une thèse de doctorat. J'arrive, au bout de ces quatre ans, à la fin de mon travail. J'en retire une grande expérience professionnelle et humaine. Maintenant que l'aventure touche à sa fin, je tiens à adresser mes remerciements à celles et ceux qui m'ont permis de réaliser ce travail et qui m'ont accompagnées tout au long de ce chemin.

Tout d'abord, je tiens particulièrement à adresser mes remerciements au Pr Erick Gamelin pour m'avoir accueillie au sein du Centre Régional de Lutte Contre le Cancer, Paul Papin, à ce titre je remercie également le Pr François Régis Bataille, actuel Directeur du Centre Paul Papin. Je suis également très honorée de la présence du Professeur Erick Gamelin en tant qu'examineur dans mon jury de thèse.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance au Dr Michèle Boisdron-Celle ainsi qu'aux Pr Olivier Coqueret, Alain Morel et au Dr Catherine Guette pour m'avoir intégrée à l'équipe, il y a quatre ans déjà. Je les remercie pour leur disponibilité et les différentes connaissances qu'ils ont su m'apporter.

Je tiens à remercier le Pr Hubert Hondermarck et le Dr Fabrice Gouilleux pour avoir accepté de participer à ce jury en qualité de rapporteurs, ainsi que pour toutes leurs remarques qui ont contribué à améliorer la qualité de ce manuscrit.

Je suis très sensible à la présence dans ce jury du Dr Philippe Juin, qui me fait l'honneur de juger ce travail.

Mes remerciements vont au Pr Olivier Coqueret, pour la confiance dont il m'a fait part en me proposant ce sujet de thèse. Ce sont tes cours de biologie cellulaire à l'université m'ont donné l'envie de réaliser une thèse, merci pour toutes les connaissances scientifiques que tu m'as transmises. Merci pour tous tes conseils, pour ta disponibilité et ton écoute. Merci aussi de m'avoir donné le goût de l'enseignement. Je te suis très reconnaissante de m'avoir laissé l'opportunité d'assurer les cours du poste d'ATER. Mener cette thèse sous ta direction fut pour moi un honneur et un grand plaisir.

Un grand merci également au Dr Catherine Guette. Grâce à toi, j'ai pu découvrir les bases des techniques de protéomique. Merci d'avoir totalement encadré mon stage de Master 2, ce qui n'était pas initialement prévu. Tu m'as permis de faire mes premiers pas dans le monde de la recherche. Je pense que tu es aussi en grande partie responsable de mon envie de continuer à travailler dans la recherche.

Merci également au Dr Benjamin Barré. Ton retour au centre Paul Papin a donné une nouvelle dynamique au laboratoire. Je te remercie pour tous tes conseils, ton aide a été précieuse pour boucler ces deux papiers. C'est avec un grand plaisir que je te lègue ma paillasse et toutes mes solutions, même si je pense que tu t'es déjà servi...

Une thèse n'est pas une aventure solitaire. Aussi je tiens à exprimer ma gratitude à tous les membres du CPP, en commençant par ceux du « bureau des petits chinois ». Merci à Emilie, Hélène, Andreea, Sory, Chacha et mes deux compagnons d'écriture Sophie et Anthony. On ne pouvait pas mieux synchroniser notre départ. Merci pour toutes nos

discussions, votre bonne humeur. Andreea, j'ai apprécié travailler avec toi et Emilie depuis ton arrivée en maîtrise. Notre trio a été une aide précieuse dans la réalisation de cette thèse. Merci aussi aux petits nouveaux : Audrey, Damien, Jérôme, Aude-Hélène pour leur bonne humeur et leur gentillesse. Le bureau des thésards se libère pour vous. Bon courage pour la suite.

Je souhaite aussi remercier mon maître Jedi, le Dr Julia Cherier, qui m'a encadré au début de ma thèse. Merci pour tes nombreux conseils, ta disponibilité et ton écoute. Je remercie également les anciens thésards qui sont partis durant ma thèse, Arnaud et Agnès.

Un grand merci aux nouveaux membres de l'U892, Elisa et Laurence. Merci Zaza pour tous ces beaux profils de facs mais aussi pour ta bonne humeur.

Merci beaucoup à toute l'équipe de la pharmacologie, Marie-Claire, Catherine, Luc, Sabrina, Julie, Adélaïde, pour leur gentillesse et leur disponibilité. Je remercie également Alice de l'équipe « protéomics » pour ces bons moments passés ensemble. Bon courage pour la suite.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Sory, le statisticien, pour toutes nos discussions qui nous changeaient de la biologie. Merci de m'avoir fait découvrir les matchs de la CAN depuis ta magnifique chambre d'hôpital. Je pense que ton séjour en pneumo a changé beaucoup de choses pour moi. ☺

Je tiens à remercier la « team du vendredi soir », petit Dino, Dr Petit Gervais, Ernoux et Lau. J'ai apprécié les pâtes sur les marches de la cathédrale et le blue-lagoon ou le cointropolitan du Baroque. Sans oublier les chocolats Viennois et nos soirées ciné. Un bon moment de détente où il était souvent question de sciences quand même.

Merci à Marie-Laure de m'avoir accueillie à la fac pour m'initier à tes techniques. Merci pour les petites pauses après mes cours, ça faisait un bien fou. Merci aussi pour ces vacances chez notre ami « les copains de Brassens » ☺

Merci à Hélène, ma binôme. On a enfin réussi !! Que de souvenirs. Je te remercie énormément pour ton soutien et ta gentillesse. J'ai ce fut un plaisir de travailler avec toi. Bon courage pour la fin. Je garde quelques photos sympas de Montréal pour le jour de ta soutenance...

Un grand merci à Emilie. Voila 6 ans que l'on a fait connaissance. Que de souvenirs !! Merci pour ton soutien, pour tes encouragements et tes très bons conseils. C'était une grande chance d'avoir quelqu'un comme toi tout au long de ma thèse. Merci aussi d'avoir accepté d'être ma « guest Star » pendant le cours de toxicologie. Merci Melle Ernoult.

Je n'oublierai pas également de remercier tous mes amis qui ont rendu ces quatre années de travail plus sympathiques.

Merci à Erika, ma colloc de master 2. Je n'oublierai pas tes passages à l'appart avec des pizzas pendant les révisions. Mais, je préfère me rappeler de toutes ces soirées, WE, vacances en France ou à l'étranger qui nous ont permis de nous changer les idées. Maintenant que notre thèse est finie, on devrait penser à prendre des cours d'espagnol.

Merci également à toute la bande, Julien, Kevin, Manu, Vince, Boud, Etienne. Cela fait du bien de voir des non biologistes de temps en temps. Un merci spécial à mon fiston adoré. Tu sais déjà tout le bien que je pense de toi.

Je remercie également, Alex et Lucie, les boxeuses pour ces trois heures par semaine de bonne humeur et de défoulement. Maintenant je serais plus disponible pour les restos.

Merci à toutes les autres personnes qui ont de près ou de loin, même sans s'en rendre compte parfois, participé à faire de cette thèse un moment agréable, en me soutenant ou en étant juste là quand j'en ai eu besoin.

Enfin mes remerciements vont à ma famille pour leur soutien et ces bons moments passés ensemble, mais surtout merci d'être toujours restée unie même avec la distance qui nous sépare. Un grand merci aux organisateurs de tous ces anniversaires surprises. Si un post-doc se confirme au Canada, je vous attends tous là-bas. J'exprime ma reconnaissance aussi à mes grands-parents, j'aurais aimé que vous puissiez tous être là. Un merci à Mine pour m'avoir donné l'envie d'apprendre, ces mercredis de boulot ont fini par payer. Merci également à toute ma belle-famille, votre soutien et vos encouragements, m'ont été énormément utiles.

J'adresse pour finir un immense merci à mes parents qui m'ont toujours soutenus dans mes choix et qui ont tout mis en œuvre pour que je puisse mener à bien mes études. Merci pour tout ce que vous m'avez transmis, pour votre soutien, vos encouragements et votre confiance en moi, vous êtes un exemple pour moi, je vous en serai toujours reconnaissante. Un énorme merci à ma petite sœur et à Jérémy. Je sais que je peux toujours compter sur vous. Merci pour tout.

Un immense merci à Laurent qui est certainement la personne qui comprend le plus ce que j'ai vécu pendant ma thèse. Je te remercie énormément d'avoir été là même dans les moments difficiles, de m'avoir soutenue et de m'avoir encouragée (alors que les choses sont encore moins faciles pour toi). Je sais que je peux compter sur toi et je te dois beaucoup.

A la mémoire de ma grand-mère,

*« Faire une Thèse signifie souvent
mettre ses proches de côté quelques temps.*

Aujourd'hui ce temps n'as pas de prix.

Pour que cela n'est pas été vain, je te dédie ce travail.»

Table des Matières

INDEX DES FIGURES	p1
LISTE DES ABREVIATIONS	p3
CONTEXTE SCIENTIFIQUE	p6
INTRODUCTION	p8
PARTIE I : Les cancers colorectaux	p9
A)	E
pidémiologie	p9
B)	T
traitements.....	p10
C)	L
les différentes formes de cancers colorectaux	p10
D)	L
les différents stades de développement du cancer colorectal.....	p11
PARTIE II : L'instabilité génomique (MSI et CIN) et le point de contrôle du fuseau mitotique	p13
A)	L
l'instabilité génomique comme moteur de la tumorigénèse	p14
1.	L
l'instabilité microsatellite.....	p15
2.	L
l'instabilité chromosomique.....	p16
B)	L
le point de contrôle du fuseau mitotique.....	p17
C)	L
les kinases Aurora A	p20
1.	L
la localisation	p20

2.	F
fonctions de la kinase	p20
3.	R
régulation.....	p21
4.	I
implication d'Aurora A dans le processus tumoral.....	p23

PARTIE III : Les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes..... p26

A)	L
Les gènes suppresseurs de tumeurs	p26

1.	L
la découverte des gènes suppresseurs de tumeurs.....	p26
2.	L
le gène suppresseur de tumeur : APC	p27
3.	L
l'exemple de PTEN.....	p29
4.	L
la famille des gènes suppresseurs de tumeurs INK4/ARF	p31
5.	L
le gène suppresseur de tumeur : p53	p31

B)	L
Les oncogènes	p36

1.	L
la voie de signalisation de Wnt	p36
2.	L
l'oncogène myc	p36
3.	L
le facteur de transcription STAT3.....	p41

PARTIE IV: Traitement anti-tumoral, les inhibiteurs de topoisomérase..... p54

A)	L
Les topoisomérases de type I	p54

B)	L
Les inhibiteurs de topoisomérase de type I	p56

C)	L
es dommages de l'ADN en réponse à l'irinotécan	p57
1.	L
es dommages de l'ADN lors de la réplication	p57
2.	A
ctivation de p53 suite à l'inhibition des topoisomérasés de type	
I	p60
PROJET DE THESE	p62
RESULTATS	p64
PARTIE I : La kinase cdk5 régule le facteur de transcription STAT3 pour réduire les dommages de l'ADN induits par l'inhibiteur de topoisomérase I, le Sn38.....	p65
PARTIE II : La voie Myc/Max/Miz-1 régule l'expression de la kinase Aurora A suite à l'inhibition des topoisomérasés de type I.....	p82
PARTIE III : Etude des partenaires de STAT3 suite aux dommages de l'ADN induits par l'inhibition des topoisomérasés de type I.....	p98
DISCUSSION et CONCLUSION	p120
BIBLIOGRAPHIE	p136

Table des illustrations

Figure 1 Schéma de la classification TNM qui détermine des stades d'avancement du développement tumoral	p12
Figure 2 Modèle de la tumorigénèse colorectale.....	p14
Figure 3 L'instabilité microsatellite et chromosomique dans les cancers colorectaux	p15
Figure 4 Activation du point de contrôle du fuseau mitotique	p18
Figure 5 Voie de signalisation et fonctions d'Aurora A.....	p22
Figure 6 Aurora A et la tumorigénèse	p23
Figure 7 L'hypothèse de Knudson et le gène du rétinoblastome	p27
Figure 8 Mutation du gène suppresseur de tumeur APC et développement tumoral.....	p29
Figure 9 Voie de signalisation PTEN/Akt/wnt.....	p30
Figure 10 Schéma simplifié de la voie de signalisation de p53	p34
Figure 11 Régulation du cycle cellulaire par le facteur de transcription myc.....	p37
Figure 12 Représentation schématique des différents complexes régulant l'activité transcriptionnelle de myc	p38
Figure 13 Structure des protéines STAT3	p42
Figure 14 Voie de signalisation du facteur de transcription STAT3.....	p43
Figure 15 Représentation de l'activité transcriptionnelle de STAT3	p52
Figure 16 Les topoisomérases de type I	p55
Figure 17 Métabolisme de l'irinotécan.....	p56
Figure 18 Activation de la réparation des dommages de l'ADN	p59
Figure 19 STAT3 est phosphorylé sur son résidu 727 et non sur le résidu tyrosine 705 après l'inhibition des topoisomérases.....	p66
Figure 20 La kinase cdk5 est activée suite aux dommages de l'ADN induits par le Sn38. p68	p68
Figure 21 Cdk5 interagit avec STAT3 pour induire la phosphorylation de la serine 727... p69	p69
Figure 22 Cdk5 est impliquée dans la perte de l'expression de la cycline D1 et c-myc et dans l'induction de Eme1	p71
Figure 23 La voie cdk5/STAT3 réduit les dommages de l'ADN.....	p71
Figure 24 STAT3 est recrutée sur le promoteur d'Eme1 quand elle est phosphorylée sur la serine 727	p73
Figure 25 Régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription STAT3 suite aux dommages de l'ADN induits par l'inhibition des topoisomérases de type I.....	p73
Figure 26 l'inhibition prolongée des topoisomérases entraîne une perte de l'induction de cdk5 et de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 ainsi que l'apoptose des cellules... ..	p75
Figure 27 La phosphorylation de STAT3 sur la sérine est nécessaire à l'induction de Eme1	p76
Figure 28 L'oxaliplatine entraîne une induction de la kinase cdk5, de la phosphorylation de STAT3 ainsi qu'une perte du recrutement de STAT3 sur le promoteur de la cycline D1	p77
Figure 29 L'induction de Ras entraîne la perte de l'expression de cdk5	p78
Figure 30 Ras entraîne une perte de la formation du complexe STAT3/cdk5 et de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727.....	p79
Figure 31 L'induction de ras entraîne une inhibition de la perte de la cycline D1 après inhibition des topoisomérases	p80
Figure 32 Régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription STAT3 suite aux dommages de l'ADN induits par l'inhibition des topoisomérases de type I.....	p81

Figure 33 L'inhibition des topoisomérases induit une perte de l'expression d'Aurora A ..	p84
Figure 34 L'inhibition des topoisomérases entraine une perte de la transcription d'Aurora.....	p85
Figure 35 STAT3 n'est pas recrutée sur le promoteur d'Aurora A suite à l'inhibition des topoisomérases	p86
Figure 36 Myc et Max sont associées sur le promoteur d'Aurora A en phase G2.....	p88
Figure 37 L'inhibition des topoisomérases induit une perte du recrutement de Myc et Max et la fixation de Mad sur le promoteur d'Aurora A	p89
Figure 38 L'inhibition des topoisomérases induit une augmentation du recrutement de Mad sur le promoteur d'Aurora A	p90
Figure 39 L'inhibition des topoisomérases induit une augmentation du recrutement de HP1 γ et la triméthylation de l'histone H3 sur le promoteur d'Aurora A.....	p91
Figure 40 Les dommages de l'ADN induits par l'inhibition des topoisomérases de type I entraînent un arrêt du cycle cellulaire	p93
Figure 41 Mesure du degré d'instabilité génétique au sein des tissus tumoraux	p94
Figure 42 Perte de l'expression de miz-1, mad et p21 et surexpression de myc et Aurora A au sein des tissus de tumeurs colorectales.....	p96
Figure 43 la surexpression d'Aurora A et de myc est corrélée à une instabilité génomique dans les tumeurs colorectales	p97
Figure 44 Représentation de la technique du double hybride	p99
Figure 45 Répartition dans les compartiments cellulaires des protéines identifiées par la technique du double hybride (par le logiciel GoMiner).....	p100
Figure 46 Répartition des protéines identifiées par la technique du double hybride, suivant leurs fonctions biologiques (par le logiciel GoMiner)	p100
Figure 47 Modèle d'induction de l'apoptose par DDB2	p101
Figure 48 STAT3 interagit avec DDB2.....	p102
Figure 49 STAT3 S727 pourrait interagir avec DDB2 ce qui conduirait à l'entrée en sénescence suite à l'inhibition des topoisomérases.....	p104
Figure 50 STAT3 S727 pourrait interagir avec DDB2 pour former une plateforme de réparation de l'ADN.....	p105
Figure 51 Répartition dans les compartiments cellulaires des protéines identifiées par la technique de spectrométrie de masse (par le logiciel GoMiner).....	p106
Figure 52 Répartition des protéines identifiées par la technique du double hybride, suivant leurs fonctions biologiques (par le logiciel GoMiner)	p107
Figure 53 ASPP2 interagit avec STAT3 après l'inhibition des topoisomérases.....	p109
Figure 54 ASPP2 entraine un arrêt en phase G2/M après l'inhibition des topoisomérases mais pas la réparation de l'ADN	p110
Figure 55 ASPP2 pourrait interagir avec ASPP2 pour modifier son affinité pour de nouveaux gènes cibles.....	p112
Figure 56 Hypothèse du rôle de la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine dans le contrôle du cycle cellulaire	p134
Figure 56b Hypothèse des phénomènes de résistance aux inhibiteurs de topoisomérases .	p135
Tableau I.....	p108
Annexe I	p113
Annexe II.....	p115

Liste des abréviations

5-FU : 5-fluoro-uracile	CE : cyclin E
ABL : abelson	CENP-E : Centromere protein E/A
ADN : Acide désoxyribonucléique	CHK1/2 : checkpoint kinase 1/2
AKT : v-akt thymoma (AKT8) viral oncogene homolog (mouse)	Chip : chromatin immunoprecipitation
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique	CIN : chromosomal instability
Apaf1 : Apoptosis protease-activating factor 1	CK1 : casein kinase 1
APC : adenomatous polyposis coli	CPT : Camptothécine
APC/C : Anaphase promoting complex/cyclosome	CRM1 : chromosome region maintenance 1
AP1 : Activator protein 1	CSK : c-src tyrosine kinase
ARF : alternate reading frame	c-SRC : v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
ARN : Acide ribonucléique	CtBP :
ARNm : ARN messenger	CTD : carboxyl terminal domain
ASPP : Apoptosis-stimulating protein of p53	DCC : Deleted in Colorectal Cancer
ATCC : American Type Culture Collection	DDB2 : DNA damage-binding protein 2
ATP : adenosine triphosphate	DISC : Death inducing signaling complex
ATM : Ataxia-telangiectasia mutated gene	DMBA : N,N-diméthylbenzilamine
ATR : Ataxia telangiectasia- and RAD3-related gene	DNAPK : DNA activated protein kinase
ATRIP : ATR-interacting protein	DNMT1 : DNA methyltransferase 1
Bax : Bcl-associated X protein	DRAM : damage-regulated autophagy modulator
Bcl-2 : B-cell lymphoma gene 2	E-box : Enhancer box
Bcl-XL : B-cell lymphoma gene XL	EGF : epidermal growth factor
BH3 : Bcl-2 homologous domain 3	EGFR : EGR receptor
bHLH : basic helix loop helix	eIF4E : eukaryotic translation initiation factor 4E
Bid : BH3 interacting domain death agonist	Eme1 : essential meiotic endonuclease 1 yeast homolog 1
BLM : Bloom syndrome gene	EMT : epithelial mesenchymal transition
BRCA : Breast cancer early onset gene	ERCC1 : excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group1
BRG1 : BRM-associated factor	ERK : Extracellular signal related kinase
BRM : Brahma	E1A : Early region 1A
BTG2 : B-cell translocation gene 2	E2F : E2 promoter binding factor
Bub : budding uninhibited by benzimidazoles 1 yeast homolog gene	GADD45 : growth arrest and DNA-damageinducible
CBP : CREB binding protein	GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
CCR ou CRC : cancer colorectaux	GMCF : granulocyte macrophage colony stimulating factor
Cdk : cyclin dependent kinase	GTPase : Guanosine triphosphatase
CD : cyclin D	GSK3β : Glycogen synthase kinase 3β
cdc : cell division cycle	

HAT : histone acétyltransférase
HDAC : histone déacétylase
Hdm 2 : Human double minute 2
HGF : Hepatocyte nuclear factor
HNPCC : hérédité non polyposis colorectal cancer
hTERT : human telomerase reverse transcriptase
IAP : Inhibitor of apoptosis protein
I-CAM : intracellular adhesion molecule-1
Id2 : inhibitor of differentiation 2
IFN : interféron
IL : Interleukin
INCENP : Inner Centromere Protein
INK4 : Inhibitory cyclin associated kinase
IPTG : Isopropyl-1-thio-b Dgalactopyranoside
JAK : janus kinase
JNK : Jun amino-terminal kinase
kDa : kilo dalton
LEF : leukemia enhancer factor
LIF : Leukemia inhibitory protein
LOH : loss of heterozygosity
LPS : Lipopolysaccharide
LRP : lipoprotein related protein
Mad2 : mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)
MAPK : Mitogen activated protein kinase
Mcl1 : myeloid cell leukemia sequence 1
Mdc1 : mediator of DNA damage checkpoint 1
Mdm 2 : mouse double minute 2
NFkB : nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
MIN : microsatellite instability
Miz1 : Msx-interacting-zinc finger protein 1
MEF : myocyte enhancer factor
MEK : Map-erk kinase
MLH1 : mutL homolog 1
MMP : metalloproteinase
MMR : Mismatch repair
MPS1 : Monopolar spindles 1
MRN : Mre11 Rad50 NBS1 complex
Mre11 : meiotic recombination 11 yeast homolog
MSH2 : mutS homolog 2
MSI : microsatellite instability
mSin3 : mammalian Sin3 yeast homolog

Mus81 : p6ethyl methansulfonate, UV sensitive 81
 Endonuclease
NaSal : sodium salicylate
NBS1 : Nijmegen breakage syndrome gene
NCOA1 : nuclear coactivator 1
NER : nucleotide excision repair
NES : Nuclear export sequence
NGF : *Nerve Growth Factor*
NIMA : Never in mitosis A
NLS : Nuclear localisation sequence
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NSCLC : Non small cell lung cancer
OH-U : Hydroxyurée A
PAF : polyposes adenomateuses familiales
PARP : poly(ADP-ribosyl)transferase
PCAF : p300/CBP associated factor
PDGF : platelet-derived growth factor
PIAS3 : protein inhibitor of activated Stat3
PIG3 : p53 inducible gene 3
PIKE-A : Phosphatidylinositol-3-kinase enhancer A
PI3K : phosphatidyl inositol 3 kinase
PKC : protein kinase C
PLK : Polo-like kinase
PP1 : Protéine Phosphatase 1
PP2A : Protéine Phosphatase 2 A
PTEN : Phosphatase and tensin deleted on chromosome 10
PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis
p53BP1 : p53 binding protein 1
Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RANTES : regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
Rb : Retinoblastoma
RCP : Rab-coupling protein
RFC : Replication factor C
RHA : RNA helicase A
ROS : reactive oxygen species
RPA : replication protein A
RSC : Remodel the Structure of Chromatin Complex
RSV : Rous Sarcoma virus
RT-PCR : Retrotranscription Polymerase chain reaction
SAHF : senescence associated heterochromatin foci

SHP1/2 : Src homology region 2 [SH2]-
domain
phosphatase 1/2
SH2/3 : src homology 2/3
Skp2 : S phase kinase-associated proteins
2
SOCS : suppresor of cytokine signaling
SRC1A : steroïd receptor coactivator
SSBR : Single strand break repair
STAT : signal transducer and activator of
transcription
SUMO : small ubiquitin related modifier
SV 40 : Simian virus 40
SVF : Sérum de veau foetal
Swi/Snf : Switching/Sucrose non
fermenting
TCF : T cell factor
TERT : Telomerase reverse transcriptase
TFIID : Transcription factor complex H
for gene
class II
TGF α/β : Transforming growth factor α/β
Thr : Thréonine
TIGAR : TP53-induced glycolysis and
apoptosis
regulator
TIP60 : TAT-interacting proteins 60
TNF : Tumor necrosis factor
TopBP1 : Topoisomerase binding protein
1
TOPO I/II : topoisomerase I/II
TPX2 : Target Protein for *Xenopus*
kinesin-like protein 2
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing
ligand
TRRAP : transformation/transcription
domain-associated protein
Ub : Ubiquitine
UICC : Union Internationale Contre le
Cancer
UV : ultra violet
VEGF : vascular endothelial growth factor
Wnt : Wingless
XPC : xeroderma pigmentosum,
complementation
group C
XRCC : X-ray repair complementing
defective
repair in Chinese hamster cells

β TrCP : β -transducin repeat-containing
protein

Contexte Scientifique

Le cancer est une pathologie caractérisée par la prolifération exacerbée d'un groupe de cellules au sein d'un tissu normal de l'organisme. Quelques cellules acquièrent une capacité à se multiplier de façon illimitée et anarchique ce qui va aboutir à la formation d'une tumeur. Il existe deux types de tumeurs : les tumeurs bénignes possèdent un contour bien déterminé, les cellules qui la composent ont une croissance lente et des caractéristiques proches de celles des cellules normales. Le plus souvent elles restent confinées dans leur tissu d'origine, ce qui ne donne pas lieu à des métastases. Les tumeurs malignes ont quant à elles un contour mal défini, les cellules qui la composent possèdent de nombreuses anomalies génotypiques et phénotypiques. Elles ont tendance à infiltrer les tissus voisins ce qui se traduit souvent par la formation de métastases à distance du tissu d'origine. Par l'utilisation de modèles cellulaires, la dérégulation du cycle cellulaire ainsi que des systèmes de contrôles du cycle ont pu être étudiés lors de l'oncogenèse.

Dans une première partie, je présenterai les cancers colorectaux et les thérapeutiques utilisées pour lutter contre le développement tumoral. Dans une deuxième partie, nous nous intéresserons au processus de tumorigénèse et notamment à l'implication des gènes suppresseurs de tumeur comme p53 et des oncogènes comme c-Myc. Nous nous attarderons sur la protéine STAT3, un facteur de transcription activé de façon constitutive dans les tumeurs. Enfin dans une troisième partie, nous aborderons les dommages de l'ADN occasionnés par l'irinotécan et les mécanismes de réparation mis en jeu par les cellules tumorales.

Introduction

PARTIE I : LES CANCERS COLORECTAUX (CCR)

A) Epidémiologie

Le cancer colorectal (CCR) est le cancer le plus répandu en France, tout sexe confondu avec 36500 nouveaux cas par an et 17000 décès (Hill and Doyon, 2006). En 20 ans l'incidence de ce cancer a augmenté d'environ 40% ce qui s'explique notamment par la mise en place de dépistage dans les populations à risque. Si le cancer est dépisté à temps, un traitement par chimiothérapie associé à de la chirurgie aboutit le plus souvent à la guérison. Au stade de métastases, il est souvent trop tard et seulement quelques patients pourront être opérés.

Près de 80% des CCRs sont de forme sporadique, le principal facteur de risque reste l'âge, puisqu'à partir de 50 ans le risque de développer des polypes augmente. Des prédispositions génétiques (environ 20% des CCRs sont des formes familiales) peuvent elles aussi favoriser l'apparition de polypes de manière prématurée. Dans 2 à 6%, ce sont des cancers de type polyposes adénomateuses familiales (PAF) qui entraînent la formation de centaines de polypes dans le colon ou des cancers colorectaux héréditaires sans polypose (syndrome HNPCC pour héréditary non polyposis colorectal cancer ou syndrome de Lynch). Dans ce syndrome les gènes mutés appartiennent à une famille de gènes impliqués dans le système de réparation de mésappariement de l'ADN. Ce sont des formes rares mais bien définies. Des études suggèrent que les sujets ayant un ou plusieurs parents du premier degré atteints d'un cancer colorectal ont un risque d'être atteint de ce cancer multiplié par deux par rapport à la population générale. Enfin des maladies inflammatoires du colon comme la maladie de Crohn ou la rectocolite-ulcéro hémorragique peuvent créer un terrain favorable à l'apparition de cancers colorectaux.

L'incidence globale croissante des CCRs peut être expliquée par l'environnement actuel et plus particulièrement la sédentarité et le régime alimentaire qui favorisent l'apparition de CCRs. Des études ont permis de montrer que l'incidence des CCRs était plus élevée dans les pays industrialisés comme le nord des États-Unis, en Europe et aussi en Australie.

B) Traitements

Seule une exérèse totale de la tumeur et des ganglions voisins entraîne une rémission totale du cancer. Cependant, dans la majorité des cas, la maladie est dépistée tardivement et le cancer est plus étendu voir métastasé. Il convient alors d'utiliser la chimiothérapie en plus de la chirurgie ou de la radiothérapie pour les cancers du rectum.

Cette chimiothérapie peut avoir lieu avant la chirurgie pour réduire la masse tumorale on dit alors qu'elle est néo-adjuvante. Ou bien, elle peut être administrée après la chirurgie, de façon adjuvante, lors d'un cancer plus avancé qui peut avoir métastasé. Le traitement de référence des cancers colorectaux est le 5 Fluoro-Uracile (5FU). Cet inhibiteur de la thymidylate synthase qui est une enzyme participant à la synthèse du nucléotide thymidine, est généralement administré avec d'autres molécules chimiques, comme l'acide folinique ou l'oxaliplatine. Le taux de réponse au 5FU varie de 10 à 30% (Shah and Schwartz, 2001). Une autre molécule est couramment administrée aux patients, il s'agit de l'irinotécan. C'est un dérivé des camptothécines principalement utilisé dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques. Cet inhibiteur des topoisomérases va conduire à la formation de cassures de l'ADN qui auront pour conséquence l'arrêt de la prolifération des cellules.

C) Les différentes formes de cancers colorectaux

Le colon et le rectum contiennent plusieurs types cellulaires qui peuvent être à l'origine de la formation d'un cancer spécifique. Dans la majorité des cas, les cancers colorectaux se forment au niveau des glandes de Lieberkühn qui tapissent l'intérieur de la paroi du côlon et du rectum. Il existe d'autres types de tumeurs au niveau du colon mais qui sont beaucoup plus rares comme les tumeurs carcinoïdes, les sarcomes ou les lymphomes. Enfin, les cancers colorectaux peuvent résulter de métastases qui vont induire la formation d'une tumeur dite secondaire.

1. Les adénocarcinomes

Plus de 90% des CCRs sont des adénocarcinomes. Il existe différentes sortes d'adénocarcinomes mais dans 95% des cas il s'agit d'adénocarcinomes lieberkühniens. Nos modèles d'étude seront donc des lignées cellulaires d'adénocarcinomes de cancers colorectaux, la forme la plus répandue de CCRs. Les adénocarcinomes dérivent d'adénomes qui sont des tumeurs bénignes, les cellules tumorales tout d'abord bien localisées dans la

muqueuse du colon et peu nombreuses vont se développer avant d'envahir plus profondément la paroi du colon ou du rectum donnant à la tumeur son aspect malin.

2. Les cancers colorectaux issus de métastases

Les cancers colorectaux peuvent provenir de cellules métastatiques issues d'un cancer situé dans un autre organe, on parle alors de tumeur secondaire. Les tumeurs colorectales secondaires proviennent le plus souvent de tumeurs primitives issues de la prostate, de l'ovaire, du sein ou de l'estomac.

D) Les différents stades de développement du cancer colorectal

A partir des données de la classification TNM qui définit la propagation de la tumeur, les cancers du côlon sont classés en 4 stades par l'UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) suivant l'état d'évolution du cancer. Chaque lettre de la classification symbolise le degré d'envahissement, le T pour le site de la tumeur primitive, le N pour l'invasion des ganglions voisins (N pour node en anglais) et le M lors de la formation éventuelle de métastases (Figure 1). Au départ, la tumeur est localisée dans le tissu intra-muqueux, ce stade est appelé TIS. Les stades TNM suivants sont définis suivant la taille et la dissémination de la tumeur. Les chances de guérison varient considérablement du stade I au stade IV. Le stade I définissant une tumeur de toute petite taille qui a pénétré la muqueuse jusque dans la sous-muqueuse. Au stade suivant, ces mêmes cellules tumorales ont commencé à envahir la paroi musculaire. Au cours du troisième stade, les ganglions lymphatiques sont atteints par les cellules tumorales qui envahissent la sous séreuse. Le dernier stade est le plus critique, il définit les tumeurs colorectales qui se sont étendues aux organes voisins et qui ont pu métastaser. La prise en charge du patient et la stratégie thérapeutique mises en œuvre sont donc adaptées en fonction de cette classification.

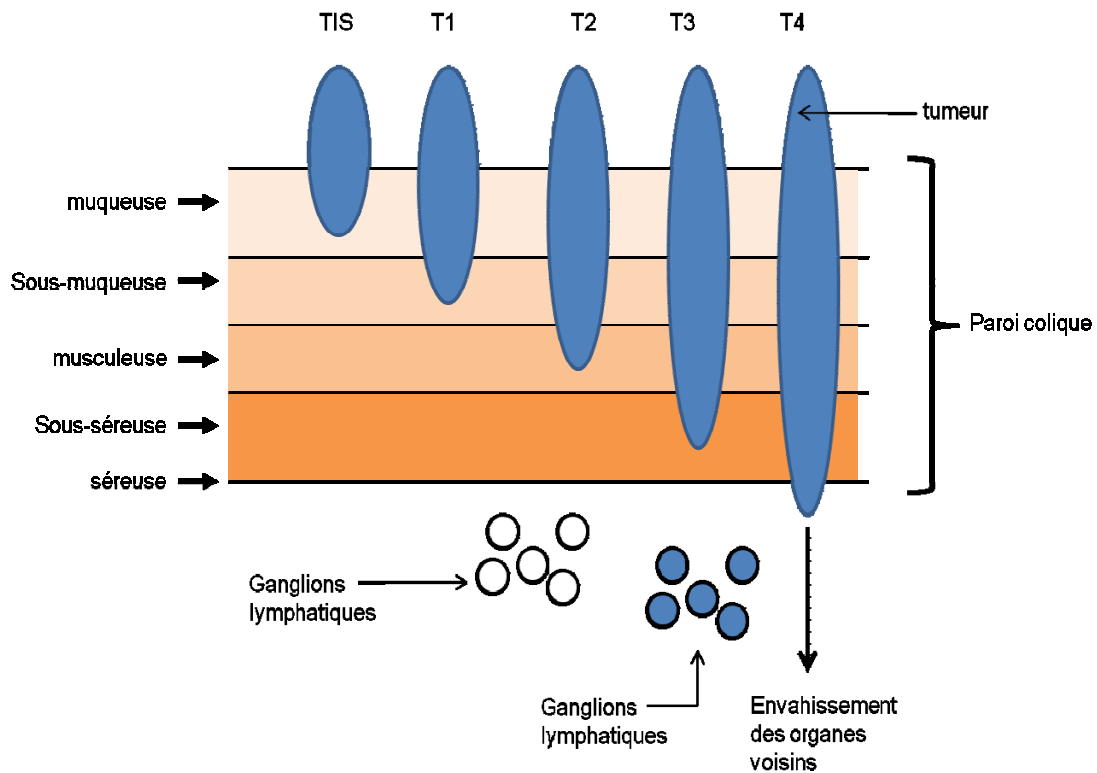


Figure 1 | Schéma de la classification TNM qui détermine des stades d'avancement du développement tumoral

La paroi colique est composée de plusieurs couches tissulaires qui peuvent être envahies par les cellules tumorales.

Le stade TIS définit une tumeur localisée dans la muqueuse colique. Le stade T1 est attribué à la tumeur lorsque les cellules ont envahi la sous-muqueuse. En touchant le tissu musculaire, la tumeur atteint le grade T2 qui sera suivi du T3 lorsque les cellules auront atteint la sous-séreuse. À partir de ce stade comme dans le suivant où l'envahissement tumoral dépasse la séreuse, les ganglions lymphatiques peuvent être touchés.

PARTIE II : L'INSTABILITE GENOMIQUE (MSI et CIN) ET LE POINT DE CONTROLE MITOTIQUE

La tumorigénèse est un processus multi-étapes dont la toute première est l'hyperprolifération de l'épithélium du colon. Des cellules anormales et immatures s'accumulent dans et au-dessus de la muqueuse, ce qui conduit à la formation d'un polype adénomateux. On parle alors de lésions précancéreuses. Au niveau de ces adénomes, de nombreuses modifications vont apparaître de manière progressive et croissante. Ces modifications sont appelées dysplasies. Elles comprennent des anomalies nucléaires anisocaryose et des anomalies de stratification. Dans l'analyse des tissus, il est remarqué que de nombreuses cellules sont en mitose, preuve d'une multiplication cellulaire intense qui donne lieu également à des anomalies cytoplasmiques avec des pertes de la mucosécrétion ou bien des anomalies architecturales. Les dysplasies sont classées en fonction de leur importance, il existe donc des dysplasies de bas ou haut grade.

Dans un second temps, des cellules vont proliférer et envahir le tissu environnant et métastaser malgré les différents contrôles mis en place par la cellule comme l'entrée en apoptose ou en sénescence. Le processus de tumorigénèse est issu de l'accumulation d'anomalies génétiques séquentielles. D'après une estimation de Loeb L., il faudrait au minimum 3 événements pour initier la naissance d'une tumeur (Loeb, 1991). Les gènes les plus touchés sont le plus souvent ceux qui interviennent dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore les gènes impliqués dans la migration cellulaire. On distingue 2 catégories de gènes ciblés par des altérations génétiques dans les cancers : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes dérivent de gènes présents naturellement dans la cellule (les proto-oncogènes) et activent le cycle cellulaire. Leur dérégulation et leur activation excessive et inappropriée ont favorisé le développement de la tumeur par une activation anormale de la prolifération comme par exemple l'oncogène K-ras ou l'oncogène majeur dans le cancer colorectal, la β -caténine. A l'inverse, les gènes suppresseurs de tumeur, chargés d'inhiber le cycle cellulaire, voient leurs expressions ou leurs fonctions perdues ou altérées suite à des mutations ou à des dérégulations protéiques ou encore à des disfonctionnements dans le contrôle de leur activité. Ces gènes sont nécessaires au fonctionnement normal d'une cellule notamment pour le maintien de l'intégrité du génome. Les gènes suppresseurs de tumeurs dont les pertes de fonctions sont le plus souvent impliquées dans le développement de cancers colorectaux sont TP53 (gène de la protéine p53) (Iacopetta, 2003), DCC (Deleted in Colorectal Cancer), PTEN (Phosphatase and tensin

deleted on chromosome 10) (Bowen et al., 2009), Arf/INK4 (alternate reading frame/ Inhibitory cyclin associated kinase), ou bien APC (adenomatous polyposis coli) (Figure 2).

Des anomalies chromosomiques sont détectables au sein des cellules tumorales. Des segments de chromosomes peuvent ainsi être perdus. Dans les CCRs, il a été observé que fréquemment le bras long du chromosome 5 contenant le gène d'APC était ainsi perdu. Il en va de même pour le chromosome 18 qui contient le gène de DCC. Le gène de p53 peut être inactivé quand à lui par la perte du bras court du chromosome 17. Au niveau des gènes, il est aussi possible d'observer des anomalies de la séquence nucléotidique, comme c'est le cas pour l'oncogène RASV12. Ces modifications peuvent entraîner soit des gains ou des pertes de fonction pour des protéines. Enfin, des modifications épigénétiques comme la méthylation des promoteurs peuvent entraîner le blocage de la transcription de gènes.

Dans les cancers du côlon, 2 types d'instabilité génomique peuvent s'ajouter à l'hyperméthylation des gènes et aboutir à des anomalies chromosomiques : l'instabilité chromosomique (CIN) et l'instabilité des microsatellites (MSI) (Worthley et al., 2007).

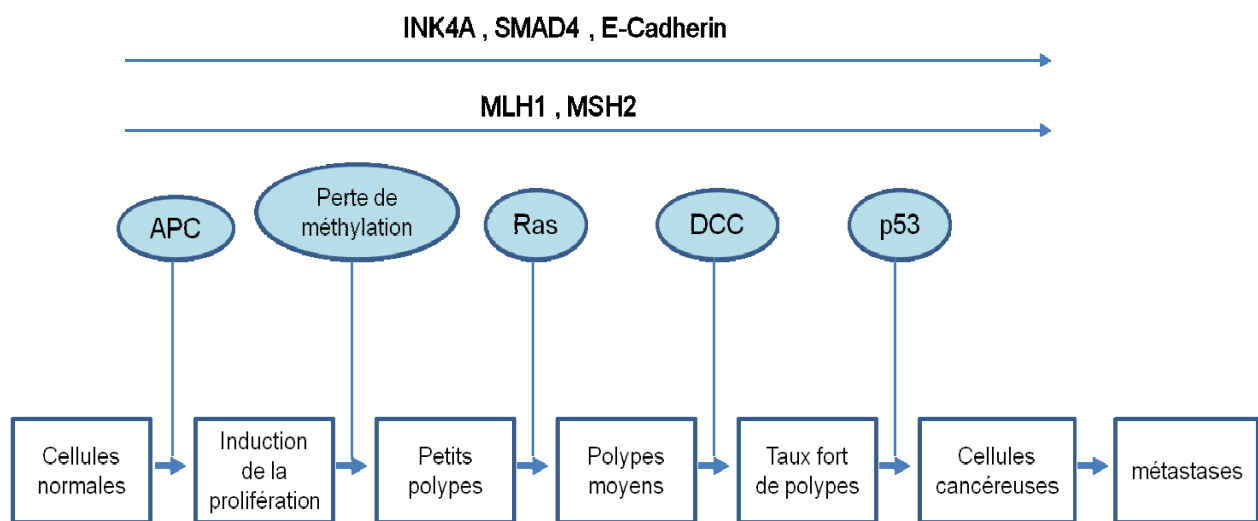


Figure 2 | Modèle de la tumorigénèse colorectale

Ce modèle est encore appelé séquence adénome-carcinome. A partir de l'épithélium vont se former des cryptes aberrantes. Certaines évolueront vers des adénomes puis des carcinomes. Le passage d'un stade à un autre est associé à des modifications génétiques. Les mutations d'APC et de Ras étant impliquées dans l'initiation de la tumorigénèse. (D'après Fearon et Vogelstein, 1990)

A) L'instabilité génomique comme moteur de la tumorigénèse

L'acquisition de l'instabilité génomique est un élément clef dans le développement tumoral. La majorité des cancers colorectaux résulte d'une instabilité chromosomique qui se

caractérisé par un nombre anormal de chromosomes (aneuploïdie) et la perte d'hétérozygotie (LOH). La perte d'hétérozygotie intervient lors de la mauvaise ségrégation des chromosomes, d'un défaut de la stabilité des télomères ou lors d'un dysfonctionnement de la cellule dans la réponse aux dommages de l'ADN (Figure 3).

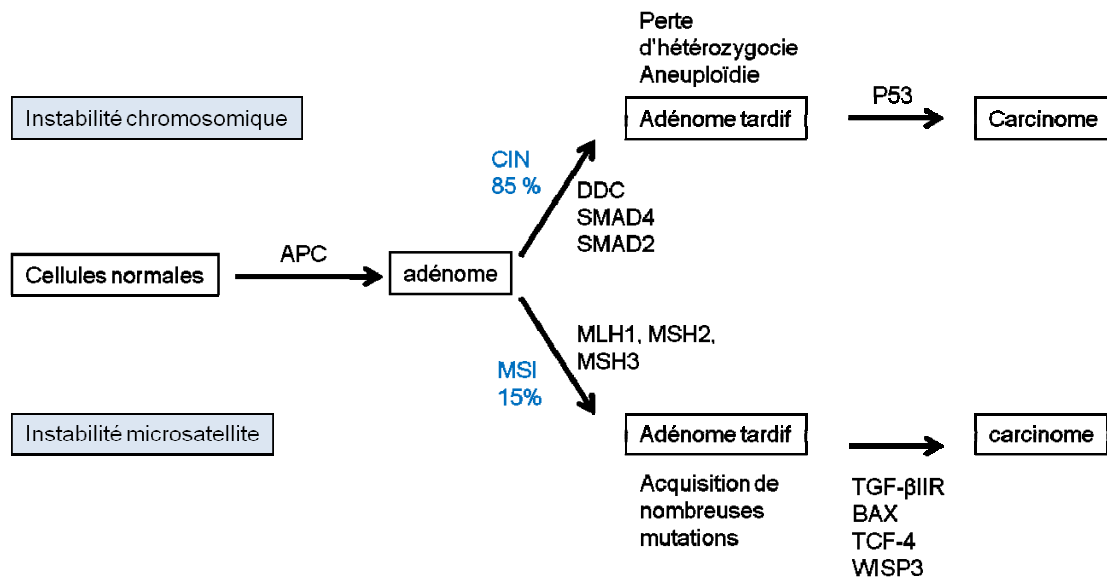


Figure 3 | L'instabilité microsatellite et chromosomique dans les cancers colorectaux

2 types d'instabilités sont retrouvés dans les tumeurs colorectales, la CIN et la MSI. Ces instabilités favorisent le développement tumoral par l'induction de l'aneuploïdie ou en favorisant l'apparition de mutations au sein du génome.

1. L'instabilité microsatellite (MSI)

L'instabilité des microsatellites (MSI) est définie par un changement du nombre de séquences répétées dans l'ADN des cellules tumorales comparé à l'ADN des cellules saines. On retrouve notamment ces séquences au niveau des centromères et des télomères des chromosomes. L'instabilité microsatellite correspond à la perte de bases azotées au niveau de ces courtes séquences répétées et joue un rôle important dans le développement des cancers. L'instabilité des microsatellites a d'abord été décrite dans un cancer héréditaire du côlon, le syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC, où elle est présente dans 95 % des cas. Dans 15% des cancers colorectaux non héréditaires (ou sporadiques), une telle instabilité est aussi retrouvée (Boland et al., 1998). La présence de MSI associée à des critères cliniques (critères d'Amsterdam ou de Bethesda) oriente donc vers le syndrome de Lynch qui sera confirmé par la caractérisation des mutations dans les gènes MMR (mismatch repair) impliqués dans cette pathologie. La présence de MSI dans les cancers sporadiques est liée à des modifications

épigénétiques du promoteur du gène codant pour hMLH1, gène de la famille MMR. Au sein de ces cancers colorectaux, les tumeurs possédant ce type d'instabilité sont décrites comme des tumeurs microsatellite instables (MIN).

Le MMR (Mismatch repair) contrôle la présence de mésappariements au cours de la réplication. Dans les cancers colorectaux, l'inhibition des protéines de réparation de l'ADN MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 ou PMS2 est observée (Li, 2008). Ces gènes sont inactivés par introduction de mutations dans la séquence codante ou par une hyperméthylation de leur promoteur (Asada et al., 2008). La seule perte de ces protéines impliquées dans la réparation de l'ADN n'engendre pas la transformation des cellules, d'autres mutations sont nécessaires pour entraîner l'initiation de tumeurs. Néanmoins, les mutations du système de réparation MMR favorisent l'accumulation d'autres mutations à un taux extrêmement rapide au cours des réplifications et peuvent aboutir à la cancérisation (Strate and Syngal, 2005).

2. L'instabilité chromosomique : La CIN

Cette instabilité conduit à des pertes et des gains de bras chromosomiques et à des réarrangements chromosomiques non équilibrés. Plus de 100 gènes ont pu être identifiés comme provoquant de l'instabilité chromosomique dans la levure, *Saccharomyces cerevisiae* et la plupart de ces gènes possèdent des homologues chez l'homme. Cependant, seulement une partie d'entre eux a été impliquée dans le développement des tumeurs chez l'homme (Pino and Chung).

- Défaut de la ségrégation des chromosomes

Cette instabilité est liée à un mauvais fonctionnement du point de contrôle du fuseau mitotique qui assure la bonne répartition du matériel génétique entre les deux cellules filles. Les cellules possédant une défaillance de ce point de contrôle ont un caryotype très instable et il en résulte une aneuploïdie. Les protéines MAD (mitotic arrest–deficient) et BUB (budding uninhibited by benzimidazoles) interviennent dans l'activation de ce point de contrôle en vérifiant la séparation des chromatides. Nous détaillerons dans un autre chapitre l'activation de ce point de contrôle du fuseau mitotique. Un dysfonctionnement de cette voie aboutit à une ségrégation anormale des chromosomes.

La CIN peut être causée aussi par un nombre anormal de centrosomes et un défaut dans leur fonction. En effet la séparation des chromosomes est organisée autour d'une bonne organisation du fuseau mitotique. La visualisation de milliers de divisions cellulaires dans des lignées cancéreuses notamment du cancer du colon, a montré qu'une augmentation du taux de centromères causait une mauvaise ségrégation des chromosomes, entraînant une CIN (Ganem et al., 2009). Ceci serait dû au rôle pathologique des protéines Aurora A et PLK (polo like kinase). En effet, le gène qui code pour Aurora est fréquemment amplifié et associé à des tumeurs colorectales à haut niveau de CIN (Ewart-Toland et al., 2003). Nous reviendrons sur le rôle d'Aurora A dans un chapitre suivant. Les kinases plk sont surexprimées dans les lignées cellulaires possédant une CIN (Dunican et al., 2002) et une expression élevée de plk1 a été observée dans plus de 73% des CCRs primaires et est corrélée avec un potentiel invasif plus important (Takahashi et al., 2003).

La CIN peut également être due à une dysfonction des télomères. Les télomères sont des complexes ADN-protéines qui consistent en une succession de séquences d'ADN répété (TTAGGG chez l'homme) qui protègent les chromosomes des phénomènes de fusion. Plusieurs équipes ont reporté un raccourcissement des télomères dans 77 à 90% des cancers du colon comparé à des tissus normaux. Par ailleurs, il a été observé une augmentation de l'activité de la télomérase dans les tumeurs colorectales (Engelhardt et al., 1997). Les chercheurs ont proposé alors que le raccourcissement des télomères dans les stades précoces de cancers puisse engendrer de l'instabilité et des fusions chromosomiques alors que l'augmentation de l'activité de la télomérase dans les stades plus tardifs engendrait ensuite l'immortalité des cellules, par la perte de la mise en place de la sénescence répllicative.

B) Le point de contrôle mitotique

Des défauts de l'existence du point de contrôle du fuseau sont à l'origine d'anomalies de la ségrégation et d'instabilité génétique de type CIN (Zhivotovsky and Kroemer, 2004). Différentes protéines vont contrôler ce point de contrôle permettant de prévenir les cellules d'une mauvaise séparation des chromatides sœurs (Figure 4) (Musacchio and Hardwick, 2002).

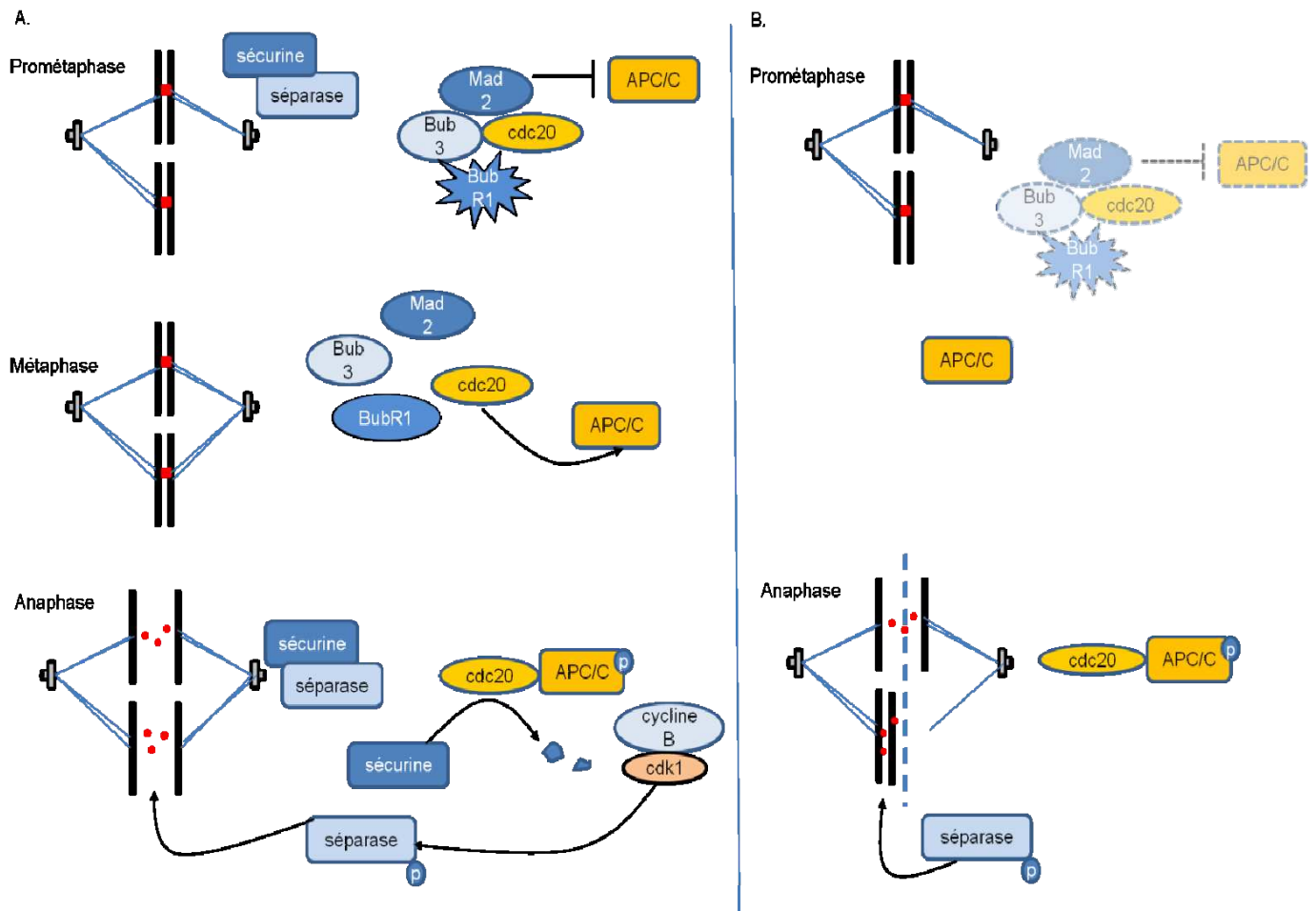


Figure 4 | Activation du pont de contrôle du fuseau mitotique

A : Dans les conditions normales, lors de la métaphase, la cohésine retient ensemble les deux chromatides sœurs. Seulement lorsque tous les chromosomes sont correctement attachés aux centrosomes par les microtubules, l'E3ligase APC/C libère la séparase de la sécurine. La séparase permet alors de dégrader la cohésine et libère les deux chromatides sœurs, aboutissant à leur séparation.

B : Déficience du point de contrôle du fuseau mitotique dans les cancers. Les mutations des protéines du point de contrôle du fuseau mitotique entraînent l'activation prématurée d'APC/C cdc20 s'accompagnant d'une mauvaise séparation des chromosomes lors de l'anaphase.

Après la réplication, pendant la métaphase, les chromatides sœurs sont liées entre elles par une protéine, la cohésine, au niveau des centromères, partie centrale du chromosome. La progression mitotique et la séparation des chromatides sœurs sont contrôlées par l'ubiquitine ligase E3 APC/C. Le complexe APC/C et cdc20 cible plus particulièrement la cycline B et la sécurine (Peters, 2002). La dégradation de la cycline B mène à l'inhibition de l'activité de cdk1 et initie la sortie de mitose. Au moment de la prometaphase, les chromosomes, par leur kinétochore, s'attachent au réseau de microtubules qui partent des centrosomes. Lors de l'anaphase, les chromatides sœurs vont être séparées, ceci par la dégradation de la cohésine par les séparases. Cette protéase n'est activée qu'au moment où le centromère de tous les

chromosomes est attaché par deux microtubules issus chacun d'un pôle cellulaire différent (attachement au niveau d'un complexe protéique appelé kinétochore). En absence de tensions suffisantes ou lorsque la liaison est anormale, la kinase Aurora B est chargée de déstabiliser chaque microtubule lié au kinétochore. Elle provoque le détachement des microtubules entre les centromères des 2 chromatides. Ceci génère des kinétochores libres qui vont être à l'origine, via l'inactivation du complexe ubiquitine E3ligase APC/C en la privant de son activateur cdc20, d'un signal inhibiteur du point de contrôle du fuseau mitotique. La protéine CENP-E se lie à son partenaire BubR1 (Ewart-Toland et al., 2003), entraînant l'activation de la kinase BubR1 qui permet alors le recrutement de Mad1 et Mad2 qui s'associent à cdc20 empêchant alors la dégradation par ubiquitination de la cycline B et de la sécurine (Sudakin et al., 2001). Le complexe cycline B/cdk1 restant actif, la mitose est arrêtée aboutissant à une inhibition de la séparation des chromosomes.

Ces mécanismes sont primordiaux pour la stabilité génomique à deux niveaux. Tout d'abord ils assurent qu'à chaque mitose, l'ensemble des chromosomes sera attaché aux deux pôles par les microtubules avant le début de l'anaphase. Ensuite ils permettent de stopper la mitose de cellules qui auraient mal répliqué leur ADN ou qui auraient des cassures au sein de leur ADN.

Des altérations des protéines directement impliquées dans le point de contrôle du fuseau mitotique sont à l'origine de l'instabilité chromosomique de type CIN. En effet, des altérations d'expression de protéines du point de contrôle du fuseau mitotique comme Mad2, BubR1, Bub1, Bub3, Mad1 et Mps1 ont été reportées dans plusieurs tumeurs et lignées cellulaires. Des mutations germinales des gènes tels que Bub1B sont retrouvées dans des cas de cancers familiaux caractérisés par la présence de cellules au caryotype profondément altéré et survenant chez l'enfant sous forme de rhabdomyosarcome et de leucémie (Hanks et al., 2004). Des études ont montré dans plusieurs modèles murins présentant des haploinsuffisances pour des protéines tel que BubR1 ou Bub3 qu'ils sont plus susceptibles aux cancers (Baker et al., 2006). L'haploinsuffisance correspond à la perte d'un allèle associé au fait que l'allèle non muté produit une protéine normale mais en quantité insuffisante pour assurer la fonction physiologique de la protéine.

La dérégulation du point de contrôle du fuseau mitotique a été impliquée dans l'apparition de cellules tumorales colorectales au caryotype très instable par une mauvaise séparation des chromosomes qui pourrait conduire à des instabilités chromosomiques, des aneuploïdies et finalement à un processus tumoral.

Lors de la progression vers la mitose, la mauvaise formation du fuseau mitotique peut aussi entraîner l'activation du point de contrôle mitotique. Les centrosomes se dupliquent pendant l'interphase en même temps que l'ADN et se séparent en mitose de manière identique aux chromosomes. La maturation des centrosomes fait intervenir les protéines de la famille des Plk1, Aurora (Dutertre et al., 2002) et Nek/NIMA. Ces kinases participent à la fois à la régulation du cycle du centrosome et à la mise en place du fuseau mitotique. La dérégulation de ces kinases entraîne des problèmes mitotiques et un phénotype CIN, nous nous intéresserons plus particulièrement à la kinase Aurora A sur laquelle porte une partie de mon travail. La dérégulation de l'activité de cette kinase entraîne la formation de multiples centrosomes et une perturbation de la séparation des chromatides dans la cellule ainsi que de l'instabilité chromosomique de nombre (Carter et al., 2006).

C) Les kinases Aurora A

1. Localisation

La localisation d'Aurora A dépend de la phase du cycle cellulaire dans laquelle est engagée la cellule. La kinase n'est observable que lorsque les centrosomes sont dupliqués. En dehors de son expression de la fin de la phase S jusqu'au début de la phase G1, la kinase n'est plus présente dans la cellule car elle est dégradée (Sugimoto et al., 2002). Un pic d'expression est observable durant la phase G2 où la kinase est colocalisée avec la γ -tubuline au centrosome (Gopalan et al., 1997) (Roghi et al., 1998). La kinase Aurora A permet d'activer la mitose en conditions normales, puis disparaît à la fin de ce processus. L'activité sérine/thréonine kinase suit le même profil d'activation (Kimura et al., 1997). En plus de son association avec les centrosomes, il est possible d'observer la présence d'Aurora A au niveau des microtubules émanant des centrosomes.

2. Fonction de la kinase

En 1994, dans les cancers du sein, il a été observé la présence d'un nombre important de copies de gène qui code pour la kinase Aurora A. Cette dernière fut ensuite retrouvée, en 1995, chez des mutants de la drosophile incapables d'induire une mitose correcte, par Glover et ses collaborateurs (Glover et al., 1995). La surexpression d'Aurora A a par la suite été montrée dans d'autres tumeurs, de colon, de l'ovaire, de prostate et de neuroblastome. La

surexpression de la kinase pourrait être régulée par plusieurs mécanismes différents : la suractivation transcriptionnelle, l'amplification génique, mais aussi l'inhibition de la protéolyse. Aurora A intervient dans la mise en place des pôles et du fuseau mitotique nécessaires à la séparation des chromosomes. L'activation de la kinase est un pré-requis à l'activation du complexe cycline B/cdk1 au niveau des centrosomes (Hirota et al., 2003). L'activation de cdk1 par Aurora A n'est pas directe et semble être médiée par la phosphorylation de cdc25B par Aurora A sur la sérine 353 au niveau des centrosomes (Dutertre et al., 2004). La phosphorylation de cdc25B entraîne par la suite la déphosphorylation de cdk1 et son activation (De Souza et al., 2000). Aurora A va aussi pouvoir réguler le cycle des centrosomes. En effet, la surexpression de la kinase dans des cellules humaines ou murines entraîne une amplification du nombre de centrosomes (Meraldi et al., 2002). Aurora A semble aussi impliquée dans la séparation des centrosomes, où la kinase pourrait collaborer avec Nek2 pour phosphoryler et dissocier C-Nap1 des centrosomes, et permettre ainsi leur séparation en début de mitose (Faragher and Fry, 2003).

3. Régulation de la kinase

Aurora A est une protéine qui est régulée durant les différentes phases du cycle cellulaire. Au niveau du promoteur d'Aurora A, il a été retrouvé deux éléments régulateurs principaux. Un de ces sites est un site activateur, le site Ets, le deuxième, le site CDE/CHR est un site inhibiteur (Cell cycle Dependent Element/ Cell cycle genes Homology Region) (Tanaka et al., 2002). Ces éléments inhibiteurs permettent la régulation de l'activité transcriptionnelle du gène pendant le cycle cellulaire. Le facteur de transcription E4TF1, un membre de la famille Ets, se lie au promoteur d'Aurora A et permet une activation du gène mais la transcription peut être inhibée grâce aux éléments CDE/CHR situés en aval du site Ets. L'activation spécifique d'Aurora A lors de la phase G2/M serait due à l'arrêt de cette inhibition (Tanaka et al., 2002).

En plus d'une régulation transcriptionnelle, l'activité de la kinase va être régulée au cours du cycle cellulaire grâce à des modifications post-traductionnelles (Figure 5). Trois sites de phosphorylations ont été identifiés chez l'homme : la sérine 51, la thréonine 288 et la sérine 342. Le site de phosphorylation de la sérine 51 chez l'homme possède un équivalent chez le xénope, la sérine 53 dont la phosphorylation empêche la dégradation de la protéine (Littlepage et al., 2002). Le résidu sérine 342 régulerait de façon indirecte la kinase en inhibant la liaison de PP1 à Aurora A ce qui protégerait l'enzyme de la déphosphorylation

notamment au niveau de la thréonine 288, site indispensable à l'activité kinase de la protéine (Katayama et al., 2001). Aurora A est régulée aussi par PP2A, une autre phosphatase, dont la liaison permettrait de déphosphoryler la kinase sur la sérine 51 et entraînerait sa prise en charge par le protéasome.

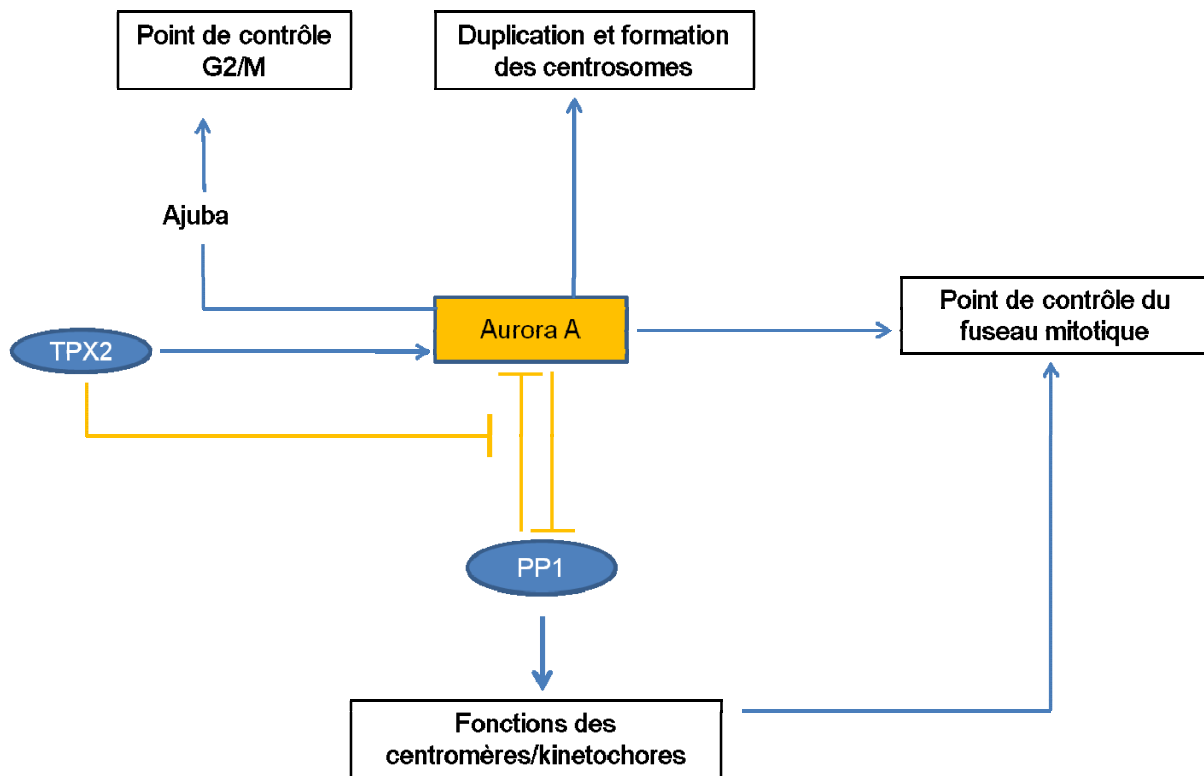


Figure 5 | Voie de signalisation et fonctions d'Aurora A (Andrews, 2005)

L'activité de la kinase Aurora A peut être régulée par le gène suppresseur de tumeur p53 qui peut se localiser au niveau des centrosomes et interagir spécifiquement avec la kinase pour inhiber son activité. Cette liaison supprimerait la capacité d'Aurora A à induire l'amplification des centrosomes et la transformation des cellules. En l'absence de p53, le nombre de centrosomes n'est pas contrôlé et les fuseaux mitotiques sont anormaux (Hofseth et al., 2004).

En conditions normales, la kinase Aurora A va pouvoir être activée par la protéine Ajuba qui intervient dans la maturation des centrosomes et qui interagit avec Aurora A en phase G2 du cycle cellulaire ce qui permet son autophosphorylation sur la thréonine 288 et son activation (Hirota et al., 2003). L'activation d'Aurora A par Ajuba constitue la première phase d'activation de la protéine, elle permet également l'activation du complexe cycline B/cdk1 au niveau des centrosomes. La protéine TPX2 (Target Protein for *Xenopus* kinesin-

like protein 2) est aussi une protéine indispensable à la localisation d'Aurora A au niveau du centrosome et elle stimule l'autophosphorylation d'Aurora A sur la thréonine 295 chez le xénope (équivalente à la thréonine 288 chez l'Homme). Cette phosphorylation entraîne la réorganisation de la boucle d'activation qui se traduit par l'internalisation du résidu 288, devenant ainsi moins accessible à PP1 (Bayliss et al., 2003) (Eyers et al., 2003).

4. Implication d'Aurora A dans le processus tumoral

Il a été montré que l'apparition de cellules avec plus de deux centrosomes entraînerait une mauvaise ségrégation des chromosomes, l'apparition de plusieurs fuseaux mitotiques et la mise en place d'un phénotype CIN (Figure 6).

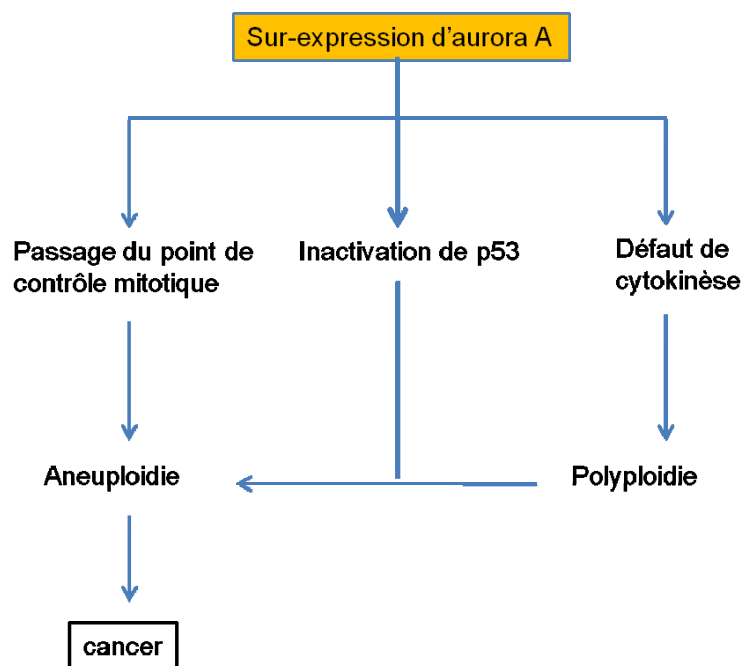


Figure 6 | Aurora A et la tumorigénèse

La surexpression d'Aurora A est impliquée dans de nombreux cancers. Les cellules possédant cette surexpression se divisent avec un matériel génétique inégal conduisant à l'aneuploïdie. D'un autre côté, la surexpression de la kinase aboutit à une cytokinèse défectueuse conduisant à de la polyploïdie. Les cellules ayant inactivées le suppresseur de tumeur, p53, sont incapables d'empêcher à nouveau la réplication de l'ADN, les cellules rentrent en mitose, ce qui conduit aussi à de l'aneuploïdie et au développement de cancers.

Une perte de l'expression d'Aurora A dans les cellules entraîne la formation d'un fuseau bipolaire non fonctionnel et un arrêt des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire. De plus les fuseaux sont anormaux, et une tétraploïdisation des cellules est observable (Du and Hannon, 2004). Les cellules sont tétraploïdes car elles sont arrêtées pendant la mitose en phase G2/M juste avant la cytokinèse mais cet arrêt est temporaire puisque les cellules retournent en phase G1 avec des noyaux anormaux et deux centrosomes non séparés.

La surexpression de la kinase entraîne également des modifications du nombre de centrosomes et la tétraploïdie. Dans les cellules HeLa, la surexpression d'une kinase non fonctionnelle entraîne l'apparition de cellules avec deux noyaux et plusieurs centrosomes (Meraldi et al., 2002). Lorsque la kinase Aurora A est active, elle phosphoryle p53 sur les sérines 215 et 315, induisant respectivement l'inhibition de son activité transcriptionnelle et sa déstabilisation par hdm2. p53 est alors prise en charge par le protéasome pour être dégradée (Katayama et al., 2004). Ainsi, dans les cellules où la protéine p53 est inhibée par Aurora A, le point de contrôle post-mitotique n'est plus fonctionnel, la tétraploïdie des cellules n'est donc pas détectée et les cellules continuent leur progression dans le cycle cellulaire, redupliquent leur ADN et leur centrosome, menant alors à l'aneuploïdie et à l'amplification des centrosomes (Meraldi et al., 2002) (Fujiwara et al., 2005).

La surexpression d'Aurora A dans les fibroblastes NIH3T3 induit la transformation des cellules et lorsque ces dernières sont introduites dans des souris nues, elles induisent la formation de tumeurs (Bischoff et al., 1998) (Littlepage et al., 2002). La surexpression d'Aurora A chez des souris transgéniques entraîne la formation de tumeurs mammaires après un long moment d'attente (Wang et al., 2006) et l'inactivation de p53 dans ces souris amplifie ce phénotype. Cette surexpression d'Aurora A entraîne de l'instabilité génomique caractérisée par une amplification du nombre de centrosomes, une tétraploïdisation et une ségrégation des chromatides sœur prématurée, étapes précoces du développement tumoral. La kinase Aurora A est décrite dans cette étude comme un oncogène qui induit la transformation cellulaire par l'intermédiaire de l'induction de l'instabilité génétique et par l'activation de voies oncogéniques comme celle d'Akt (Wang et al., 2006). La surexpression d'Aurora A dans ces modèles entraîne l'absence d'arrêt des cellules en phase G2/M du cycle.

La kinase Aurora A est donc un oncogène fortement impliqué dans le processus tumoral. La surexpression ou la dérégulation de son activité entraîne une mauvaise

ségrégation des centrosomes et la mise en place d'un phénotype CIN aboutissant au développement tumoral. Au sein de la cellule, il existe plusieurs autres oncogènes dont l'activation est impliquée dans l'induction des cancers colorectaux comme la β -caténine, STAT3 ou myc. Suivant la dérégulation initiale du point de contrôle mitotique menant au phénotype de type CIN, la progression tumorale repose sur la dérégulation des gènes suppresseurs de tumeurs (APC, INK4, p53) et des oncogènes (Wnt, Myc, STAT3)

PARTIE III : LES GENES SUPPRESSEURS DE TUMEURS ET LES ONCOGENES

A) Les gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs, contrairement aux oncogènes, sont des freins à la prolifération cellulaire. En temps normal, ils sont activés lors de stress subits par la cellule comme par exemple l'induction oncogénique menant à l'instabilité génétique ou bien des cassures de l'ADN. L'activation de ces gènes a des conséquences diverses : arrêt du cycle, l'entrée en sénescence ou la mort de la cellule. Lors du développement de cancers, les gènes suppresseurs de tumeurs sont inactivés et ils perdent ainsi leurs fonctions de protection de la cellule. Ceci facilite alors le développement tumoral, car les cellules prolifèrent alors de manière anarchique avec très souvent un matériel génétique altéré. Dans une cellule normale de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs sont activés en réponse aux oncogènes, parmi ces gènes, ceux qui codent les protéines APC, ARF/INK4, et p53 sont particulièrement inhibés dans le cadre des cancers colorectaux.

1. Découverte des gènes suppresseurs de tumeurs

Le premier gène suppresseur de tumeur a été découvert grâce à l'étude d'une maladie héréditaire qui touche les enfants au niveau de l'œil : le rétinoblastome. L'analyse des caryotypes de ces patients a permis de montrer une déficience au niveau d'un des chromosomes de la paire numéro 13. Suite à cette découverte, en 1971, Alfred Knudson par l'étude épidémiologique des rétinoblastomes a émis une hypothèse suivant laquelle il existerait au sein de la cellule rétinienne des gènes qui permettraient de protéger celle-ci contre le développement de tumeurs (Knudson, 1971). Deux groupes de patients ont pu être définis, ceux qui ont hérité de ce gène déficient par leurs parents sur un des allèles, l'autre étant normal et dominant, et ceux dont les deux allèles étaient normaux au départ. Dans le premier cas, une mutation sur l'allèle normal suffit pour déclencher la tumeur, dans le second cas il faut deux mutations successives sur chacun des allèles pour entraîner la formation de tumeurs. C'est la perte de l'hétérozygotie et donc l'inactivation totale de la protéine qui va entraîner la formation de tumeurs. Il existe donc un gène de susceptibilité au rétinoblastome

qui est appelé Rb. L'inhibition de ce gène nécessite l'inactivation des deux allèles, cette définition décrira la famille des gènes suppresseurs de tumeurs (Figure 7).

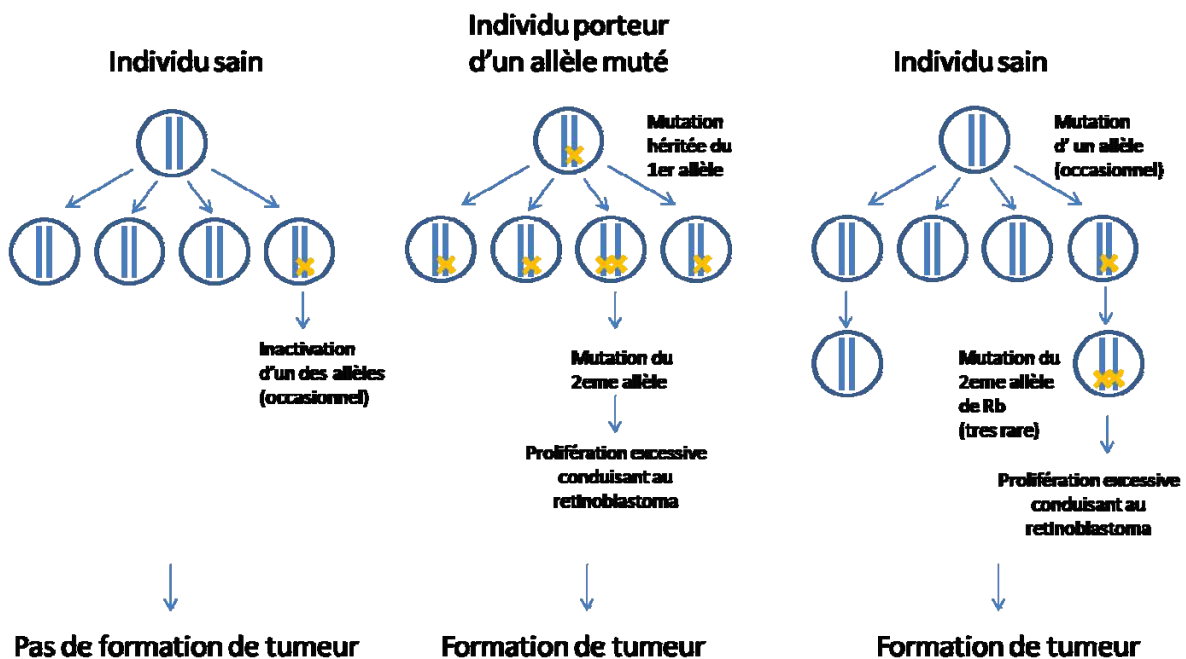


Figure 7 | L'hypothèse de Knudson et le gène du retinoblastome.

La mutation des deux allèles du gène suppresseur de tumeur Rb est nécessaire pour entraîner la formation de tumeurs.

2. Le gène suppresseur de tumeur APC

En parallèle des perturbations de type CIN ou MIN, des mutations d'APC (adenomatous polyposis coli) au niveau du chromosome 5q21 semblent initier le processus de carcinogénèse du cancer colorectal (Kinzler and Vogelstein, 1996) de type FAP et plus de 800 mutations dans le gène ont été identifiées dans les cancers. Une hyperméthylation du promoteur d'APC a aussi été rapporté dans 18% des carcinomes colorectaux primaires et des adénomes (Esteller et al., 2000). La plupart des mutations d'APC entraînent la production d'une protéine anormale plus petite et non fonctionnelle. Des études indiquent qu'une des fonctions normales d'APC dans le colon est de réguler la voie de signalisation de Wnt en induisant la dégradation de la β -caténine par le protéasome (Bienz and Clevers, 2000). La perte d'APC dans les cellules entraîne donc une activation de la voie de wnt et ceci semble initier la formation d'adénocarcinomes colorectaux.

Dans des conditions normales, le complexe comprenant l'Axine, GSK-3 β et la caséine kinase 1 phosphoryle la β -caténine sur la sérine 45 de sa partie N-terminale (Amit et al., 2002). La β -caténine est alors dirigée vers le protéasome pour y être dégradée (Polakis, 2002). La GSK-3 β va à son tour phosphoryler la β -caténine qui va alors être reconnue par la protéine β -TrCP qui va initier la dégradation de β -caténine par le protéasome. Quand APC est mutée, sa forme tronquée perd des séquences répétitives nécessaires à sa fixation avec la β -caténine et l'axine. La GSK-3 β ne peut plus phosphoryler la β -caténine et cette dernière s'accumule et est transloquée dans le noyau. La β -caténine coopère avec TCF-LEF (Polakis et al., 1999) pour induire la transcription de gène en se fixant au niveau de régions TBE (TCF Binding Element) qui sont des sites consensus comprenant des zones de fixation du TCF-4. Les gènes cibles régulés par ce complexe sont des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme c-myc (Banin et al., 1998), la cycline D1 (Tetsu and McCormick, 1999), la survivine. Ceci explique que les mutations d'APC dans le colon puissent entraîner l'apparition d'adénomes par suractivation de la prolifération cellulaire. Dans ces modèles murins, la perte d'APC induit une accumulation nucléaire qui coïncide avec l'apparition de l'adénome (Hinoi et al., 2007) (Kongkanuntn et al., 1999) (Sansom et al., 2004). Cependant, cette corrélation n'est pas confirmée chez l'homme où dans plus de 90% des adénomes aucune accumulation nucléaire de la β -caténine n'est observée. En revanche, l'accumulation nucléaire est retrouvée dans les adénocarcinomes ou des adénomes plus tardifs (Blaker et al., 2003) (Anderson et al., 2002). La perte d'APC n'est donc pas suffisante pour entraîner une accumulation nucléaire de la β -caténine et la formation d'adénocarcinome.

L'oncogène *kras* est muté dans 30-40% des cancers colorectaux et peut intervenir très tôt dans le développement des adénomes. Jones David et son équipe ont montré que la transfection de *kras* dans des cellules où APC est inactivée provoquait une augmentation de la prolifération cellulaire associée à une translocation de la β -caténine dans le noyau. Cela ne se vérifie plus lorsque *kras* est transfectée dans des cellules où APC est encore fonctionnel. La translocation nucléaire de la β -caténine serait donc dépendante de l'activité de l'oncogène *kras* et de l'activation de son effecteur Raf1. L'accumulation de la β -caténine s'expliquerait par l'activation de Rac1 et de JNK2 par Kras/Raf1. La translocation nucléaire de la β -caténine et la séquence adénome-carcinome seraient donc sous la dépendance de deux mutations successives des gènes APC et *kras* (Figure 8) (Phelps et al., 2009).

La β -caténine va permettre le recrutement de facteurs comme le complexe CBP/p300 et le complexe SWI/SNF (Takemaru and Moon, 2000) et la transcription des gènes qui codent pour *myc* et la cycline D1. Ces deux protéines sont surexprimées dans les lignées cellulaires

issues de cancers colorectaux (Wong and Pignatelli, 2002) (van de Wetering et al., 2002). Afin de connaître le rôle de l'induction de myc suite à la perte d'APC dans le développement tumoral, le gène de myc et d'APC ont été supprimés dans des cellules murines montrant ainsi que la perte de myc seule, dans ces cellules restaurait un phénotype normal. Cette observation est réalisée alors même que le taux de β -caténine reste très important dans le noyau. Ceci laisse à penser que myc est une cible importante de la voie de wnt et qu'elle est nécessaire au phénotype induit par la perte d'APC (Sansom et al., 2007).

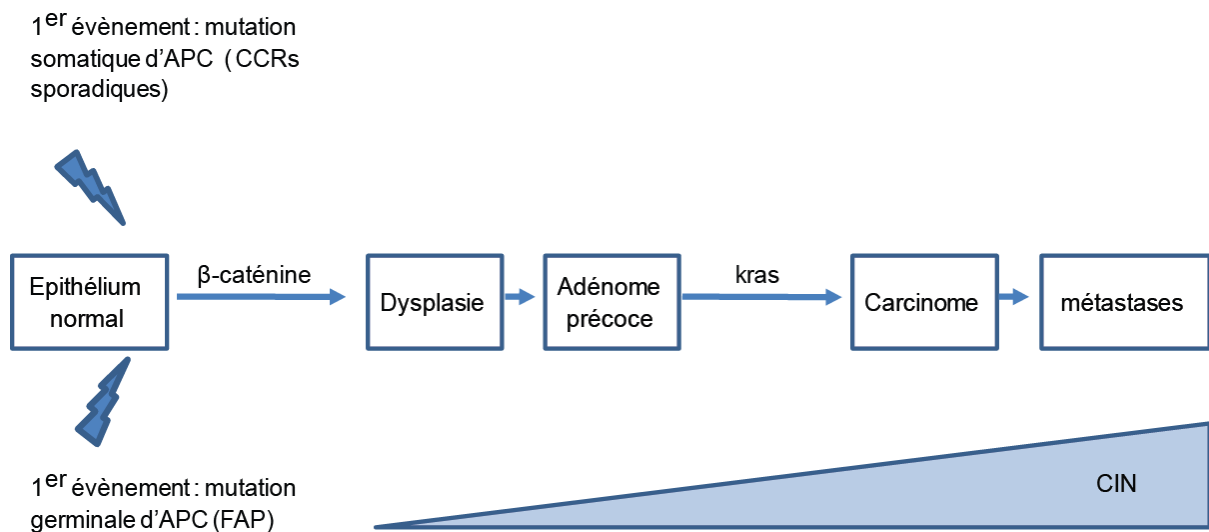


Figure 8 | Mutation du gène suppresseur de tumeur APC et développement tumoral

Les mutations d'APC sont l'élément déclencheur du développement tumoral aboutissant à la formation d'un adénome précoce. La mutation de kras associée à celle d'APC entrainera la translocation de la β -caténine et la formation d'un carcinome.

3. L'exemple de PTEN

Des mutations de la voie de la PI3K/Akt sont également retrouvées dans les tumeurs colorectales. L'absence de PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), l'inhibiteur naturel de la PI3K, est associée à une augmentation des tumeurs de l'intestin (Podsypanina et al., 1999). PTEN est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation des cellules souches intestinales. Des études récentes suggèrent que la perte de PTEN serait corrélée à l'apparition de l'instabilité microsatellite (Nassif et al., 2004).

Une étude a montré par l'intermédiaire de deux modèles génétiques de délétion que la perte de PTEN dans les cellules épithéliales adultes n'affecte pas l'architecture de l'épithélium et n'aboutit qu'à la formation d'une tumeur plus de 200 jours après la délétion de PTEN. Cependant, la perte de PTEN dans un contexte où APC est mutée, aboutit à une progression de la tumeur en adénocarcinome. L'inactivation du gène suppresseur de tumeur PTEN favorise l'accumulation de la β -caténine dans le noyau et l'activation de ses gènes cibles c-myc et la cycline D1 (Bowen et al., 2009). L'inhibition de PTEN a donc pour résultat l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/wnt (Lee et al., 2009) qui finit par la formation d'une tumeur (Figure 9). L'inhibition de APC dans ce contexte va accélérer le développement de la tumeur car son inhibition entraîne aussi une activation de la voie de wnt.

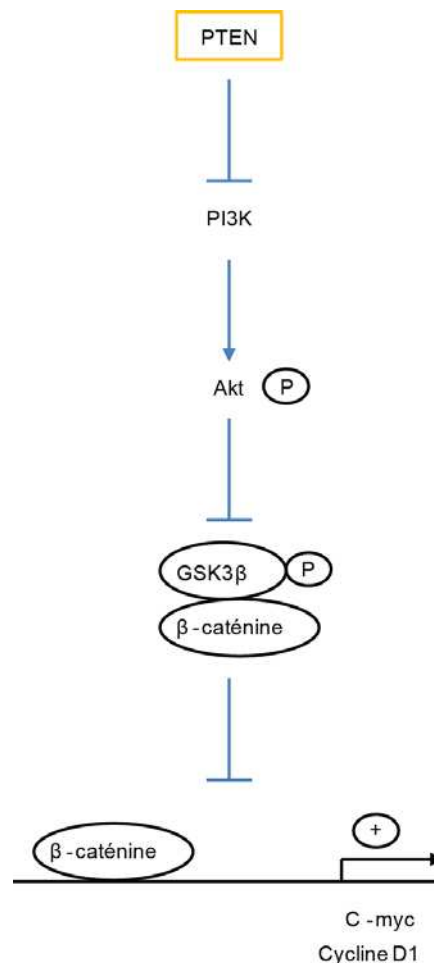


Figure 9 | Voie de signalisation PTEN/Akt/wnt

L'inhibition de l'expression PTEN a pour résultat l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/wnt. L'augmentation de la phosphorylation d'Akt entraîne la stabilisation de la β -caténine et son accumulation nucléaire. La β -caténine va alors se fixer sur le promoteur des gènes possédant une séquence enhancer (TCF/LEF) comme ceux de myc et de la cycline D1. L'inhibition de PTEN entraîne donc une augmentation de l'expression de c-myc et de la cycline D1 (Lee et al., 2009).

4. La famille des gènes suppresseurs de tumeur INK4/ARF

D'autres gènes suppresseurs de tumeurs sont inhibés dans le cas des cancers colorectaux comme le gène INK4/ARF. Ce locus INK4/ARF localisé au niveau du chromosome 9 chez l'homme code pour deux protéines appartenant à la famille des inhibiteurs de la kinase 4 (INK4), p16 et p15 et pour une protéine notée p14/ARF. Des méthylations aberrantes de ce gène entraînent des altérations génétiques dans le cas de cancers colorectaux (Merlo et al., 1995). P16 est un inhibiteur du complexe cycline D/cdk qui empêche la progression du cycle cellulaire et son inactivation entraîne une suractivation des complexes cycline-cdks en phase G1. L'activation de p14/ARF induit la stabilisation de p53 et a été décrit comme interagissant avec MDM2 inhibant ainsi la dégradation de p53 par MDM2 (Zheng et al., 2000).

5. Le gène suppresseur de tumeur p53

Il est observé très souvent une inactivation du gène suppresseur de tumeur, p53, notamment dans le cancer du colon (Bowen et al., 2009; Iacopetta, 2003) (Lu et al., 2009). Cette protéine a été mise en évidence dans les années 1970 par David Lane and Lionel Crawford qui ont montré que dans des tumeurs induites par le virus SV40 (Simian virus 40), la protéine virale T (large T-antigen) interagissait avec une protéine d'un poids moléculaire de 53kDa (Lane and Crawford, 1979) (Melero et al., 1979).

Tout d'abord décrit comme un oncogène, il fallu quelques années de recherche pour comprendre le rôle de p53 et ce n'est qu'en 1989 qu'il fut définitivement considéré comme un gène suppresseur de tumeur. En effet, des études sur des souris ont montré qu'en l'absence de p53, les souris se développaient normalement mais étaient plus prédisposées au développement de cancer (Donehower et al., 1992). Mais déjà, cette idée de p53 comme gène suppresseur de tumeur avait été évoquée en 1984 par les travaux de David Wolf et Rotter qui avaient montré que le gène Trp53 était inactivé par une insertion d'un rétrovirus dans des cellules murines transformées conduisant la formation d'une leucémie Abelson (ab-Mul-LV) (Wolf et al., 1984). Les mêmes observations ont été faites au niveau de leucémies érythrocytes induites par le virus Friend (Ben David et al., 1988). L'utilisation de mutants ayant une activité p53 à 32°C mais la perdant à 37°C a permis de comprendre que la protéine p53 pouvait entraîner un arrêt du cycle cellulaire (Michalovitz et al., 1990) ou la mort cellulaire par apoptose (Yonish-Rouach et al., 1991).

Il est maintenant admis que p53 est un élément clef de la réponse de la cellule à différents stress (hypoxie, altérations du génome, stress oxydatif, déplétion de ribonucléotides, activations d'oncogènes...). Ces derniers provoquent l'accumulation de la protéine p53 dans le noyau et l'induction de son activité transcriptionnelle par sa stabilisation protéique. Le gène suppresseur de tumeur p53 va alors permettre l'arrêt du cycle cellulaire, l'entrée en sénescence, la réparation des dommages de l'ADN et aussi l'apoptose.

- L'activation de p53

En conditions normales, le gène de p53 est traduit mais l'expression de la protéine est régulée de plusieurs manières.

Premièrement, l'activation de p53 implique une régulation traductionnelle par la stabilisation de son ARNm. En absence de stress, la nucléoline inhibe l'interaction de l'ARNm de p53 avec les ribosomes ce qui empêche sa traduction. Lors d'un stress, la liaison de l'ARNm et de la nucléoline est déstabilisée par la protéine ribosomale L26 et la protéine peut être traduite (Takagi et al., 2005). La deuxième régulation s'effectue de manière post traductionnelle. En absence de stress, la protéine p53 est associée à l'ubiquitine ligase HDM2. L'ubiquitination de p53 entraîne son export du noyau et sa dégradation par le protéasome. Lors d'un stress oncogénique, l'activité de HDM2 va être inhibée par la protéine p14/ARF qui va empêcher de manière indirecte, l'association entre HDM2 et p53 et permettre la stabilisation de p53 (Michael and Oren, 2003). D'autres voies de signalisation indépendantes de p14/ARF vont aboutir à la stabilisation de p53. En réponse aux dommages de l'ADN, p53 est directement recruté au niveau des foci de dommages de l'ADN en effet, elle colocalise et coimmunoprécipite avec les protéines histones H2AX phosphorylées (Al Rashid et al., 2005). Au niveau des foci, les kinases ATM/ATR et chk1/chk2 phosphorylent p53 sur ses résidus sérines 15 (Bode and Dong, 2004). Cette phosphorylation est en fait nécessaire pour la phosphorylation d'autre résidus sérines, comme la ser46 impliquées dans l'activation de l'apoptose (Saito et al., 2002). De façon similaire cette phosphorylation est impliquée dans l'acétylation du domaine C-terminal de p53 sur les résidus lysine 320 et 386. Ces résidus permettent de stabiliser p53 sur des promoteurs de faible affinité pour p53. Les mutants de la sérine 15 ne sont plus capables d'induire la transcription des gènes cibles bien que p53 soit stabilisée par les dommages de l'ADN (Dumaz and Meek, 1999). Les kinases chk1/chk2, activées par ATM/ATR phosphorylent aussi p53 sur la sérine 20. La phosphorylation de la

sérine 20 est critique car elle induit une déstabilisation de la liaison entre HDM2 et p53 et empêche l'ubiquitination de la protéine (Chehab et al., 2000). Les sérines 15 et 20 sont donc toutes les deux phosphorylées respectivement par les kinases ATM/ATR d'une part et chk1/chk2 d'autre part (Bode and Dong, 2004). Ces phosphorylations permettent la phosphorylation d'autres résidus dans la région N-ter de p53 dont la sérine 9 ou la thréonine 18 phosphorylées par les kinases CK1 ou DNA-PK par exemple. Ces phosphorylations déstabilisent la liaison entre Hdm2 et p53 et permettent ainsi la stabilisation de la protéine. De plus, ces phosphorylations sont absolument nécessaires au recrutement des cofacteurs de la transcription par p53 (Dumaz and Meek, 1999).

- Les fonctions de p53

P53 est généralement activée en réponse à un oncogène ou à un stress cellulaire comme les dommages de l'ADN. Les gènes contrôlés par p53 interviennent dans de nombreuses activités comme le métabolisme, la régulation du cycle cellulaire, l'angiogenèse, par la transcription de gènes qui entraînent la synthèse d'inhibiteurs de l'angiogenèse comme TSP et maspin mais aussi la réponse immunitaire, la différenciation, la migration et les connexions entre cellules (Figure 10).

Des sites consensus de fixation de p53 ont aussi été retrouvés sur les gènes codant pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme DDB2 (Tan and Chu, 2002) et XPC laissant penser à un rôle de p53 dans la réponse aux dommages de l'ADN. De plus, l'équipe de K. Vousden a montré en 2006 que p53 peut protéger le génome des dommages issus de stress oxydatifs par l'intermédiaire de Tigar. L'induction de l'expression de cette protéine entraîne une diminution de la glycolyse ainsi qu'une diminution de la production de ROS ce qui protège la cellule des dommages génétiques (Bensaad et al., 2006).

Toutes les cibles de p53 semblent converger vers une inhibition de la prolifération cellulaire et l'induction des phénomènes de sénescence et d'apoptose. Cependant en 2009, l'équipe de Karen Vousden met en avant une fonction d'un mutant de p53 qui se lie à p63 et p73. Ce mutant inhibe leur activité transcriptionnelle et permet ainsi l'induction de l'invasion cellulaire par le recyclage à la membrane de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, une molécule d'adhésion. Dans ces conditions, le récepteur à l'EGF est lui aussi recyclé à la membrane par l'intermédiaire de RCP (Rab-coupling protein), protéines adaptatrices des protéines à activité GTPase, Rab, qui permettent de recycler l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Cette augmentation du recrutement de l'intégrine et de l'EGFR à la surface des cellules tumorales entraîne la phosphorylation et l'activation de la

kinase Akt permettant d'accroître le potentiel métastatique des cellules (Muller et al., 2009). Ces résultats ouvrent une possibilité : bloquer l'intégrine $\alpha5\beta1$ et le récepteur à l'EGF pourrait être une thérapeutique utilisée dans les cancers exprimant cette forme mutée de p53.

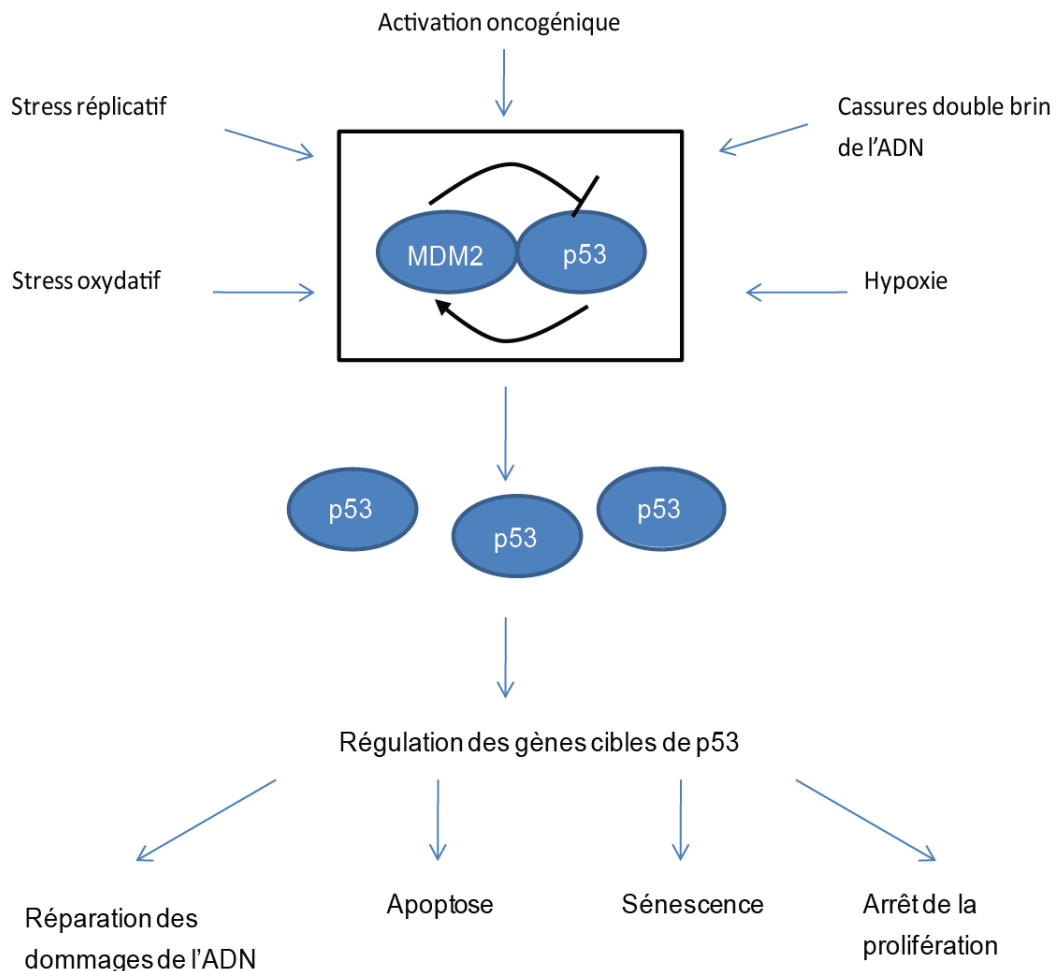


Figure 10 | Schéma simplifié de la voie de signalisation de p53

La régulation du complexe p53/MDM2 est à la base de la voie de signalisation de p53. L'activation de nombreux stress comme les cassures de l'ADN ou l'activation oncogénique entraîne la stabilisation de la protéine, ce qui permet l'activation des gènes cibles de p53. L'augmentation de l'expression de p53 permet l'induction de l'apoptose, de la réparation des dommages de l'ADN, l'entrée en sénescence et l'arrêt de la prolifération.

- P53 entraîne un arrêt du cycle cellulaire

Une expression inductible de p53 dans différents types cellulaires a permis de définir son rôle dans la régulation de l'expression de ses gènes cibles. Une élévation du taux de la protéine p53 conduit à une surexpression rapide des protéines p21^{WAF1/CIP1} et de BTG2 (Rouault et al., 1996). Le gène de p21 code pour un inhibiteur des complexes cyclines-cdk, ce

qui permet de bloquer la phosphorylation de Rb. Ceci permet le maintien de la fixation de Rb sur l'ADN, conduisant à l'inhibition des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. p21 constitue vraisemblablement le médiateur essentiel de l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S après induction de p53 en réponse aux agressions génotoxiques. La surexpression de BTG2 va elle aussi entraîner une diminution de la prolifération des cellules. Cette inhibition de la croissance serait liée à l'inhibition de l'expression des cyclines D et E (Boiko et al., 2006) et donc à un ralentissement de la progression G1/S. Gadd45 et 14.3.3 σ seraient plutôt impliquées dans l'inhibition du complexe cycline B/cdk1 au niveau du contrôle entre la phase G2/M. Gadd45 inhibe la formation du complexe en se liant à cdk1. La cycline B et cdc25C sont alors exportées vers le cytoplasme où elles sont retenues inactives par 14.3.3 σ .

Plus récemment, des analyses ont permis de montrer que des miRNA comme ceux de la famille mi-R34 sont également régulés par p53. La transcription de ces miRNA va permettre un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Bommer et al., 2007). Ces miRNA semblent être des effecteurs clés de la fonction du gène suppresseur de tumeur car leur inactivation conduit au développement tumoral des cancers du poumon à petites cellules.

- P53 initie l'apoptose

Suite à sa stabilisation, p53 va pouvoir entraîner l'induction du phénomène d'apoptose par l'induction de la transcription de gènes proapoptotiques comme Bax, Killer/DR5, IGF-BP3, PUMA ou NOXA. En condition normale, les membres proapoptotiques comme Bax ou Bak, sont inhibés par les protéines antiapoptotiques Bcl2 ou BclXL. L'activation par p53 des protéines qui possèdent un domaine BH3 comme NOXA, PUMA et Bid va inhiber l'action antiapoptotique de Bcl2 et BclXL en induisant un changement de conformation des protéines Bax et Bak, conduisant à leur oligomérisation et à leur insertion dans la membrane mitochondriale (Cartron et al., 2003).

En parallèle, p53 serait à l'origine de la transcription de gènes qui vont entraîner une sensibilisation à l'apoptose comme la protéine Fas ou KILLER. La liaison des différents ligands sur leurs récepteurs respectifs induit l'activation du complexe de mort DISC, et l'activation de la caspase 8 entraînant ensuite le clivage de la protéine Bid, protéine à domaine BH3 qui conduit alors l'activation de Bax et la libération de cytochrome c.

En plus de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, dans les cancers colorectaux, une activation des oncogènes est aussi observée et entraîne une prolifération incontrôlée des cellules.

B) les oncogènes

Nous nous concentrerons dans ce chapitre sur les trois oncogènes principaux impliqués dans le développement du cancer colorectal, la β -caténine, myc et STAT3.

1. La voie de signalisation de wnt

L'une des voies oncogéniques impliquée dans le développement des CCRs est la voie de signalisation de Wnt. L'implication de cette voie a été étudiée suite à la découverte du gène suppresseur de tumeur APC, muté dans un grand nombre de cancers colorectaux héréditaires et sporadiques. Comme je l'ai précisé ci-dessus, de nombreuses études ont montré que l'inactivation d'APC dans les cellules de CCRs entraînait une activation constitutive de la voie de signalisation de wnt (Korinek et al., 1997). Des mutations entraînant des gains de fonction dans la β -caténine ont été identifiées dans 50% des tumeurs colorectales, reflétant ainsi l'importance de la voie de wnt dans le développement tumoral (Sparks et al., 1998). Des mutations germinales de la voie de Wnt causent des maladies héréditaires alors que des mutations somatiques sont souvent associées aux cancers, de l'intestin notamment.

La stimulation de la voie de signalisation de wnt aboutit à l'activation de la β -caténine. Parmi les cibles du complexe β -caténine-TCF, la protéine myc semble jouer un rôle important dans le développement des cancers colorectaux.

2. L'oncogène myc

Myc est un facteur de transcription qui se lie aux séquences « Enhancer box (E-box)» (CATGTG) et est essentiel pour la prolifération cellulaire (Bouchard et al., 1999). L'extrémité carboxy-terminale de myc contient un domaine bHLH (basic helix loop helix-leucine zipper) permettant sa liaison avec son partenaire max qui entraîne une activité transcriptionnelle optimale (Blackwood and Eisenman, 1991). L'hétérodimère myc/max ainsi formé est capable de se lier à l'ADN sur des régions spécifiques des gènes présentant la séquence consensus

canonique CACGTG (Blackwood and Eisenman, 1991). L'extrémité amino-terminale de myc comprend deux sites très conservés impliqués dans la transactivation des gènes et permettant le recrutement de protéines adaptatrices comme TRRAP ou des Histone Acétyl-transférases (HAT) comme TIP60 (McMahon et al., 2000) (Amati et al., 2001). La fixation du complexe myc/max entraîne le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et l'expression de gènes permettant la progression du cycle cellulaire tels que celui de la cycline D2, CDC25A, Cdk4 et E2F1 (Boyd and Farnham, 1999) (Bouchard et al., 2001) (Bouchard et al., 1999), de skp2 et des sous-unités composant le complexe de l'E3-ligase telles que Cul-1 et Csk2 ce qui entraîne la dégradation de p27 (Coller et al., 2000; O'Hagan et al., 2000) (Figure 11). Ceci entraîne l'activation des complexes cycline/cdk nécessaire au passage en phase S.

Dans les cellules quiescentes, c-myc n'est pas détectable, mais après stimulation des cellules par un mitogène, l'ARNm de myc augmente pour progresser vers la phase G1 puis diminue ensuite progressivement, ceci permet le passage à la phase S. Contrairement à l'expression de Myc, celle de Max est constitutive ou sujette à de très petites variations (Blackwood and Eisenman, 1992). Le dimère myc/max est donc la forme active de myc qui permet la progression du cycle cellulaire via l'activation de ses gènes cibles.

Paradoxalement, Myc peut aussi réprimer les gènes codant les protéines p21 et p27 (Gartel and Shchors, 2003) et de p15/INK4 (Bouchard et al., 1999), suggérant que myc peut s'associer avec d'autres partenaires pour inhiber l'expression de certains gènes cibles (Figure 11).

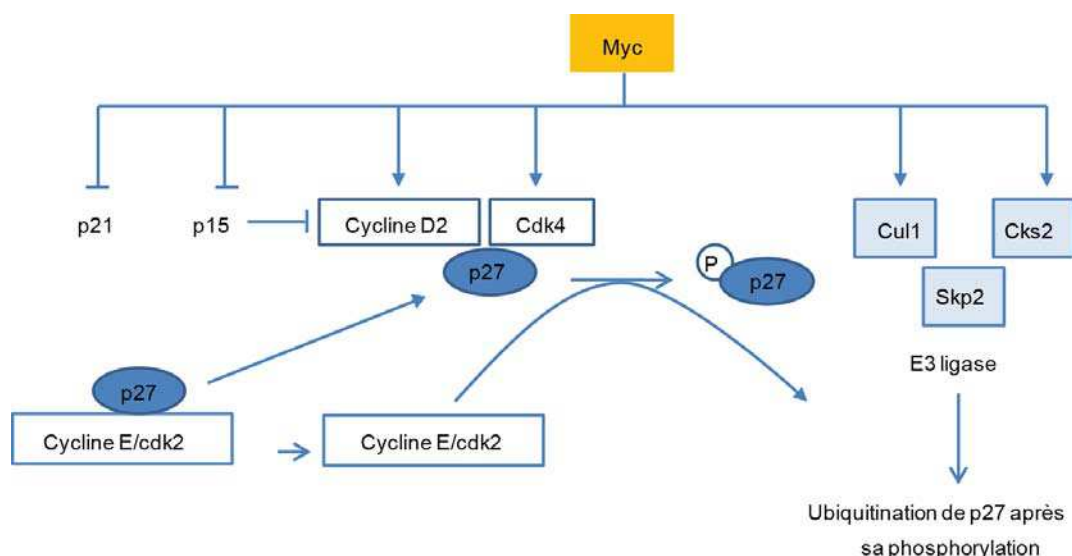


Figure 11 | Régulation du cycle cellulaire par le facteur de transcription myc

Myc permet l'induction de l'expression du complexe cycline D2/cdk4 qui va alors fixer p27. Ceci libère l'activité kinase de cdk2 qui va phosphoryler p27. L'E3 ligase induite par myc va permettre la dégradation de p27 entraînant l'activation du complexe cycline/cdk.

- Régulation de l'activité transcriptionnelle de myc

Les protéines de la famille Mxd plus connues sous le nom de protéines Mad comme mad1, mad3, mxi1 et mad4 (Baudino and Cleveland, 2001) sont capables de réduire la fixation de myc sur ses cibles et ainsi d'inhiber le facteur de transcription. Ces protéines peuvent former des hétérodimères avec la protéine Max par association avec son domaine bHLH-LZ et sont parfois capables de se fixer aux mêmes séquences E-box que le complexe max/myc. Elles vont donc rentrer en compétition avec myc pour la fixation à Max et aussi pour la fixation sur les séquences Ebox ce qui entraîne une répression de l'activité de myc (Grinberg et al., 2004) (Hooker and Hurlin, 2006) (Rottmann and Luscher, 2006). Cet effet répresseur peut s'expliquer par le fait que des corépresseurs vont pouvoir se fixer au niveau du domaine N-terminal de Mad comme par exemple les protéines mSin3A et mSin3B, et ceci va permettre le recrutement de HDAC1 et HDAC3. La perte de l'expression ou la mutation de ces protéines peut entraîner un phénotype identique à la surexpression de myc dans les cellules.

Acétylation



Déacétylation

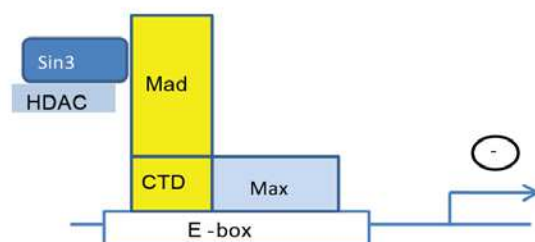


Figure 12 | Représentation schématique des différents complexes régulant l'activité transcriptionnelle de myc (Pelengaris et al., 2002)

Dans les cellules de mammifères cette balance entre l'association de myc avec max ou mad joue un rôle important dans la croissance cellulaire, dans la progression du cycle et dans

la différenciation (Iritani et al., 2002) (McArthur et al., 2002). L'expression des gènes cibles de myc est donc inhibée par deux mécanismes : une titration de max par mad et une compétition entre les complexes myc/max et mad/max sur les E-box (Figure 12).

Nous avons vu auparavant que Myc pouvait réprimer la transcription de gènes comme p21 et p27. Ceci implique l'association du facteur de transcription avec des protéines autre que Max, comme Sp-1 ou Miz-1. Ce sont des protéines en doigt de zinc qui contiennent un domaine BTB-POZ (Kleine-Kohlbrecher et al., 2006) (Seoane et al., 2001). Une fois complexés avec myc, ces facteurs inhibent l'expression de ces gènes cibles en empêchant le recrutement du cofacteur p300 (Seoane et al., 2001) (Figure 12).

- Myc et l'oncogenèse

Cette capacité de myc à promouvoir la progression cellulaire, met en avant un rôle crucial de sa fonction dans les processus de tumorigénèse, et en particulier comme médiateur de l'activité de wnt dans le cancer colorectal (Zindy et al., 2006) (Oskarsson et al., 2006).

Bien que l'activation oncogénique de myc puisse conduire à une prolifération incontrôlée in vitro, la transformation cellulaire in vivo nécessite d'autres lésions oncogéniques. Il a été démontré qu'une surexpression de myc est aussi impliquée dans les phénomènes d'induction de l'apoptose dépendante de p53 qui correspond à la première réponse oncogénique. En effet, la protéine ARF est rapidement induite suite à des signaux aberrant de myc (Lowe et al., 2004) et entraîne l'activation de p53 et de la mort cellulaire. Seules les cellules qui inactivent la voie p53/ARF échappent à la mort cellulaire et deviennent immortelles (Zindy et al., 1998). L'expression transgénique de la protéine de fusion myc associée aux récepteurs des œstrogènes (système MYCER_{TAM}) a été réalisée de manière à observer les effets de l'activation de myc dans différents tissus de souris transgéniques adultes, comme le pancréas (Pelengaris et al., 1999) (Pelengaris et al., 2002). Suite à l'activation de MYCER par le tamoxifène les cellules β induisent une prolifération qui sera rapidement contrée par l'induction d'apoptose. Lorsque cette expérience est répétée dans des cellules où la voie apoptotique est inhibée par une surexpression de Bcl-XL et Bcl-2 ou par une perte des suppresseurs de tumeur ARF ou p53, le facteur myc induit une prolifération aberrante de ces cellules (Strasser et al., 1990) (Jacobs et al., 1999). L'activité de myc devient donc transformante lorsqu'elle est associée à une expression anormale des protéines de survie.

La suractivation de myc dans les tumeurs peut être due à plusieurs phénomènes comme les amplifications, des translocations ou encore à des insertions (Dalla-Favera et al., 1982) (Payne et al., 1982). Les amplifications géniques correspondent à l'augmentation du nombre de copies d'un proto-oncogène. Les translocations entraînent le déplacement de fragment d'ADN parfois d'un chromosome à un autre comme par exemple dans le lymphome de Burkitt entre le chromosome 8 correspondant à la région codant pour c-myc et l'un des trois gènes codant pour les immunoglobulines (Magrath, 1990). Des mutations de myc sont également associées à la tumorigénèse. Myc est phosphorylée sur la sérine 62 via la voie des MAPK induite par Ras qui stabilise la protéine. L'activation de Ras entraîne donc une stabilisation de myc. D'un autre côté, une mutation de myc au niveau de son résidu thréonine 58 entraîne aussi une augmentation de l'activité oncogénique de myc. Ce résidu peut normalement être phosphorylé par GSK-3 β , ce qui entraîne la dégradation via le protéasome de myc (Sears, 2004).

L'activation du processus tumoral par Myc peut passer par différentes voies. Dans les cellules normales à chaque division cellulaire les cellules perdent une partie de leur télomère situé à l'extrémité des bras des chromosomes. Suite à une cinquantaine de divisions cellulaires, la perte des télomères va être totale et les cellules vont alors rentrer en sénescence et ne pourront plus se diviser, cet arrêt est dû au vieillissement de la cellule. Le mécanisme d'immortalisation par myc peut passer par une stimulation de l'activité télomérase et inhiber le raccourcissement des télomères (Wang et al., 1998).

Myc est donc un oncogène très important dans le développement des cancers et en particulier dans les CCRs. De plus, nous avons vu que la β -caténine, un autre oncogène présent dans de nombreuses tumeurs colorectales peut entraîner une surexpression de l'oncogène myc. Mais, en plus de l'activation de myc, l'accumulation nucléaire de la β -caténine peut entraîner l'activation du gène qui code pour le facteur de transcription STAT3 (Yan et al., 2008), une protéine qui est également activée dans les tumeurs colorectales en raison d'une activation anormale de la kinase src.

3. Le facteur de transcription STAT3

Les protéines STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription) font parties d'une famille de facteurs de transcription de 750 à 850 acides aminés dont sept membres ont été identifiés pour le moment : STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B et 6.

En se fixant sur le promoteur de ses gènes cibles, STAT3 régule la prolifération cellulaire, l'entrée en phase S du cycle par l'activation de la transcription de la cycline D1, c-myc et de c-fos (Bromberg, 2002) mais aussi la survie cellulaire (Bcl-xl et Bcl2), l'angiogénèse, la mobilité cellulaire et l'embryogénèse. STAT3 est aussi impliquée dans le développement tumoral. STAT3 est activée de manière constitutive dans de nombreuses tumeurs et constitue une cible privilégiée d'oncogènes comme src (Bromberg et al., 1998), oncogène fortement activé dans le cancer colorectal (Yeatman, 2004).

- Structure de STAT3

La protéine STAT3, appelée initialement APRF (Acute phase responsive Factor), a été découverte en 1993 et identifiée comme un facteur interagissant avec les promoteurs de gènes de la phase aigue activés par l'IL-6 (Wegenka et al., 1993) (Akira et al., 1994). Le gène qui code pour la transcription de cette protéine de 90kDa est porté sur le chromosome 17 comme pour les facteurs STAT5 A et B (Darnell et al., 1994). Le domaine de liaison à l'ADN de STAT3 est situé entre les acides aminés 320 et 480 et permet la liaison des homodimères STAT3 ou hétérodimères STAT1/STAT3 sur les séquences consensus présentes sur les promoteurs de gènes cibles. Il est organisé autour d'une structure en feuillets β connectée par des boucles non structurées et ce sont des résidus arginine qui vont permettre l'interaction avec l'ADN (Ma et al., 2003). Le domaine « linker » permet de relier le domaine de liaison à l'ADN au domaine SH2 de STAT3 qui forme une poche capable de lier des tyrosines phosphorylées. Cette région est impliquée dans la dimérisation des facteurs de transcription STAT3 et permet aussi la liaison de la protéine aux récepteurs membranaires, principalement les récepteurs de cytokines (famille GP130), qui sont activés et phosphorylés sur la tyrosine (Hemmann et al., 1996) (Shuai et al., 1992). Le domaine se situant au niveau de l'extrémité C-terminale correspond au domaine de transactivation et contient divers sites de phosphorylation de STAT3 comme le résidu tyrosine 705, ainsi qu'un résidu lysine 685, acétylée par les histones acétyltransférases CBP/p300, qui permet de stabiliser le dimère et la liaison à l'ADN de STAT3 (Wang et al., 2005) (Yuan et al., 2005). Enfin, cette région contient un site de phosphorylation au niveau de la sérine 727 dont la fonction reste à être

approfondie. Un épissage alternatif de l'ARN de STAT3 peut générer deux formes : une forme entière (STAT3 α) et une forme plus courte (STAT3 β) dépourvue de domaine c-terminal. STAT3 β ne possède donc pas de domaine de transactivation et est constitutivement dimérisé et nucléaire. Initialement considéré comme un dominant négatif de STAT3 α , des inactivations spécifiques de cet isoforme ont montré que STAT3 β peut induire l'expression de gènes de la phase aiguë de l'inflammation comme le fibrinogène ou la SAP (serum amyloid P) après injection de LPS et coopérer avec c-jun sur différents gènes tel que l' α 2-macroglobuline et l' α 1-chymotrypsine (Maritano et al., 2004).

Le facteur de transcription possède encore deux autres domaines, le domaine N-terminal et le domaine coiled-coil. Tout d'abord le domaine N-terminal peut stabiliser l'association de deux dimères de STATs sur des sites ADN de faible affinité et organisés en tandem (Zhang et al., 2001). Enfin, le domaine coiled-coil constitué de 4 hélices α est lui impliqué dans l'interaction avec d'autres protéines comme le facteur de transcription c-jun mais aussi la sous unité du récepteur à l'IL-6 (Figure 13).

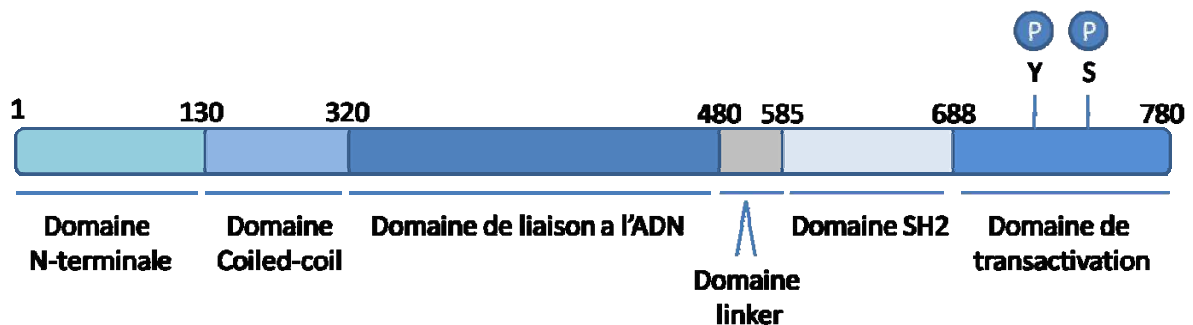


Figure 13 | Structure des protéines STAT3

STAT3 est une protéine constituée de différents domaines. Le domaine de transactivation du facteur de transcription comprend deux sites de phosphorylation, un sur la tyrosine 705(Y) et l'autre au niveau du résidu sérine 727(S)

- L'activité transcriptionnelle de STAT3

Les facteurs de transcription STAT3 sont présents dans le cytoplasme des cellules où ils sont alors inactifs. L'activation de STAT3 est initiée par la liaison de facteurs de croissance sur leur récepteur comme les récepteurs à l'EGF, au PDGF ou encore à l'HGF (Boccaccio et al., 1998) ou par la fixation de cytokines comme l'IL-6, premier activateur de STAT3 (Figure 14). Ces récepteurs phosphorylent directement STAT3 grâce à leur propre

activité tyrosine kinase ou de manière indirecte par l'intermédiaire de kinases cytoplasmiques comme src ou JAK. Par exemple, la liaison de l'IL-6 sur son récepteur membranaire gp130 va entraîner la dimérisation du récepteur, l'activation des kinases JAK et la phosphorylation de STAT3 sur le résidu tyrosine 705 (Figure 14) (Yu et al., 2009). Il a été établi que STAT3 ne possédait pas de séquences NLS fonctionnelles classiques mais des études suggèrent qu'un élément riche en lysine et arginine pourrait être impliqué dans la translocation du facteur de transcription (Melen et al., 2001). L'activation de STAT3 est transitoire et est régulée par l'export nucléaire par l'intermédiaire des séquences conservées NES qui sont au nombre de trois en position 306-318, 404-414 et 524-537. Ces séquences font intervenir les protéines d'export CRM1/Xpo1 qui sont capables d'interagir directement avec STAT3 pour le ramener dans le cytoplasme (Marg et al., 2004).

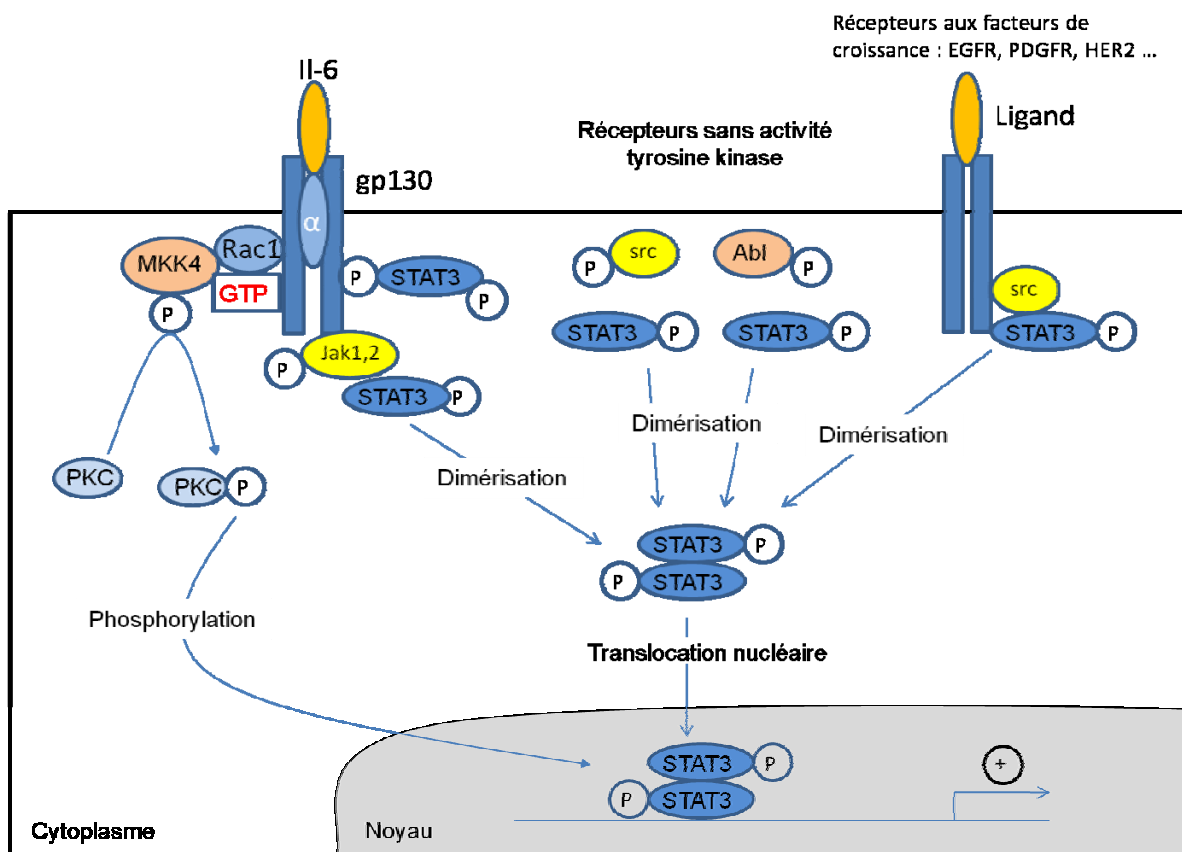


Figure 14 | Voie de signalisation du facteur de transcription STAT3

L'activation du facteur de transcription STAT3 se fait par de la fixation de facteurs de croissances sur leurs récepteurs respectifs comme l'interleukine 6 et l'EGF ou par des récepteurs sans activité tyrosine kinase mais par l'intermédiaire de src ou JAK. Ceci aboutit à une phosphorylation de STAT3 qui permet sa dimérisation et sa translocation dans le noyau.

Les facteurs de transcription STAT3 reconnaissent au niveau de l'ADN une séquence consensus qui est une séquence d'ADN de 8 à 10 paires de bases répétée et inversée. Cette séquence a été caractérisée à partir de la découverte de celle de STAT1. Cette séquence est

appelée séquence « Gas » et se présente ainsi : 5'-TTC/G(NNN)G/CAA-3'(Decker et al., 1997).

- Gènes cibles de STAT3

Comme tous les facteurs de transcription, STAT3 n'active pas directement ses gènes cibles, il est nécessaire en effet que STAT3 se lie à ses différents cofacteurs. Ceci va être essentiel pour mettre en place les différentes étapes successives de l'activation transcriptionnelle comme la décondensation de la chromatine et le recrutement de l'ARN polymérase de type II. Tout d'abord, STAT3 permet le recrutement d'activateurs transcriptionnels comme NCoA et SRC1a (Giraud et al., 2002). Ensuite, les acétyltransférases CBP ou p300 vont aussi être recrutées sur le promoteur, ainsi que les complexes de remodelage de la chromatine tel que les complexes BRG/BRM. Les protéines SRC1A et BRG interagissent directement avec le domaine d'activation de STAT3, tandis que CBP ou p300 nécessitent le recrutement préalable du coactivateur SRC1A. Le complexe CBP/p300 va permettre l'acétylation de la chromatine et ainsi entraîner un remodelage cette dernière par le glissement du nucléosome. Pour finir, STAT3 va pouvoir recruter la kinase cdk9 via son domaine c-terminal pour phosphoryler le domaine CTD de l'ARN polymérase II pour débiter la phase d'élongation de la transcription (Giraud et al., 2004).

Suite à son interaction avec d'autres cofacteurs, STAT3 va pouvoir aussi entraîner la répression de la transcription de gènes ceci en recrutant par exemple la protéine Tip60 et des histones déacétylases HDAC7 (Xiao et al., 2003). De plus la liaison de STAT3 et d'un complexe DNMT1 sur le promoteur du gène de SHP1 va entraîner la méthylation des îlots CpG et empêcher l'activation du gène par d'autres facteurs de transcription (Zhang et al., 2005). De plus, des études menées dans le laboratoire ont montré que STAT3 pouvait se lier à des protéines du cycle cellulaire comme Rb et p21 pour induire la répression de la transcription (Barre et al., 2005) (Vigneron et al., 2006).

a) STAT3 permet la régulation du cycle cellulaire

STAT3 permet le passage des cellules quiescentes vers la phase G1 du cycle cellulaire en se fixant sur le promoteur de c-myc et de c-fos (Kiuchi et al., 1999) (Jenab and Morris, 1998). Ensuite, STAT3 va pouvoir permettre le passage de la phase G1 en phase S du cycle cellulaire en activant les gènes de la cycline D et de cd25A, une phosphatase impliquée dans l'activation du complexe cycline E /Cdk2 (Fukada et al., 1998) (Barre et al., 2005) (Leslie et al., 2006).

D'un autre coté le facteur de transcription STAT3 peut aussi réguler la transcription de gènes qui codent pour des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire comme la protéine p21. En effet, des sites de fixation des facteurs de transcription STAT3 sont présents sur le promoteur du gène de p21 (Bienvenu et al., 2005; Chin et al., 1996) (Hawthorne et al., 2009). STAT3 est donc aussi impliqué dans l'arrêt du cycle.

b) STAT3 induit la survie cellulaire

En plus d'activer les gènes du cycle cellulaire, STAT3 est impliquée dans la survie cellulaire. Pour cela, STAT3 active la transcription de gènes anti-apoptotiques. Les protéines Bcl-XL et Mcl1 inhibent l'activation de Bax et bloquent la perméabilisation mitochondriale. Ainsi, la transfection de STAT3-C, une forme constitutivement active de STAT3 mutée au niveau de 2 cystéines A661C et N663C dans la boucle c-terminale du domaine SH2, entraîne une induction de l'expression de Bcl-XL (Catlett-Falcone et al., 1999) tandis que STAT3 peut également activer Mcl-1 (Puthier et al., 1999). STAT3 active aussi Akt, protéine également impliquée dans la survie cellulaire (Park et al., 2005), ainsi que la survivine qui inhibe l'activation des caspases et qui est souvent surexprimée dans les cancers entraînant ainsi une résistance à l'apoptose (Gritsko et al., 2006). Le facteur de transcription permet aussi d'induire l'expression de la télomérase (Konnikova et al., 2005), ce qui empêche la perte des séquences télomériques au cours de la division cellulaire, protégeant la cellule de l'entrée en sénescence répllicative.

Ces données mettent en avant un rôle central de STAT3 dans différentes fonctions cellulaires de survie et de prolifération. En plus, de ces nombreuses fonctions, au laboratoire, Arnaud Vigneron a montré que STAT3 était aussi impliquée dans la transcription du gène de réparation de l'ADN, l'endonucléase Emel (Vigneron et al., 2008). Via une augmentation des processus de réparation, STAT3 améliore également la survie.

- STAT3 et la tumorigénèse

En 1999, JF Bromberg décrit le facteur de transcription STAT3 comme un oncogène, grâce à l'utilisation des mutants STAT3-C, une forme constitutivement active de STAT3. STAT3-c entraîne la formation d'une molécule qui se dimérise spontanément sans phosphorylation initiale de la tyrosine via la formation de ponts disulfures entre deux monomères (Bromberg and Darnell, 1999) (Bromberg et al., 1999). Sous cette forme dimérique, le facteur de transcription devient actif et peut se fixer sur l'ADN pour induire la transcription de ses gènes cibles impliqués dans la prolifération et la survie. La croissance en agar, donc la transformation des cellules, a été observée après transfection de cellules NIH3T3 et des fibroblastes immortalisés de rat 3Y1 par STAT3-C. Aucune transformation n'a cependant été observée après la transfection de la forme normale de STAT3. L'injection de cellules transfectées avec STAT3-C dans des souris nues a entraîné la formation de tumeurs. Les cellules tumorales issues de la transformation par STAT3-C possédaient plusieurs nucléoles, des noyaux larges et étaient très fréquemment en mitose. De plus, les gènes de la cycline D1, de myc et de bcl-xl étaient trois à cinq fois plus transcrits que dans des cellules normales et ceci en absence de stimulation. STAT3 possède donc un potentiel oncogénique (Bromberg et al., 1999).

Bien que le facteur de transcription soit potentiellement oncogénique, aucune mutation n'a été retrouvée au niveau de son gène dans les diverses tumeurs analysées. Mais ce facteur de transcription est un relai de nombreux oncogènes permettant une dérégulation des mécanismes de prolifération et de survie.

a) STAT3 peut être activée de manière constitutive par les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les protéines STAT3 peuvent aussi être activées de manière constitutive par l'intermédiaire des récepteurs à activité tyrosine kinase. Dans des conditions normales une activation transitoire du PDGFR, de l'EGFR ou encore du récepteur Met (Cramer et al., 2005) va entraîner une activation de STAT3. L'équipe de Bromberg JF a montré que des mutations activatrices dans le domaine kinase de l'EGFR entraînaient une activation constitutive de STAT3 dans les adénocarcinomes humains du poumon (Gao et al., 2007). Il a été montré aussi que l'injection de cellules transformées par v-eyk, récepteur à activité tyrosine kinase,

entraîne la formation de tumeurs après injection chez des souris nues et que ceci est réalisé par l'intermédiaire de l'activation de STAT3 (Besser et al., 1999).

b) L'oncogène src active STAT3

L'oncogène src est très souvent suractivé dans les cancers colorectaux. Le domaine c-terminal de src inhibe l'activité kinase de la protéine en se repliant sur son domaine kinase. La protéine est alors inactive. L'oncogène v-src similaire à la protéine c-src est issu de la séquence nucléotidique du Rous sarcoma virus.

1. L'oncogène v-src

La protéine v-src ne possède plus de domaine c-terminal et est donc constitutivement active. Elle induit la transformation de fibroblastes murins qui acquièrent la capacité de proliférer en milieu semi-liquide et induisent des tumeurs chez la souris. L'inhibition de STAT3 par l'utilisation d'une isoforme dominante négative, STAT3 β , empêche la transformation de ces fibroblastes par v-src. STAT3 participe et est nécessaire à l'activité transformante de src (Bromberg et al., 1998). L'activation de STAT3 par v-src entraîne la transcription de ses gènes cibles notamment c-myc, la cycline D1 et bcl-XL. L'activation de ces gènes par le facteur de transcription semble nécessaire au pouvoir transformant de v-src car dans des fibroblastes où la cycline D1 ou myc sont absents, l'oncogène v-src ne peut pas transformer les cellules. De plus, une surexpression de myc dans des cellules peut compenser une absence de STAT3 dans la transformation cellulaire induite par v-src (Bowman et al., 2001).

2. L'oncogène c-src

Dans des tumeurs coliques et pulmonaires, l'EGFR est suractivé par la surproduction de ses ligands comme l'EGF mais plus souvent le TGF α et l'amphireguline. L'activation de l'EGFR va conduire à une activation de STAT3 qui va stimuler la transcription de ces gènes cibles. Des études ont montré que c-src dont l'activité augmente au sein des tumeurs coliques (Yeatman, 2004), potentialise les effets transformant du récepteur à l'EGF, via la phosphorylation de STAT3 sur la tyrosine 705. Une inhibition de c-src dans ces conditions entraîne une perte de l'activation de STAT3 par l'EGFR (Ren and Schaefer, 2002). Une

mutation de la protéine c-src qui entraîne l'apparition d'un codon stop au niveau de la tyrosine 530 et ainsi rend la protéine constitutivement active, aboutit à une suractivation de STAT3 et favorise le développement colique (Irby et al., 1999). D'autre part, la perte de l'expression de Csk, un inhibiteur des kinases src, dans un modèle d'induction des tumeurs coliques chez le rat, est observée et serait corrélée à une suractivation de src (Kunte et al., 2005). La voie src-STAT3 est donc une voie oncogénique importante dans les CCRs.

c) La β -caténine/TCF entraîne une activation de STAT3

Des études ont montré que la phosphorylation et la translocation du facteur de transcription STAT3 est corrélée à l'accumulation nucléaire de la β -caténine, oncogène majeur dans les cancers colorectaux. Cette coexpression de STAT3 et de la β -caténine dans le noyau est associée avec une diminution de la survie des patients (Kawada et al., 2006). D'autres publications ont mis en avant le fait que l'activation de la β -caténine entraîne une augmentation de l'expression de STAT3 dans des cellules souches embryonnaires murines (Cellules ES). Cette induction de STAT3 est nécessaire pour le renouvellement des cellules souches et donc à la prolifération. Dans ces cellules, bien que la voie de wnt ait été activée auparavant, l'absence de STAT3 ou un très faible taux de la protéine, entraîne leur différenciation et elles perdent leur potentiel de cellule souche et leur capacité à s'autorenouveler (Hao et al., 2006). Des sites consensus TBE ont été retrouvés au niveau du promoteur de STAT3, sites de fixation du complexe β -caténine/TCF. La transfection de la β -caténine entraîne une surexpression de l'ARNm de STAT3 et de la protéine. Ces résultats suggèrent que STAT3 est une cible de la β -caténine/TCF et qu'elle participe au développement tumoral de l'œsophage (Yan et al., 2008). Dans les cancers colorectaux, l'activation de STAT3 semble plutôt entraîner l'accumulation de la β -caténine dans le noyau (Kawada et al., 2006). Le facteur de transcription semble donc être une cible de la β -caténine mais semble aussi impliqué dans la stimulation de la voie de wnt. Il est possible de penser qu'il existe une boucle régulatrice positive entre ces deux voies.

d) STAT3 est impliqué dans la transformation cellulaire induite par Ras

La protéine Ras est mutée dans plus de 30 à 40% des tumeurs colorectales. Les mutations les plus fréquemment observées dans le cancer colorectal sont celles des codons 12 et 13.

Bien que des expériences précédentes indiquaient que la transformation cellulaire induite par Ras est indépendante de STAT3 (Bromberg et al., 1998), une publication récente démontre que la transformation oncogénique par l'oncogène Ras est dépendante de STAT3. Cependant, cette étude montre que cet effet ne dépend pas de la phosphorylation sur le résidu tyrosine ou de sa translocation nucléaire. La croissance en agar de cellules transfectées par ras est réprimée suite à l'inhibition de STAT3, cependant, la transfection d'un mutant de la tyrosine de STAT3 dans ces cellules restaure le pouvoir transformant de ras. Ces mutants qui ne peuvent pas être phosphorylés au niveau de la tyrosine 705 sont maintenus dans le cytoplasme et ne peuvent pas se fixer à l'ADN. L'accumulation nucléaire de STAT3 n'est donc pas nécessaire à la transformation induite par ras. Ces résultats indiquent que le phénomène observé est différent de celui impliqué dans la transformation induite par v-src. La mutation de STAT3 sur son résidu sérine 727 ou la perte du domaine C-terminal de STAT3 (STAT3 β) bloquent la transformation induite par Ras, confirmant le rôle de la phosphorylation de la sérine dans la réponse à Ras. Des expériences de fractionnement cellulaire ont permis de montrer que STAT3 située au niveau de la mitochondrie contribuait à la transformation cellulaire induite par Ras en augmentant l'activité de la chaîne de transport d'électrons des complexes II et V (Gough et al., 2009). Le facteur de transcription STAT3 est donc nécessaire au pouvoir transformant de ras, mais il semble que cet effet ne repose pas sur un dimère conventionnel mais sur des fonctions nouvelles reliées à la sérine 727.

- Implication de la phosphorylation de la sérine 727 de STAT3 dans la régulation de l'activité du facteur de transcription

Alors que le rôle de la phosphorylation de STAT3 sur la tyrosine 705 est à présent bien connu, celui de la sérine S727 reste encore à être approfondi. L'inhibition de cette phosphorylation entraîne une perte du recrutement des histones acétyltransférases CBP/p300 et diminue l'acétylation des gènes activés par STAT3 (Schuringa et al., 2001) (Zhao et al., 2004). Cette phosphorylation semble donc être importante pour l'activité transcriptionnelle de STAT3. Des expériences de gènes rapporteurs ont permis de montrer que la sérine S727 permettait une activité transcriptionnelle maximale de STAT3 mais n'intervenait pas dans la fixation du facteur de transcription sur l'ADN (Wen and Darnell, 1997; Wen et al., 1995).

Des expériences menées chez des souris où STAT3 a été muté par substitution du résidu sérine par une alanine (S727A) (allèle SA) entraîne une réduction de moitié de l'activité transcriptionnelle de STAT3 dans les fibroblastes embryonnaires (Shen et al., 2004) cependant les souris sont viables. D'autres travaux soulignent que cette phosphorylation pourrait être associée à un rétrocontrôle de l'activité transcriptionnelle de STAT3 en inhibant la phosphorylation du résidu Tyrosine 705 et donc la liaison à l'ADN (Chung et al., 1997).

La phosphorylation de la sérine S727 pourrait permettre au facteur de transcription de se fixer sur l'ADN grâce à son association avec d'autres protéines comme par exemple NF-κB (Yang et al., 2007) (Yoshida et al., 2004).

Ceci laisse à penser que STAT3 peut être à l'origine de nombreux programmes de transcription qui dépendent de son état de phosphorylation. En plus de son caractère oncogénique quand STAT3 est phosphorylé sur la tyrosine 705, il se pourrait que la forme phosphorylée sur la sérine ait aussi un rôle dans le développement tumoral.

a) STAT3 peut entraîner la transcription de gènes sans être phosphorylée sur la tyrosine 705

Des études ont déjà montré que STAT3 était capable de se fixer au niveau de l'ADN en absence d'une phosphorylation sur la tyrosine 705 (Yang et al., 2005) (Yang and Stark, 2008) et qu'il pouvait induire l'expression de certains gènes en l'absence de phosphorylation sur la tyrosine. En effet, la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine est observée après des stimulations à l'insuline, au GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, and interleukin-3) et à l'interleukine 3 en absence de phosphorylation sur la tyrosine 705 (Ceresa and Pessin, 1996) (Decker and Kovarik, 2000). Des mutants de STAT3 qui ne peuvent pas être phosphorylés sur le résidu tyrosine 705 ont été transfectés dans des cellules épithéliales humaines. L'analyse des gènes transcrits suite à ces transfections a permis de mettre en évidence que STAT3 lorsqu'il n'est pas phosphorylé sur son résidu tyrosine 705 possède une activité transcriptionnelle. STAT3 lorsqu'il n'est pas phosphorylé peut induire la transcription des gènes qui codent pour cdc2, la cycline B1, mras, et E2F-1 (Yang et al., 2005), protéines qui sont surexprimées dans les cancers du colon. En 2007, la même équipe décrit qu'une stimulation par l'IL-6 entraîne une induction de l'activation de STAT3 par phosphorylation de son résidu sérine. STAT3 va alors permettre d'activer ses gènes cibles incluant notamment le sien. Ceci a pour conséquence l'accumulation d'une forme non

phosphorylée de STAT3 qui entraîne la transcription des gènes codant pour RANTES, IL-6, IL-8, MET, et MRAS. Or ces gènes ne possèdent pas de séquences consensus pour la fixation du dimère de STAT3 mais pour le facteur NF- κ B. Ces travaux montrent qu'une accumulation de STAT3 entraîne la transcription de gènes par l'intermédiaire d'une liaison avec NF κ B, ceci même si ces gènes ne possèdent pas de sites consensus pour STAT3 (Yang et al., 2007).

Dans des tumeurs prostatiques la phosphorylation de la sérine S727 est suffisante pour activer STAT3 et conduire à la tumorigénèse en absence de la phosphorylation de la tyrosine 705 (Qin et al., 2008). De plus, il a été montré que STAT3 était phosphorylé sur la sérine 727 suite à l'activation du récepteur TrkA par le NGF dans des cellules PC12. Bien qu'il ne soit pas phosphorylé sur la tyrosine, le facteur de transcription peut se lier à l'ADN, et la perte de la phosphorylation de STAT3 sur le résidu sérine grâce à un inhibiteur des récepteurs TrkA, le K252a, entraîne une diminution de son activité transcriptionnelle. De plus, la surexpression d'un mutant de STAT3 sur son résidu sérine bloque l'activation de la transcription des gènes induits par une stimulation au NGF. La perte d'expression de STAT3 suivie d'une stimulation par le NGF aboutit à une réduction de l'expression de Egr1 et junB et la cycline D1, ce qui permet de penser que cette phosphorylation sur la sérine est suffisante pour activer les gènes en réponse à cette stimulation (Ng et al., 2006).

Enfin, une autre équipe a montré en 2003 que la transcription du gène de Mcl-1 pouvait être induite par STAT3 phosphorylée sur son résidu 727 en absence d'une phosphorylation sur son résidu tyrosine 705, ceci suite à un traitement au sodium salicylate (Liu et al., 2003).

b) Les voies d'activation de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727

Diverses voies de signalisation vont permettre la phosphorylation de STAT3 sur la sérine S727. Cette phosphorylation peut être induite par la kinase p38 lors d'une transformation cellulaire induite par v-src (Turkson et al., 1999) ou suite à l'activation de la voie MEK-ERK1/2 pour induire la croissance des neurites (Lin et al., 2009). D'un autre côté un traitement à l'IL-2 de cellules T va aussi conduire à cette phosphorylation de STAT3 mais cette fois-ci, médiée par la kinase Erk (Ng and Cantrell, 1997). La protéine mTor peut elle aussi phosphoryler STAT3 dans les neuroblastomes suite à une activation au CNTF (Yokogami et al., 2000). De plus la voie de la PKC δ est associée à la phosphorylation de ce résidu sérine après une stimulation à l'IL-6 (Jain et al., 1999). Il a été montré que ceci permettait de réguler l'activité transcriptionnelle de STAT3 et l'invasion cellulaire médiée

dans les tumeurs colorectales (Aziz et al.). Enfin, les jun kinases (JNK) peuvent aussi être impliquées dans la phosphorylation de la Serine 727 (Decker and Kovarik, 2000). Dans le laboratoire, une augmentation de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 a aussi été montrée après traitement de cellules par un inhibiteur des topoisomères I (Vigneron et al., 2008) sans que la kinase responsable de cette phosphorylation ne soit identifiée. Plus récemment, il a été montré que la kinase cdk5 pouvait être responsable de la phosphorylation de STAT3 au niveau de la sérine 727 dans le cerveau et dans les muscles (Fu et al., 2004).

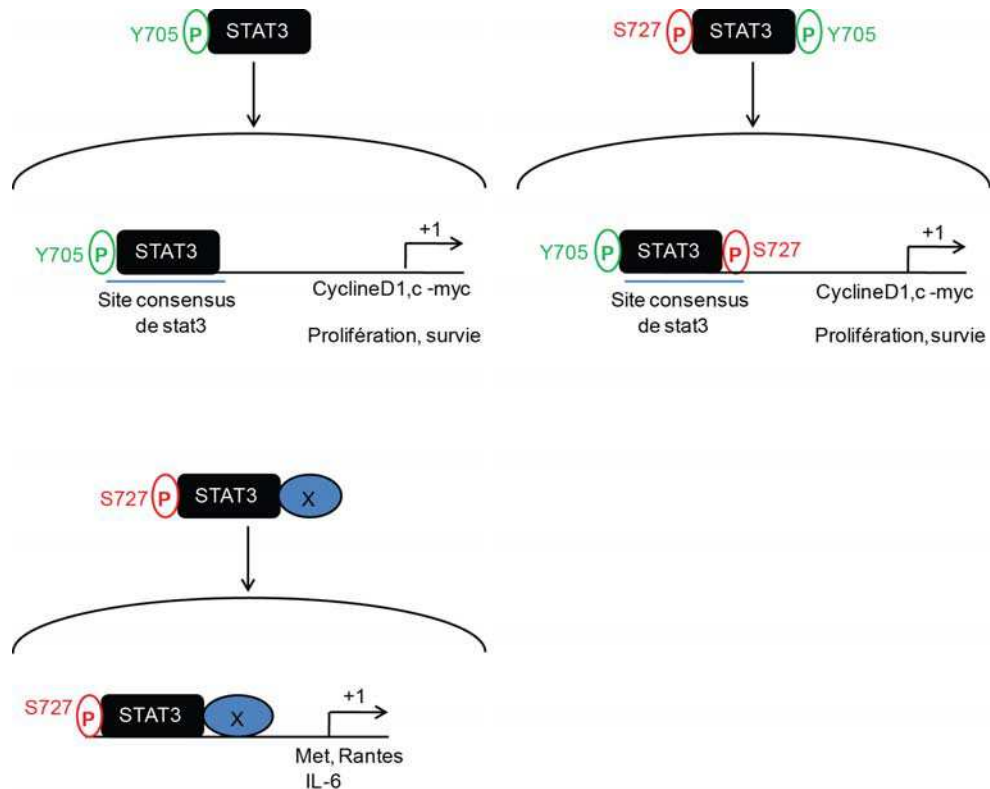


Figure 15 | Représentation de l'activité transcriptionnelle de STAT3

La phosphorylation de la tyrosine 705 suite à la fixation de ligands sur des récepteurs de croissance entraîne la dimérisation de STAT3 et l'activation de ses gènes cibles connus comme la cycline D1 ou myc.

La phosphorylation de la tyrosine 705 associée à celle de la sérine 727 entraîne une activité transcriptionnelle maximale du facteur de transcription. Ceci permet une transcription des gènes comme la cycline D1, la survivine, bcl-xl ou bien JunB qui sont impliqués dans la transition G0/G1 ou la survie.

STAT3 phosphorylée seulement sur la sérine 727 régule de nouveaux gènes cibles peut être en association avec un partenaire (X). STAT3 a pu être retrouvé sur le promoteur de nouveaux gènes comme RANTES, IL6, IL8, MET, et MRAS ne possédant pas de sites consensus de STAT3. Lorsque STAT3 n'est pas phosphorylée sur la tyrosine, il semble pouvoir se lier à des partenaires comme NFkB pour initier la transcription. Cependant, dans les publications, seule la fixation de la forme totale du facteur de transcription est analysée sur les promoteurs des gènes. Il est donc difficile de savoir dans ces conditions si STAT3 est phosphorylé uniquement sur la sérine ou sur les deux résidus, sérine et tyrosine.

Les deux sites de phosphorylation de STAT3 semblent donc réguler l'activité transcriptionnelle de STAT3 (Figure 15). Chaque phosphorylation pourrait permettre

l'activation de gènes spécifiques avec des partenaires différents. Suite à l'activation par des oncogènes, STAT3 est phosphorylée sur son résidu tyrosine 705, pour induire le développement tumoral, en favorisant la prolifération et la survie cellulaire. Lorsque le facteur de transcription est phosphorylé sur son résidu sérine 727, il va pouvoir induire la transcription de nouveaux gènes cibles et intervenir notamment dans le développement des tumeurs prostatiques. Cette phosphorylation est aussi nécessaire à la transformation des cellules par ras. Mieux comprendre l'implication de la phosphorylation du résidu sérine 727 sur la régulation de l'activité transcriptionnelle de STAT3 est donc un enjeu important dans le traitement du cancer.

PARTIE IV : TRAITEMENT ANTITUMORAL DANS LES CCRs, LES INHIBITEURS DE TOPOISOMERASE DE TYPE I

Dans les CCRs, l'activation des oncogènes comme la β -caténine, myc ou STAT3 et la perte des gènes suppresseurs de tumeurs comme APC et p53 vont entraîner une prolifération cellulaire incontrôlée. Les thérapies anti-tumorales visent à réduire cette prolifération, soit en stimulant l'apoptose, soit en entraînant l'entrée en sénescence des cellules. Dans le traitement des cancers colorectaux, l'une des drogues utilisée en chimiothérapie est l'irinotécan. Ce médicament qui dérive des camptothécines est un inhibiteur des topoisomérases de type I. Il occasionne dans la cellule des dommages de l'ADN en s'intégrant dans la cellule au moment de la réplication et va entraîner un arrêt de la prolifération cellulaire.

A) Les topoisomérases de type I

Les topoisomérases sont des enzymes qui occasionnent des coupures transitoires de l'ADN. Elles jouent un rôle essentiel lors de nombreuses activités cellulaires comme la réplication, la transcription ou encore la séparation des chromosomes. Il existe deux grandes classes de topoisomérases. Les topoisomérases de type I qui occasionnent des coupures simple brin de l'ADN et les topoisomérases de type II qui elles entraînent la formation de cassures doubles brin et qui nécessitent la présence de l'ATP. Les topoisomérases sont des protéines conservées au cours de l'évolution et leur extinction chez la souris est létale (Morham et al., 1996).

Lors de la transcription ou de la réplication, pour l'avancée des complexes protéiques, il est nécessaire de séparer les deux brins de la double hélice d'ADN de manière transitoire. Or les extrémités de l'ADN sont reliées à la matrice nucléaire, il est donc impossible pour l'ADN d'effectuer une rotation pour soulager le super-enroulement. Les topoisomérases de type I interviennent pour relâcher cette tension au moment de la réplication et de la transcription lorsque l'ADN est surenroulé (Cheng et al., 1998). Les topoisomérases I agissent suite à l'action des hélicases qui vont séparer les deux brins de l'ADN. L'enzyme se fixe de manière covalente à l'ADN et va entraîner la coupure d'un des deux brins d'ADN par transestérification. L'enzyme peut se lier à l'extrémité 3' qui vient de se former. Le brin d'ADN

libre va pouvoir effectuer des rotations autour du brin fixe. Cette rotation se fait librement et sans apport d'énergie. Ceci permet la relaxation de l'ADN. Il est ensuite nécessaire de religater le brin d'ADN par une réaction de trans-esthérification (Figure 16).

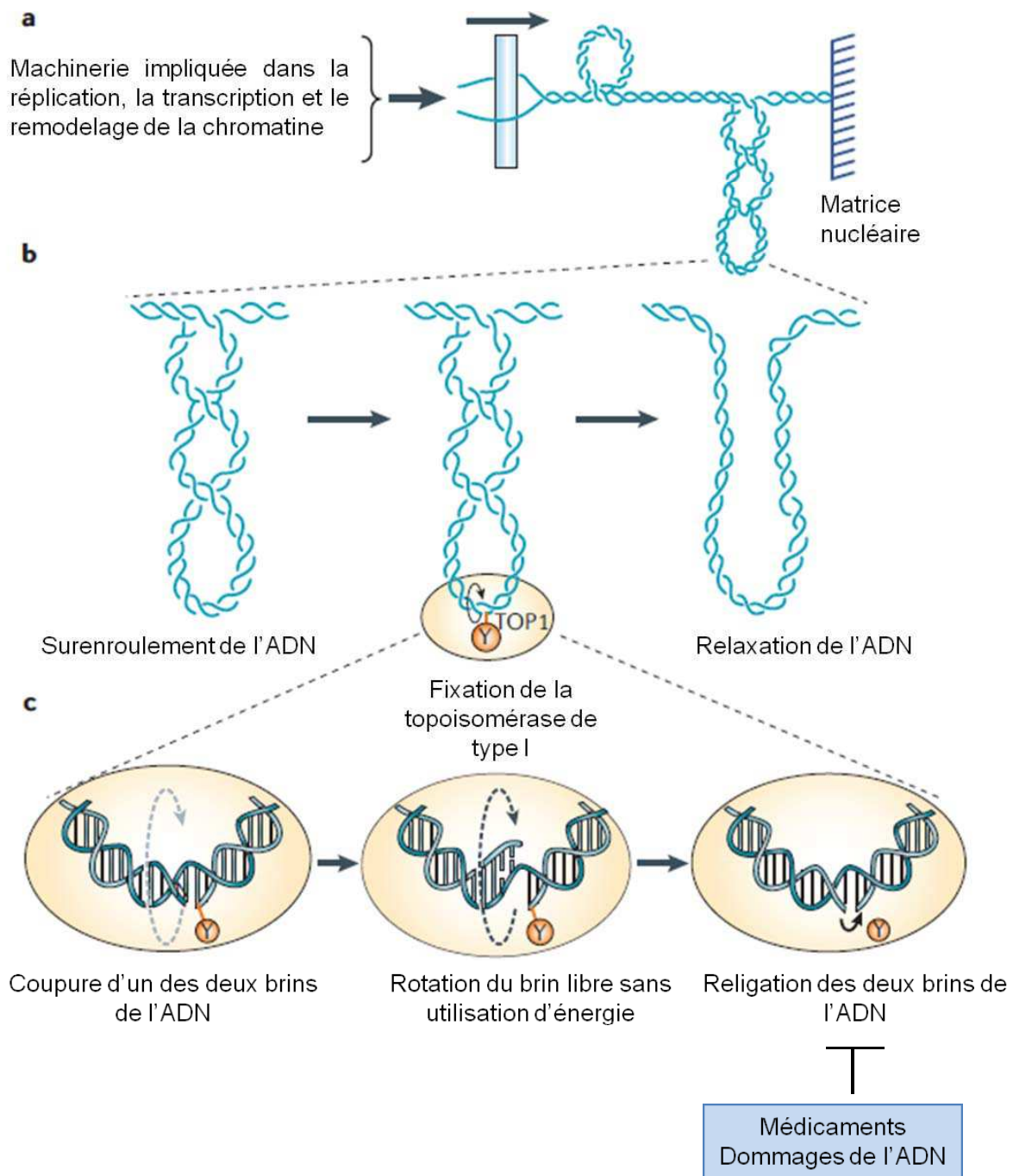


Figure 16 | Les topoisomérases de types I

Rôle des topoisomérases dans les phénomènes de relâchement des surenroulements de l'ADN induits lors de la réplication (Pommier, 2006).

B) Les inhibiteurs de topoisomérase de type I

La Camptothécine (CPT) est un alcaloïde issu d'une plante identifiée pour la première fois en Chine par Monroe Wall (Wall et al., 1976). Elle provient d'un arbre chinois *Camptotheca acuminata*.

Deux dérivés solubles dans l'eau ont été issus des camptothécines, le Topotécan et l'Irinotécan. Le Topotécan (Hycamtin®) est utilisé pour traiter plus particulièrement les cancers ovariens et les cancers du poumon à petites cellules. Le deuxième dérivé, l'Irinotécan ou CPT-11, une pro-drogue qui doit être convertie en Sn38, son métabolite actif, est utilisé pour les tumeurs colorectales. Différentes études montrent que la majeure partie de cette conversion se déroule dans le foie (Figure 17).

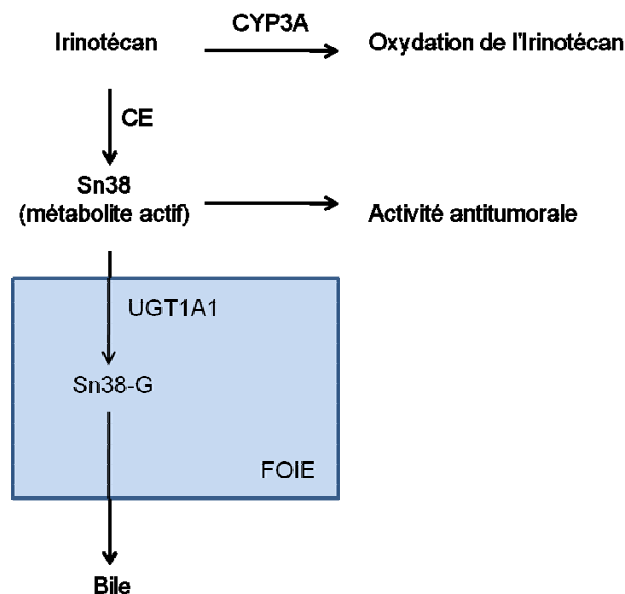


Figure 17 | Métabolisme de l'Irinotécan

Une fois administré, l'Irinotécan est métabolisé dans le foie ce qui entraîne la formation du composé actif, le Sn38 qui possède une activité antitumorale 1000 fois supérieure à celle du CPT-11.

La première étape permet de transformer l'Irinotécan en Sn38 grâce à une réaction de carboxylestérase. Le Sn38 ainsi obtenu est cent à mille fois plus efficace que le CPT-11. Mais seulement 2 à 5% du CPT-11 administré sera métabolisé en Sn38. Le reste sera rapidement dégradé (Kawato et al., 1991). L'Irinotécan est très souvent administré en association avec un autre anti-cancéreux comme le 5-Fluoro-Uracile (5-Fu). En effet la combinaison des deux drogues améliore l'efficacité du traitement (Saltz et al., 2000).

Les inhibiteurs de topoisomérase stabilisent le complexe ADN-topoisomérase I et empêchent la religation du brin de l'ADN. Ce complexe topoisomérase I-ADN-Sn38 appelé complexe ternaire est stabilisé par un ensemble de ponts hydrogènes entre l'inhibiteur et l'ADN d'une part et l'inhibiteur et la topoisomérase I d'autre part, ce qui entraîne un retard de la religation. Lorsque le replisome (ADN polymérase et hélicase) va rentrer en collision avec ce complexe, il va se décrocher (Pommier et al., 2003). Les fourches de réplication vont alors s'effondrer en libérant une extrémité double brin qui va être reconnue spécifiquement comme cassure de l'ADN par des endonucléases tel que Mus81-Eme1, capable de cliver la branche d'ADN liée à la topoisomérase (Pommier et al., 2003). La toxicité du Sn38 n'apparaît qu'au moment de la phase S lors de la réplication de l'ADN. L'inhibition des topoisomérases de type I au sein de la cellule entraîne la formation de cassures simple puis double brin et une réplication incomplète qui est alors stoppée. Nous avons vu que les topoisomérases interviennent aussi dans la transcription. De la même manière, la génération des cassures de l'ADN va entraîner le décrochage de l'ARN polymérase. La cassure simple brin associée au complexe ternaire est réparée le plus souvent de manière efficace par le système de réparation couplé à la transcription permettant le redémarrage de la transcription (Desai et al., 2003).

C) Les dommages de l'ADN en réponse à l'irinotécan

La cellule va activer, après la détection des dommages, les protéines intervenant dans la réparation de l'ADN. La présence d'une longueur non négligeable d'ADN simple brin va entraîner l'activation des systèmes de réparation qui vont être capables d'éliminer le complexe ternaire, avant même l'apparition des cassures double brin de l'ADN. La réparation des cassures doubles brins n'est réalisée qu'ensuite et de manière indirecte et n'est possible qu'au cours de la phase S et G2 grâce à la présence de la chromatide sœur.

1. Dommages de l'ADN lors de la réplication

Dans la cellule, il existe deux voies de détection majeure des dommages de l'ADN. La voie ATM/Chk2 et ATR/chk1. La voie impliquant la kinase ATM est plus principalement impliquée dans la détection des coupures double brin de l'ADN alors que le système ATR intervient lors de coupure simple brin et lors d'une phase S normale. Les protéines ATR/ATM sont des kinases essentielles à l'activation du point de contrôle ainsi qu'à l'induction des systèmes de réparation ou de l'apoptose

- Détection des cassures : activation de la voie ATM

Les cassures d'ADN entraînent une modification de la topologie de l'ADN qui va permettre le recrutement du complexe MNR au niveau du site de cassure. Ce complexe est composé de la protéine Nbs1 qui forme un hétérodimère avec Mre11 et Rad50 (complexe MRN) et entraîne la formation des foci avec H2AX au niveau de la liaison double brin (Petrini, 2000) (Gatei et al., 2000). La fixation du complexe MRN au niveau du site de coupure recrute et active ATM qui va alors pouvoir phosphoryler Nbs1 (Lim et al., 2000) (Zhao et al., 2000) (Gatei et al., 2003). ATM est une protéine de 350 kDa appartenant à la famille des PIKKs (Phosphatidil-Inositol 3 Kinase like Kinase). En condition normale, l'activité de la kinase est peu détectable, elle augmente en revanche lors de l'induction de cassures double brin suite à la modification de topologie de l'ADN. La phosphorylation sur la sérine 1981 de ATM se traduit par la dissociation des dimères présents en conditions normales. Ensuite, les monomères d'ATM vont pouvoir interagir avec d'autres protéines au niveau du site de la liaison (Bakkenist and Kastan, 2003). L'activation d'ATM permet la phosphorylation de l'histone H2AX sur son résidu sérine 139, de la kinase chk2, de BRCA1, de Nbs1 (Nijmegen breakage syndrome 1), ou encore de p53 (Banin et al., 1998) (Canman and Lim, 1998) (Figure 18).

- Détection des cassures : activation de la voie ATR-ATRIP/Chk1

L'action de divers nucléases entraîne la résection d'une des extrémités de la cassure entraînant alors l'apparition de cassures simple brin. Ceci permet l'activation de la voie de signalisation impliquant ATR qui est localisée au site de cassure de l'ADN par l'intermédiaire de la protéine RPA2. RPA2 forme un hétérotrimère avec RPA1 and RPA3, et est nécessaire à la stabilisation de l'ADN simple brin durant la réplication et la réparation (Pommier, 2006). Cette phosphorylation de RPA2 apparaît une heure après le traitement aux camptothécines et persiste après l'arrêt de la synthèse d'ADN laissant penser que cette protéine peut avoir un rôle dans le point de contrôle de la réplication. La phosphorylation de RPA2 va permettre le recrutement de la protéine ATR et forme le complexe ATR/TRIPP (Figure 18). La protéine TopBP1 va alors se fixer sur ATR et l'activer.

L'activation de ATR et ATM permet le recrutement des complexes MRN et des RecQ hélicase BLM et de BRCA1, protéines nécessaires à la recombinaison homologue (Wold, 1997). Le recrutement de BRCA2 par les protéines BRCA1 permet le chargement de la protéine Rad51 et sa nucléation autour de l'ADN pour permettre la recombinaison homologue (Pommier et al., 2003).

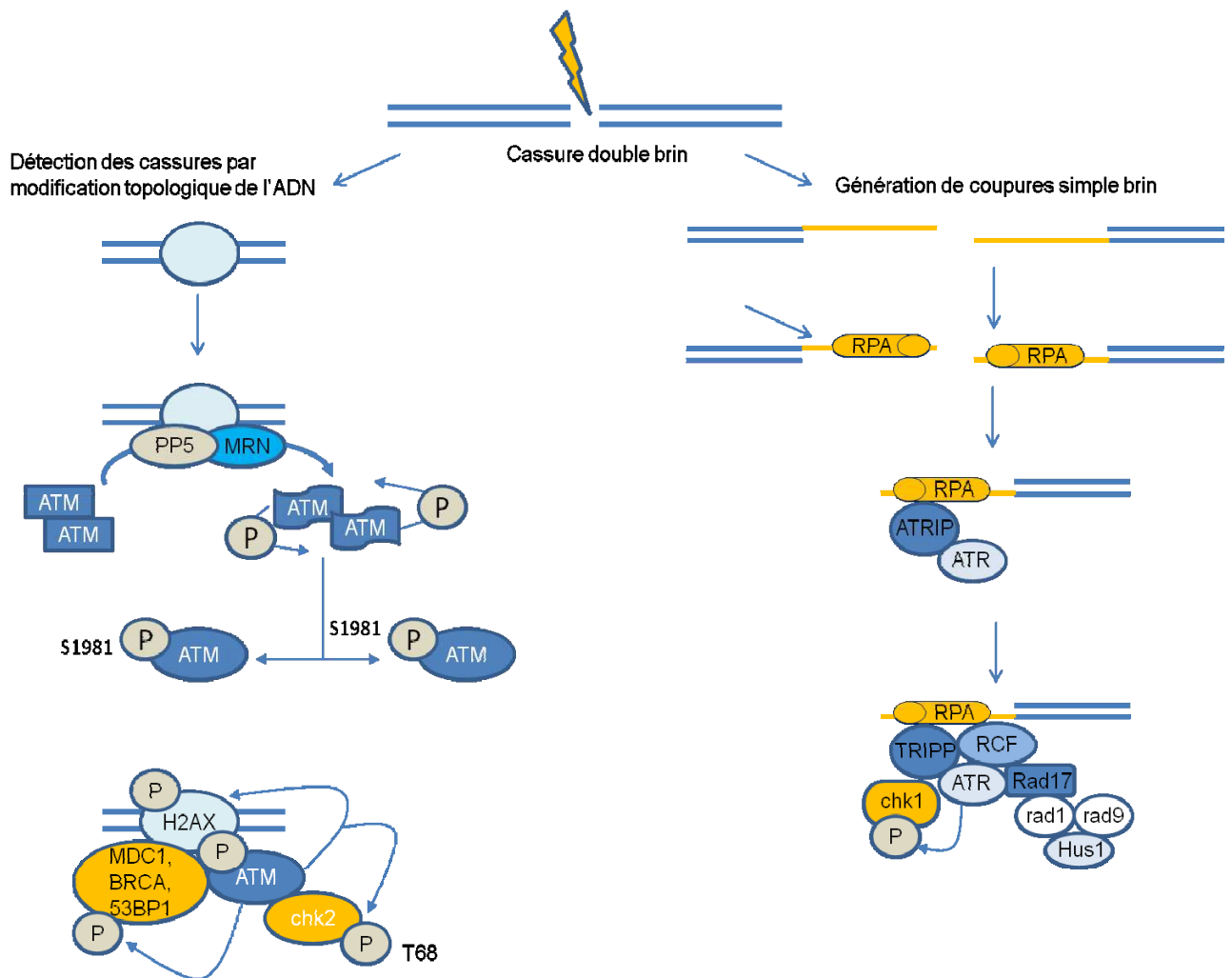


Figure 18 | Activation de la réparation des dommages de l'ADN

Suites aux dommages de l'ADN induits par le Sn38, les kinases ATM/ATR vont être activées pour entrainer la réparation des cassures.

Le changement de topologie de l'ADN au niveau des cassures double brin permet le recrutement du complexe MRN. Les protéines ATM initialement sous formes de dimères vont être phosphorylées sur le résidu sérine 1981 entraînant la dissociation des dimères. Cette activation de ATM permet le recrutement de H2AX, de chk2 de BRCA1 et de TP53.

Au niveau des cassures simple brin, la présence d'un long brin d'ADN entraîne le recrutement de la protéine RPA qui à son tour recrute le complexe ATRIP/ATR. La kinase chk1 va alors être phosphorylée par la kinase ATR puis la voie Rad17/Rad9/hUS1/hRad1 va être activée (Zou and Elledge, 2003).

- Implication de chk1 et chk2 dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire

En réponse aux cassures doubles brins, ATM phosphoryle Chk2, dans son domaine de régulation localisé en N-terminal, sur la thréonine 68 (Ahn et al., 2000). Cette phosphorylation entraîne l'homodimérisation (Schwarz et al., 2003) et l'autophosphorylation de Chk2. Chk1 est un substrat à la fois pour ATR (Zhao and Piwnica-Worms, 2001) mais également pour ATM. Ces deux protéines ciblent les sérines 317 et 345 de Chk1. L'activation des voies ATM/ATR et chk1/chk2 inhibe les phosphatases cdc25A qui permettent la progression du cycle cellulaire (Donzelli and Draetta, 2003). Aux transitions G1/S et G2/M, cdc25 permet de supprimer la phosphorylation inhibitrice des complexes cycline/cdk, au niveau de la tyrosine 15 dans la boucle ATP de cdk1 et cdk2. Suite à la phosphorylation de chk1, cdc25A va être phosphorylée sur la sérine 216 ce qui aboutit à sa dégradation (Donzelli and Draetta, 2003) par le complexe E3 ubiquitine ligase β TRCP (Jin et al., 2003). Chk1 a aussi la capacité de phosphoryler les phosphatases cdc25B et cdc25C. Ces phosphorylations aboutissent à la séquestration des phosphatases dans le cytoplasme des cellules par l'intermédiaire de la protéine 14.3.3 (Zeng and Piwnica-Worms, 1999). Au final, les complexes cyclineB-cdk1 vont être inhibés et l'entrée en mitose sera stoppée. L'inhibition des protéines cdc25A au cours de la phase S permet à la cellule de stopper la réplication de l'ADN. Ceci diminue le nombre de collisions entre la fourche de réplication et les complexes ternaires.

2. Activation de p53 suite à l'inhibition des topoisomérases de type I

En parallèle des phosphatases cdc25, les inhibiteurs de topoisomérases de type I régulent également la voie p53/p21 (Pommier et al., 2006).

Suite aux dommages de l'ADN, les protéines H2AX et p53 vont être recrutées au niveau des foci (Al Rashid et al., 2005). Les kinases chk1 et chk2 vont phosphoryler p53 au niveau de la sérine 20 entraînant un arrêt du cycle cellulaire (Chehab et al., 1999). Cette phosphorylation de p53 est critique car elle entraîne la dissociation du complexe Hdm2/p53 et empêche l'ubiquitination de la protéine et induit sa stabilisation.

Les kinases ATM/ATR vont pouvoir phosphoryler p53 au niveau de sa sérine 15 (Lavin and Gueven, 2006) qui ne permettrait pas directement la stabilisation de la protéine mais serait nécessaire à la phosphorylation d'autres résidus de p53 (Al Rashid et al., 2005). Elle entraînerait notamment la phosphorylation de la sérine 46, localisée dans le domaine de transactivation de p53 qui semble être impliquée dans l'activation de l'apoptose (Feng et al., 2006) et dans l'acétylation du domaine C-terminal de p53 sur les résidus lysine 320 et 386.

Les phosphorylations de p53 permettent de stabiliser la protéine sur des promoteurs de faible affinité comme ceux des gènes proapoptotiques tel que celui de p53AIP1 (Oda et al., 2000). Chk1 peut également phosphoryler p53 sur les sérines 6 et 9 et sur la thréonine 18 (nécessitant préalablement la phosphorylation de p53 sur la serine 15) (Sakaguchi et al., 2000) (Higashimoto et al., 2000). Cette fois l'activation de p53 va passer par une régulation de sa dégradation. Les phosphorylations empêchent la liaison de Mdm2 avec p53 et entraînent l'activation des gènes cibles de p53 (Andreassen et al., 2001).

L'activation de p53 suite aux dommages de l'ADN et ses différentes modifications post traductionnelles semblent être déterminantes pour la fixation de p53 sur ses promoteurs cibles (Webley et al., 2000). L'activation de p53 et de p21 induit ensuite les points de contrôle et l'apparition du phénotype assimilable à la sénescence (Bhonde et al., 2006).

Projet de Thèse

STAT3 est un facteur de transcription impliqué dans le développement des tumeurs colorectales. Ses nombreuses fonctions suite à la phosphorylation du résidu tyrosine 705 permettent l'activation de la prolifération et la survie cellulaire et suggèrent que cette protéine est impliquée à la fois dans la transformation cellulaire et dans l'échappement aux traitements classiques de chimiothérapie. Cependant, le rôle de la phosphorylation de STAT3 sur le résidu sérine 727 a été peu étudié en réponse à ces traitements. Les agents génotoxiques comme le Sn38 provoquent des dommages de l'ADN qui induisent un arrêt du cycle cellulaire associé à l'activation de l'apoptose ou de la sénescence. Au cours du développement tumoral, les cellules vont altérer ces différentes voies, ce qui entraîne une résistance au traitement. Mieux comprendre les mécanismes de résistance au traitement est actuellement un enjeu dans le développement des thérapies. Une étude réalisée au laboratoire par Arnaud Vigneron a permis de mettre en avant l'activation de STAT3 suite à l'utilisation de l'agent génotoxique, Sn38, ainsi qu'une résistance au traitement, mais la kinase responsable de cette phosphorylation n'avait pas été mise en évidence. Durant ma thèse, je me suis intéressée à l'implication de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 dans la réponse aux inhibiteurs de topoisomérase de type I. Puis, j'ai cherché à caractériser l'implication de cette phosphorylation dans la résistance au traitement.

Dans un premier temps, j'ai cherché à connaître les kinases impliquées dans la phosphorylation de STAT3, puis à analyser les cibles transcriptionnelles du facteur de transcription après un traitement des cellules au Sn38. Après l'identification de la kinase et des cibles de STAT3, nous avons cherché à comprendre l'implication de la voie de signalisation dans les phénomènes de résistance.

Dans un second temps, les inhibiteurs de topoisomérase bloquant les cellules en phase G2/M du cycle cellulaire, nous nous sommes intéressés à la régulation par STAT3 des gènes impliqués dans cette transition cellulaire. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la régulation de la kinase Aurora A qui est impliquée dans la duplication des centrosomes et qui peut être surexprimée dans les cancers colorectaux.

Pour finir, nous savons que le facteur de transcription STAT3 peut s'associer à d'autres protéines comme NFkB, pour activer la transcription de nouveaux gènes cibles. Nous avons cherché à caractériser ces nouveaux partenaires suite à cette phosphorylation du résidu

sérine grâce à deux techniques, celle du double hybride et la spectrométrie de masse en tandem. Après leur mise en évidence, nous avons cherché à comprendre leur implication dans les systèmes de résistance aux inhibiteurs de topoisomérase.

Résultats

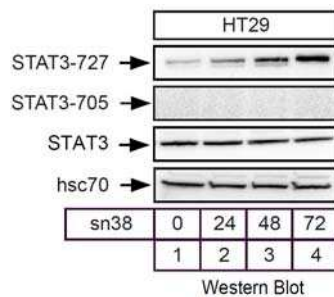
Partie I :

La kinase cdk5 régule le facteur de transcription STAT3 pour réduire les dommages de l'ADN induits par l'inhibiteur de topoisomérase I, le Sn38

1. Le traitement des cellules HT29 par le Sn38 induit la phosphorylation de STAT3 sur le résidu sérine 727

Alors que le rôle de la phosphorylation de STAT3 sur le résidu tyrosine 705 est à présent bien connu celui de la sérine reste encore à être approfondi. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 dans la réponse de cellules d'adénocarcinome de cancers colorectaux traités par le Sn38, l'inhibiteur de topoisomérase de type I. Nous avons observé par des expériences de western-blot une induction de la phosphorylation de STAT3 sur son résidu 727. Cette phosphorylation atteint un maximum d'expression au bout de 72h de traitement (figure 19, ligne 1-4) puis décline à partir de 96h d'inhibition des topoisomérases (figure 26, ligne 5). Les cellules HT29 exprimant une forme mutée de p53, cette phosphorylation de STAT3 sur la sérine est donc indépendante de la voie de p53. De plus, aucune phosphorylation d'Erk n'a été constatée suite à l'inhibition des topoisomérases. Elle est donc aussi indépendante de la voie des MAP kinases. Après traitement des cellules avec du Sn38, nous n'avons observé aucune phosphorylation de STAT3 sur la tyrosine 705 même après 72h de traitement (figure 19, lignes 1-4).

A.



B.

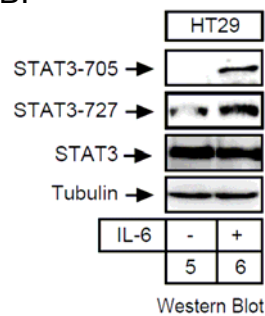


Figure 19 | STAT3 est phosphorylée sur son résidu 727 et non sur le résidu tyrosine 705 après l'inhibition des topoisomérases

A. Les cellules HT29 sont traitées avec du Sn38 (5ng/ml) durant le temps indiqué. Suite à la stimulation, la phosphorylation de STAT3 a été analysée par western blot en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la forme totale de STAT3, la forme phosphorylée sur la sérine 727 et la tyrosine 705 de STAT3 et dirigés contre hsc70 comme contrôle de charge (n=5).

B. Les cellules sont cultivées dans un milieu déplété en sérum pendant 2 jours et stimulées à l'IL-6 (20ng/ml) pendant 30 min. L'activation de STAT3 a été analysée par western blot avec des anticorps dirigés contre les deux formes phosphorylées et la forme totale de la protéine (n=2).

A l'inverse, une stimulation des cellules HT29 avec de l'interleukine 6 a entraîné l'induction de la phosphorylation de STAT3 sur les résidus sérine et tyrosine (Figure 19, lignes 5-6). De plus, nous avons remarqué grâce à des expériences de co-immunoprécipitation

que le facteur de transcription était phosphorylé sur ses deux résidus. Le traitement au Sn38 entraîne donc une phosphorylation uniquement du résidu sérine 727 contrairement à la stimulation par de l'interleukine 6.

Nous avons pu noter que le traitement des cellules par le Sn38 entraîne une perte de la prolifération cellulaire. En effet, des expériences de clonogénécité ont montré une perte de la formation de colonies après traitement. De plus, des expériences de cytométrie en flux ont permis de mettre en évidence que le traitement induisait un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. L'étude des profils de FACS, nous a permis d'observer que les cellules rentraient en apoptose suite à 72h de traitement. Les mêmes résultats ont été observés sur un autre type cellulaire, les cellules HCT116 qui ne possèdent pas d'inactivation de la voie p21/p53. Ces cellules rentrent en sénescence suite au traitement, ceci a été observé par l'étude des micronoyaux et par une augmentation de l'expression de la β -galactosidase. La phosphorylation n'est donc pas due à l'activation de l'apoptose.

Il est intéressant de noter qu'en phase G2 du cycle cellulaire, nous avons observé par des analyses de cytométrie en flux une activation de STAT3 sur le résidu sérine. La phosphorylation sur la tyrosine n'est observée que suite à l'action de l'interleukine 6 et en phase G1 du cycle. En effet, l'activation de ce facteur de transcription est observée habituellement en début de phase G1 suite à la stimulation de la cellule avec des facteurs de croissance.

2. L'inhibition des topoisomérases entraîne l'induction de l'expression de la kinase cdk5

Dans la littérature, des chercheurs ont montré l'implication de la kinase cdk5 dans la phosphorylation de STAT3 au niveau de la sérine 727. Cdk5 participe aussi à l'acquisition du phénotype de sénescence des cellules (Alexander et al., 2004) (Yang and Hinds, 2006) et elle participe également à la réponse des cellules aux dommages de l'ADN (Tian et al., 2009). Nous nous sommes intéressés à son expression, à son activation et à son rôle dans la réponse des cellules lors de l'inhibition des topoisomérases. Nous avons observé par des expériences de western-blot une induction de l'expression de la kinase cdk5 suite au traitement. Comme pour la phosphorylation de STAT3, l'expression de cdk5 est maximale à 72h (Figure 20, piste 1-2) et diminue à 96h (Figure 26, piste 5). Afin de savoir si nous étions bien en présence d'une kinase activée, nous avons vérifié son interaction avec son co-activateur p35 et sa phosphorylation activatrice au niveau de la tyrosine 15. L'analyse par western-blot de l'expression de p35 n'a montré aucune variation après traitement (Figure 20, piste 1-2).

Cependant, des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de mettre en avant une induction de la liaison de cdk5 avec son activateur p35 après traitement au sn38 (Figure 20, lignes 3-6). En parallèle, nous avons montré une phosphorylation de cdk5 sur son résidu tyrosine 15 par western-blot. Ceci nous a permis de conclure que la kinase est activée par phosphorylation et qu'elle se lie à son partenaire p35 suite au traitement par l'inhibiteur des topoisomérases.



Figure 20 | La kinase cdk5 est activée suite aux dommages de l'ADN induits par le Sn38

A. Les cellules sont traitées au sn38 (5ng/ml) pendant 48 heures. Suite à la stimulation, les extraits totaux sont analysés par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre la kinase et contre son activateur p35 (lignes 1-2, n=5).

B. Suivant les mêmes conditions, une immunoprécipitation de p35 ou d'une IgG contrôle a été réalisée et le contact avec cdk5 a été analysée par western blot (lignes 3-6, n=3).

3. L'activation de cdk5 entraîne l'induction de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine

727

Nous avons pu remarquer que STAT3 était phosphorylée sur la sérine 727 suite au traitement et qu'en parallèle la kinase cdk5 était activée. Afin de vérifier que cdk5 était responsable de cette phosphorylation, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation de ces deux protéines pour vérifier leur interaction. Ces expériences nous ont permis de confirmer cette interaction. De plus, des expériences de pull down ont aussi été réalisées en immobilisant sur des billes de nickel des protéines de fusion STAT3 couplée à un tag histidine, ceci avec la forme totale de STAT3 ou seulement avec le domaine c-terminal de la protéine. Ces expériences ont mis en évidence suite aux dommages de l'ADN, une interaction de cdk5 et de STAT3 au niveau de sa partie c-terminal du facteur de transcription. Ceci confirme l'hypothèse suivant laquelle la kinase cdk5 pourrait phosphoryler le facteur de transcription STAT3 au niveau de la sérine 727 se trouvant dans le domaine c-terminal de la protéine.

Afin de déterminer si la kinase cdk5 pouvait phosphoryler STAT3 suite aux dommages de l'ADN induit par les topoisomérases, des expériences d'extinction de l'ARN messager de

cdk5 ont été réalisées dans les cellules HT29 avant et après traitement et l'expression de la phosphorylation de STAT3 a été analysée par western-blot. Nous avons observé que suite à l'inhibition de la kinase, la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine était diminuée (Figure 21, piste 1-4). La phosphorylation de STAT3 n'est pas complètement perdue, ce qui suppose que le facteur de transcription peut être phosphorylé par d'autres kinases ou que la protéine possède un temps de demi-vie plus long.

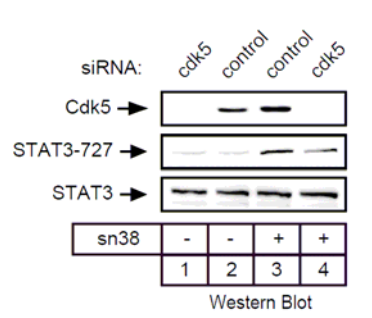


Figure 21 | cdk5 induit la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727

Les cellules HT29 ont été transfectées avec un siRNA spécifique de cdk5 ou un siRNA contrôle. L'expression de cdk5 et la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine 727 ont été analysées par western blot suite à un traitement au Sn38 pendant 48h (lignes 1-4, n=4).

L'inhibition de cdk5 n'a pas entraîné de perte de la phosphorylation de la sérine 727 en réponse à l'IL-6. Cdk5 n'est donc pas impliquée dans la phosphorylation de STAT3 en phase G1 du cycle. En parallèle, des expériences de kinase assay ont montré que cdk5 était bien responsable de la phosphorylation de STAT3 au niveau de la sérine S727. Des expériences de western-blot sur des lysats cellulaires issus des différentes fractions cellulaires, noyau, cytoplasme et chromatine ont permis de montrer qu'une fois phosphorylée sur son résidu sérine 727, STAT3 pourrait se fixer sur l'ADN. De plus, il est important de noter que cdk5 se retrouve dans la fraction nucléoplasmique après traitement. Dans ces conditions, p35 n'était pas détectable dans le noyau ni au niveau de la chromatine. P35 ne semble pas être importée dans le noyau suite à l'inhibition des topoisomérases.

4. Cdk5 régule l'expression des gènes cibles de STAT3 suite à l'inhibition des topoisomérases de type I

Nous avons voulu déterminer si cdk5 était impliquée dans la régulation des gènes cibles de STAT3 comme la cycline D1 ou myc. Suite à un traitement au Sn38, l'analyse de l'expression du taux de l'ARN messager par RT-QPCR et du taux de l'expression protéique

par western-blot de ces deux protéines a montré une répression de leur présence dans la cellule (Figure 22). Afin de vérifier la présence de STAT3 sur le promoteur de ses gènes cibles *myc* et *cycline D1*, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées suite au traitement. L'immunoprécipitation de ce facteur de transcription a permis de montrer un recrutement de STAT3 sous sa forme totale ou phosphorylée sur la tyrosine 705 sur le promoteur des deux gènes suite à une stimulation à l'interleukine 6 et que suite à un traitement au Sn38, STAT3 ne se fixait plus sur le promoteur de ces gènes. Aucune variation du recrutement de STAT3 phosphorylée sur la sérine 727 n'a été observée après inhibition des topoisomérases ou suite à une stimulation à l'interleukine 6. Pour vérifier l'implication de *cdk5* dans la perte de l'expression de la *cycline D1* et de *myc*, des expériences d'inhibition de *cdk5* ont été réalisées et le taux des ARN messagers de *myc* et de la *cycline* a été mesuré par PCR quantitative. Nous avons observé que la perte de *cdk5* limitait l'inhibition de la *cycline D1* et de *myc* induite par le Sn38 (Figure 22). *Cdk5* semble donc être responsable de la perte de la transcription des deux gènes cibles de STAT3. Nous avons ainsi mis en évidence que la phosphorylation de STAT3 sur le résidu sérine par *cdk5* était impliquée dans la perte de l'expression de la *cycline D1* et de *c-myc* après l'induction des dommages de l'ADN. *Myc* étant aussi une protéine impliquée dans l'induction de l'apoptose, il est possible de penser que l'induction de *cdk5* favorise l'entrée en sénescence plutôt que l'entrée en apoptose des cellules.

Ayant noté que STAT3 phosphorylée sur le résidu sérine se retrouvait au niveau de la chromatine après traitement, nous nous sommes intéressés à de nouveaux gènes cibles potentiels de STAT3 comme *Eme1*. Arnaud Vigneron avait montré que cette endonucléase était activée suite aux dommages de l'ADN induits par le Sn38. Dans notre modèle d'étude, nous avons confirmé par PCR quantitative qu'*Eme1* était plus exprimée suite à l'action du Sn38 sur les cellules (Figure 22). Afin de vérifier si *cdk5* intervenait dans la fixation de STAT3 sur le promoteur d'*Eme1*, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation de chromatine et d'extinction de l'expression de la kinase *cdk5*. Le traitement au Sn38 induit le recrutement de STAT3 phosphorylée sur la sérine 727 sur le promoteur d'*Eme1* et non après une stimulation à l'interleukine 6. La perte de l'expression de *cdk5* a entraîné aussi une perte de l'induction de l'expression d'*Eme1* après traitement (Figure 22).

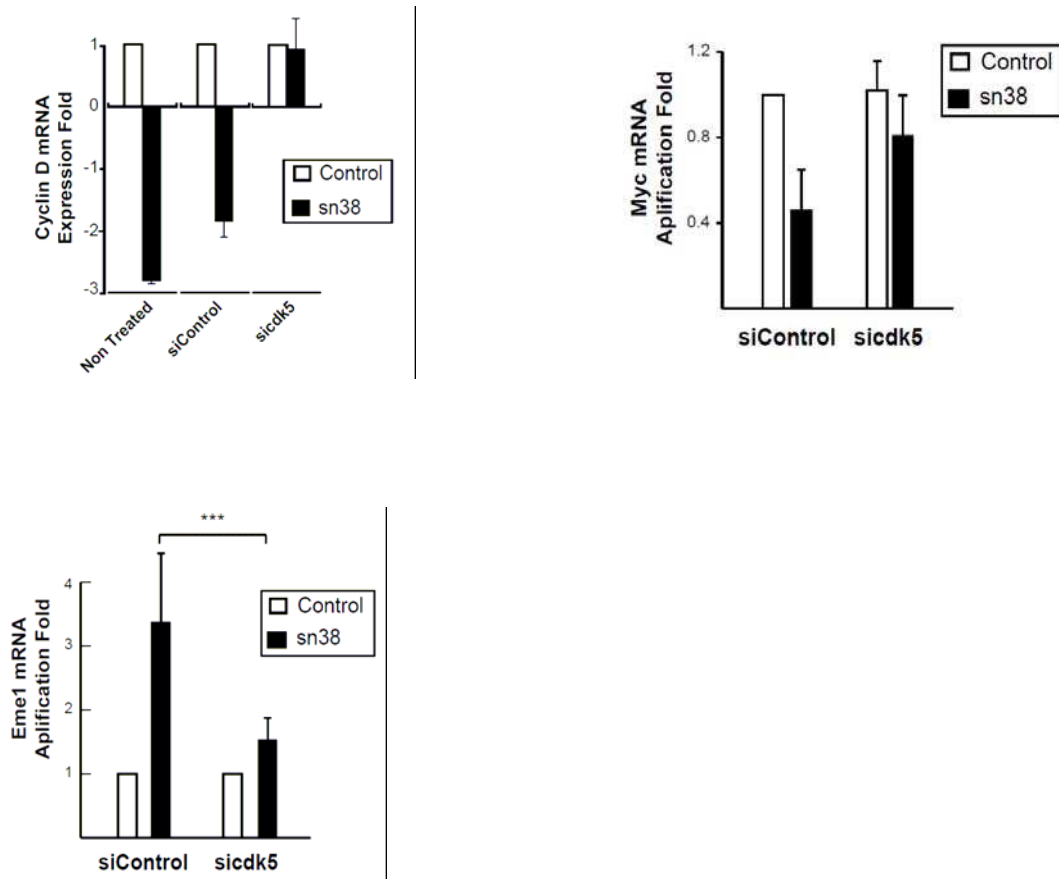


Figure 22 | Cdk5 est impliquée dans la perte de l'expression de la cycline D1 et c-myc et dans l'induction de Eme1

Les cellules HT29 sont traitées ou non au Sn38 (5ng/ml) pendant 48h et sont transfectées avec un siRNA de cdk5 ou un siRNA contrôle. L'ARN messenger de la cycline D1, de c-myc et de Eme1 a été analysé par RT-PCR quantitative (n=3).

5. Cdk5 intervient dans la régulation de la réponse aux dommages de l'ADN induits par le Sn38

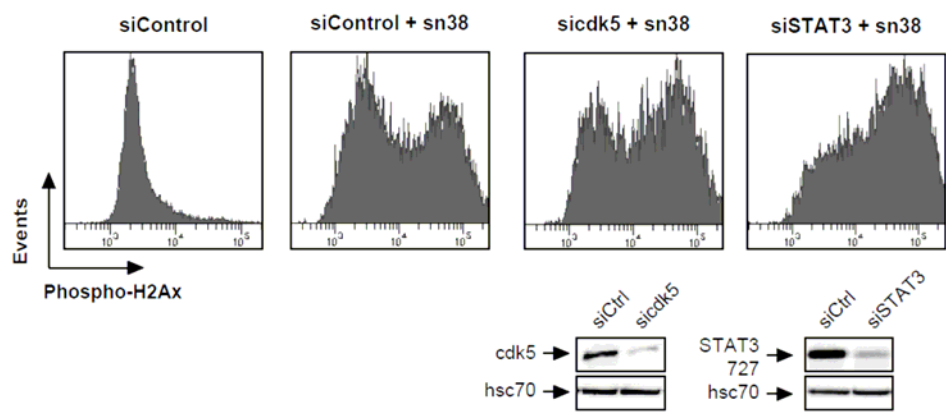


Figure 23 | La voie cdk5/STAT3 réduit les dommages de l'ADN

Les cellules HT29 ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre cdk5 ou STAT3 ou un siRNA contrôle pendant 48h à l'aide de l'agent de transfection, darmafect 2 (Dharmacon). Les cellules ont ensuite été traitées au Sn38 (5ng/ml) pendant 48h (Ce résultat est représentatif de 3 expériences).

Eme1 étant une endonucléase intervenant dans la réparation des dommages de l'ADN et la kinase cdk5 intervenant dans sa régulation, nous nous sommes intéressés à l'implication de ces deux protéines dans la réponse aux inhibiteurs de topoisomérases. Nous avons émis l'hypothèse que STAT3 et cdk5 pouvaient être impliquées dans la réparation des dommages de l'ADN. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons traitées des cellules HT29 avec du Sn38 suite à l'inhibition préalable de cdk5 ou de STAT3. Le taux de cassures de l'ADN a pu être déterminé suite au marquage de l'histone H2AX phosphorylé sur son résidu sérine 139 et à une analyse du marquage par cytométrie en flux. L'utilisation du Sn38 entraîne une induction des dommages de l'ADN, ceci a été observé par une augmentation du marquage de p-H2AX (Figure 23). En absence de STAT3 ou de cdk5, le marquage de p-H2AX dans la cellule est plus important, montrant donc leur implication dans les phénomènes de réparation (Figure 23). De plus, des expériences de clonogénicité nous ont permis de conclure que suite à la perte de cdk5, les cellules étaient plus sensibles à la mort cellulaire. Cdk5 semble donc responsable de la réparation de ces dommages de l'ADN induit par le Sn38. L'activation de cdk5 entraîne une résistance au traitement en entraînant la réparation de ces dommages.

6. STAT3 phosphorylée sur son résidu sérine 727 se fixe au niveau du promoteur d'Eme1.

Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 pouvait entraîner une reprogrammation de l'activité transcriptionnelle. Ainsi les gènes cibles de STAT3 dépendraient du type de phosphorylations activatrices. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine de STAT3 sur ces différents promoteurs cibles ont été réalisées en utilisant des anticorps dirigés contre la forme totale de la protéine, contre la forme phosphorylée sur la tyrosine 705 ou bien sur la sérine 727. Ces expériences ont été exécutées suite à une stimulation des cellules à l'interleukine 6 qui entraîne principalement une phosphorylation de STAT3 sur la tyrosine 705 et de la sérine. Le traitement au Sn38 entraîne quant à lui une phosphorylation uniquement du résidu sérine. Nous avons remarqué un recrutement de STAT3 phosphorylée sur la tyrosine 705 au niveau des promoteurs de la cycline D1 et de myc après stimulation des cellules à l'interleukine 6. Nous avons également observé que le facteur de transcription STAT3 phosphorylé sur la sérine 727 se retrouvait fixé au niveau du promoteur du gène de Eme1 suite à l'inhibition des topoisomérases et non pas la forme phosphorylée sur la tyrosine (Figure 24). STAT3 peut donc se fixer sur l'ADN en absence de phosphorylation de la

tyrosine. Ceci nous a permis de conclure qu'Eme1 n'était pas une cible de STAT3 suite à la stimulation par l'interleukine 6.

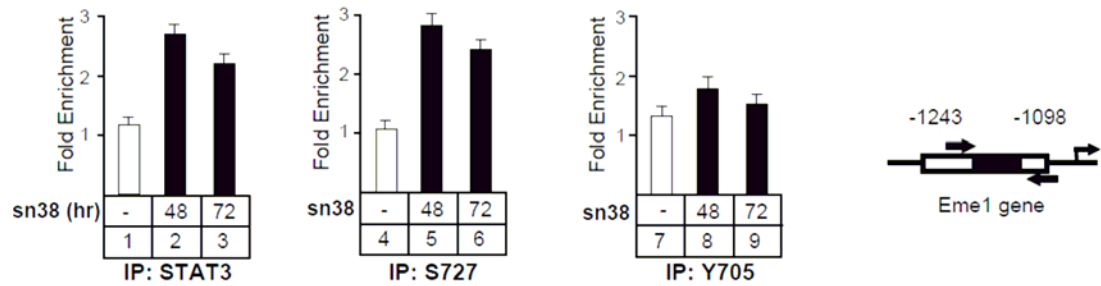


Figure 24 | STAT3 est recrutée sur le promoteur d'Eme1 quand elle est phosphorylée sur la sérine 727

Les cellules HT29 sont traitées ou non avec du Sn38 comme indiqué précédemment et la chromatine soluble a été immunoprécipité avec des anticorps dirigés contre la forme totale (IP : STAT3) et les deux formes phosphorylées de STAT3 (IP:S727 ou IP:Y705). L'ADN a été amplifié en utilisant des amorces dirigées contre le promoteur proximal de la cycline D1, de Myc et de Eme1 et quantifié par RT-PCR quantitative (n=3).

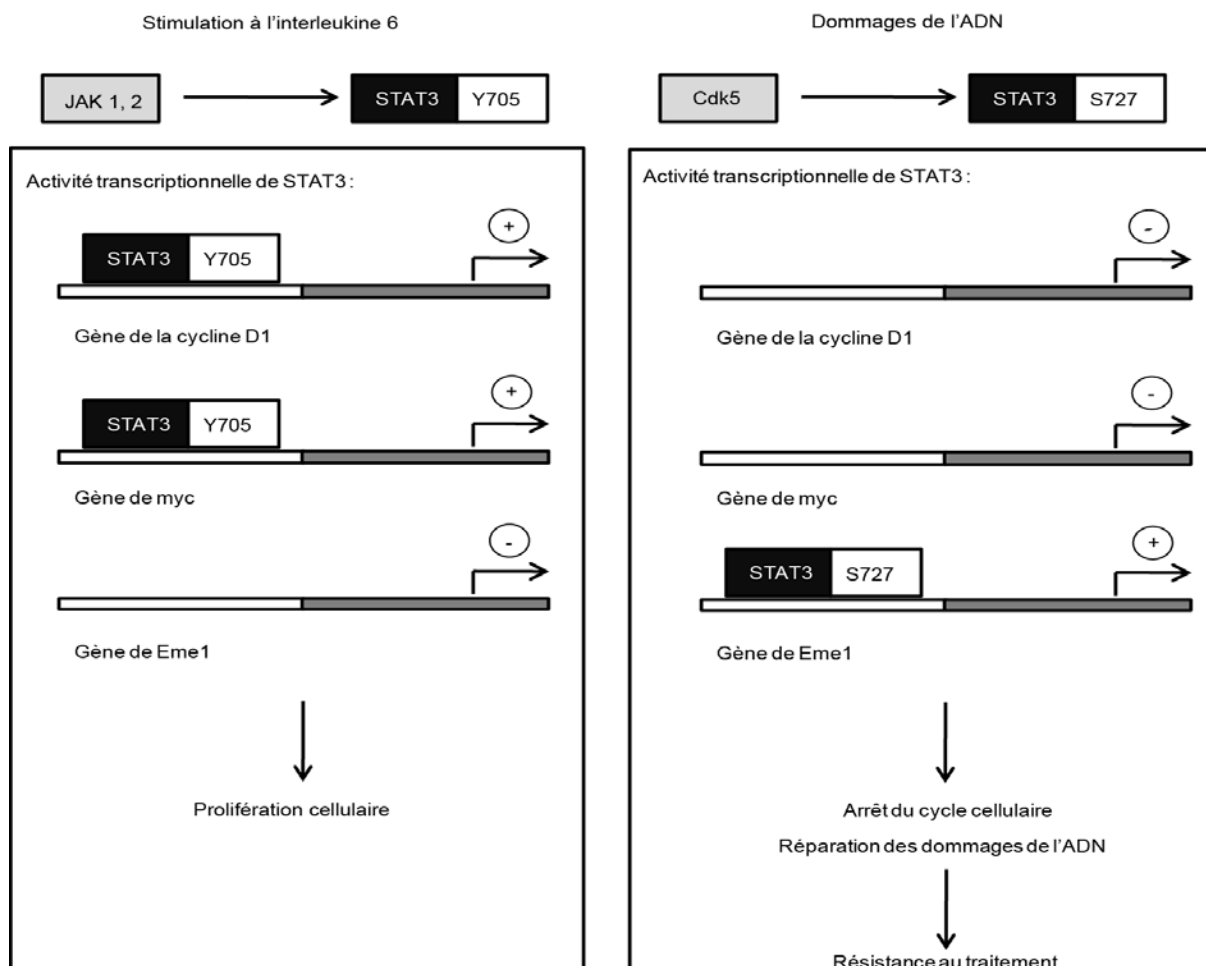


Figure 27 | Régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription STAT3 suite aux dommages de l'ADN induits par l'inhibition des topoisomérases de type I.

Cdk5 phosphoryle STAT3 sur la sérine 727. Le facteur de transcription va entraîner la transcription du gène d'Eme1. Eme1 va permettre une réparation des dommages induits par le sn38.

En résumé, ces travaux montrent que STAT3 est phosphorylée sur son résidu sérine 727 suite aux dommages de l'ADN par la kinase cdk5. La voie cdk5/STAT3/Eme1 joue donc un rôle dans l'induction de la réparation des dommages de l'ADN via l'expression de Eme1 (Figure 25). En plus de STAT3, ces résultats font de cdk5 et Eme1 des cibles potentielles pour améliorer les traitements de chimiothérapie. En association avec le sn38, un inhibiteur de ces deux protéines pourrait permettre une meilleure action du Sn38 en limitant la réparation des dommages de l'ADN.

Résultats non publiés :

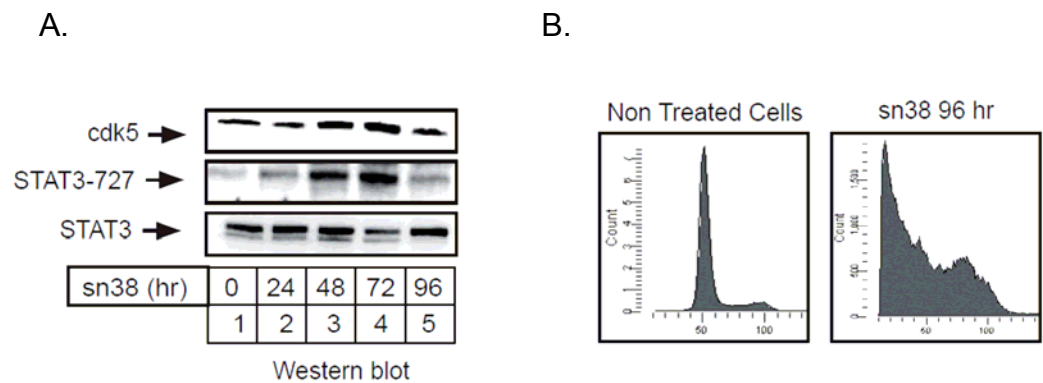


Figure 26 | l'inhibition prolongée des topoisomérases entraîne une perte de l'induction de cdk5 et de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 ainsi que l'apoptose des cellules

A. Les cellules HT29 ont été traitées au sn38 5ng/ml pendant 0, 24, 48, 72 ou 96h. Les lysats cellulaires ont été analysés par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre cdk5, STAT3 phosphorylé sur son résidu sérine 727 et STAT3 total.

B. Les cellules HT29 ont été traitées au sn38 5ng/ml pendant 96h ou non. Le profil de l'ADN est analysé par cytométrie en flux.

Des expériences complémentaires ont été réalisées suite à l'étude de la phosphorylation de STAT3 par la kinase cdk5 et à l'induction de l'expression de Eme1. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'effet d'une stimulation plus longue au Sn38. Des analyses de facs, nous ont permis de remarquer que suite à 96h de traitement les cellules se retrouvaient en majorité en phase subG1 (Figure 26). Ceci nous a indiqué que suite à une action prolongée des inhibiteurs de topoisomérases, les cellules rentraient en apoptose. De plus, une analyse par western-blot des lysats cellulaires des cellules traitées au Sn38, nous a permis de remarquer que suite à 96h de traitement, une diminution de l'expression de cdk5 était observée ainsi qu'une perte de la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine 727. L'entrée en apoptose des cellules HT29 semble donc être corrélée à la perte de l'expression de la kinase cdk5 et de la phosphorylation de STAT3 (Figure 26).

Afin de vérifier que la phosphorylation de la sérine 727 était nécessaire à l'induction de l'expression de Eme1, nous avons réalisé des expériences de transfection avec des mutants des formes phosphorylées de STAT3 sur la sérine. Ces mutants expriment une alanine à la place du résidu sérine 727 (S727A). Suite à la transfection de ces mutants, nous avons vérifié leur expression au sein de la cellule par des expériences de western-blot.

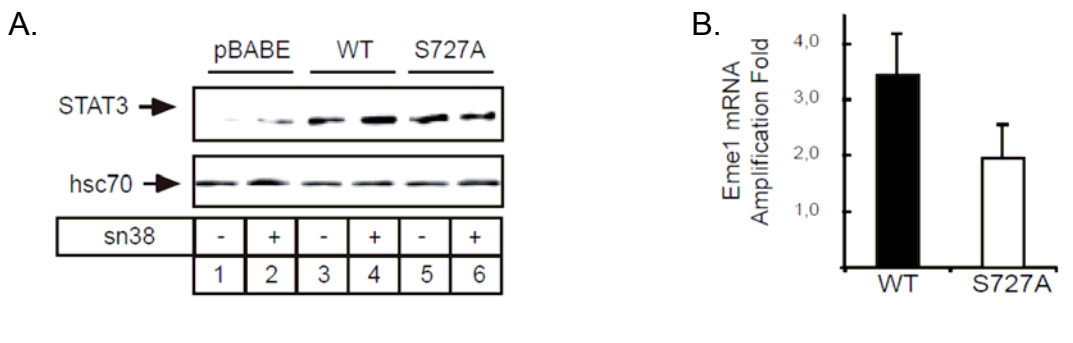


Figure 27 | La phosphorylation de STAT3 sur la sérine est nécessaire à l'induction de Eme1
 A. Des mutants S727A où la sérine a été mutée en alanine ont été transfectés dans des cellules HT29. Les cellules sont ensuite traitées ou non pendant 48h au Sn38 5ng/ml. Après transfection, les lysats cellulaires sont analysés par western-blot avec des anticorps dirigés contre la forme totale de STAT3 et contre HSC70.
 B. Suite à la transfection, l'expression de l'ARNm d'Eme1 est mesurée par RT-QPCR.

Nous avons observé une augmentation de l'expression de STAT3 après transfection des cellules par le mutant de STAT3 ou bien de la forme entière de STAT3 (Figure 27, pistes 1-6). Suite à la transfection du mutant S272A, nous avons voulu vérifier l'induction d'Eme1 après traitement des cellules au Sn38. Suite à la transfection de la protéine STAT3, une induction de l'expression d'Eme1 est observée suite au traitement. Lors de la transfection du mutant de la sérine, nous avons observé une induction plus réduite (Figure 27). Cette expérience nous a donc permis de vérifier et de confirmer que la phosphorylation de la sérine est nécessaire à l'induction du gène de Eme1.

7. Induction de l'expression de la kinase cdk5 après traitement à l'oxaliplatine

Afin de savoir si l'activation de cdk5 est spécifique de l'inhibition des topoisomérases, ou si elle était due aux dommages de l'ADN, nous avons utilisé un autre agent de chimiothérapie, l'oxaliplatine. Ce sel de platine entraîne la formation d'adduits au niveau de l'ADN et un arrêt en phase G1/S du cycle cellulaire. Nous avons remarqué que le traitement de cellules HT29 avec de l'oxaliplatine entraîne une induction de l'expression de la kinase cdk5 comme celle observée après l'inhibition des topoisomérases. En parallèle de l'induction de l'expression de cdk5, nous observons une augmentation de la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine 727 (Figure 28, lignes 1-4). Les cassures de l'ADN induites par l'oxaliplatine semblent donc engendrer une réponse similaire à celles induites par le Sn38. Ensuite nous avons voulu savoir si l'induction de cdk5 et de la phosphorylation de STAT3 entraînait elle aussi une perte du recrutement de STAT3 sur le promoteur du gène de la

cycline D1 comme suite à l'action du Sn38. Nous avons observé qu'un traitement à l'oxaliplatine entraînait lui aussi une perte du recrutement de STAT3 sur le promoteur du gène de la cycline D1. Nous avons observé des résultats similaires entre le traitement au Sn38 et à l'oxaliplatine (Figure 28).

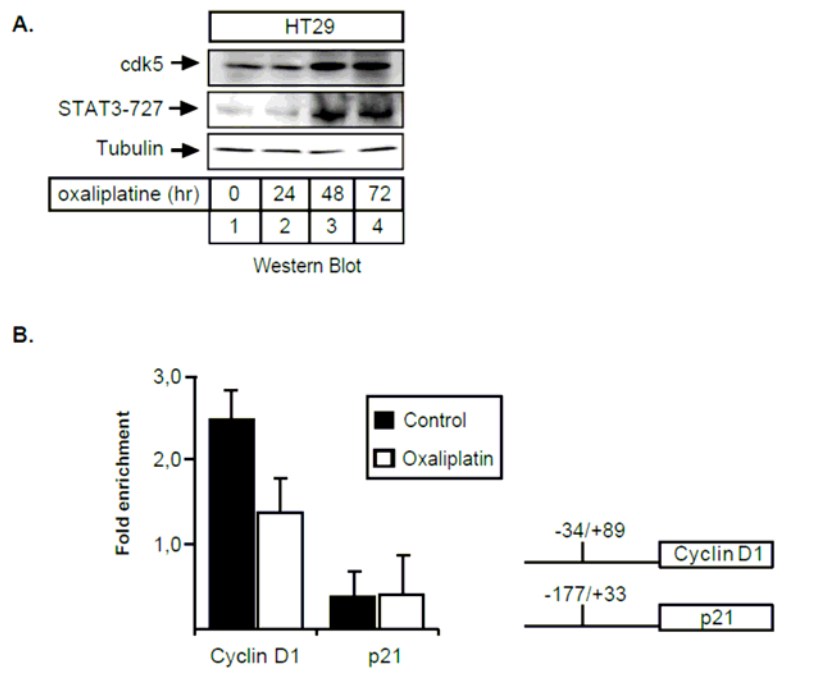


Figure 28 | L'oxaliplatine entraîne une induction de la kinase cdk5, de la phosphorylation de STAT3 ainsi qu'une perte du recrutement de STAT3 sur le promoteur de la Cycline D1

A. Les cellules HT29 sont traitées avec de l'oxaliplatine 1 μ M pendant 24, 48 ou 72h. Suite à la stimulation, des extraits cellulaires totaux sont préparés et le taux de protéines cdk5, de STAT3 phosphorylé sur son résidu sérine 727 et de la tubuline est analysé par western-blot (n=2).

B. Les cellules HT29 sont traitées avec de l'oxaliplatine 1 μ M pendant 48 h. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine avec des anticorps dirigés contre STAT3 sont alors réalisées sur les séquences de liaison à l'ADN de STAT3 du promoteur de la cycline D1. Pour contrôle, une immunoprécipitation de STAT3 a été réalisée sur le promoteur de p21 (n=3).

Ces résultats nous ont permis de conclure que l'induction de la kinase cdk5, ainsi que la phosphorylation de STAT3 n'est pas uniquement liée à l'inhibition des topoisomérases car suite au traitement des cellules par une autre molécule de chimiothérapie, l'oxaliplatine, une induction de l'expression de la kinase cdk5 est observée. Ceci nous permet de mettre en évidence que l'induction de la voie cdk5/STAT3 sérine 727 pourrait être activée suite à différents stress qui induisent des cassures de l'ADN et non uniquement après inhibition des topoisomérases. De plus, le traitement de l'oxaliplatine entraînant un arrêt des cellules en phase G1/S des cellules, ceci nous permet de penser que l'induction de cdk5 ne serait pas due à un arrêt du cycle en phase G2/M mais bien aux cassures de l'ADN. L'inactivation de la

kinase cdk5 pourrait donc être une cible potentielle de nouveaux traitements de chimiothérapie. Cette inhibition de cdk5 pourrait être utilisée en association avec des agents qui induiraient des cassures de l'ADN.

8. L'activation de l'oncogène Ras semble inhiber l'activation de la voie cdk5/STAT3

L'oncogène Ras est muté dans 40% des cas de tumeurs colorectales et ces mutations sont associées dans les tumeurs colorectales à une résistance aux traitements de chimiothérapie. Lorsque des mutations de la protéine Ras sont retrouvées chez les patients atteints de cancers colorectaux, il ne leur est plus administré de cetuximab, un anticorps dirigé contre le récepteur à l'EGF, car ces patients sont résistants à ce traitement. Nous avons donc voulu connaître l'influence de la surexpression de l'oncogène ras sur la voie de signalisation cdk5/STAT3. Des cellules d'adénocarcinome de colon HT29 ont été transfectées de façon stable avec un vecteur inductible codant pour l'oncogène HRASV12.

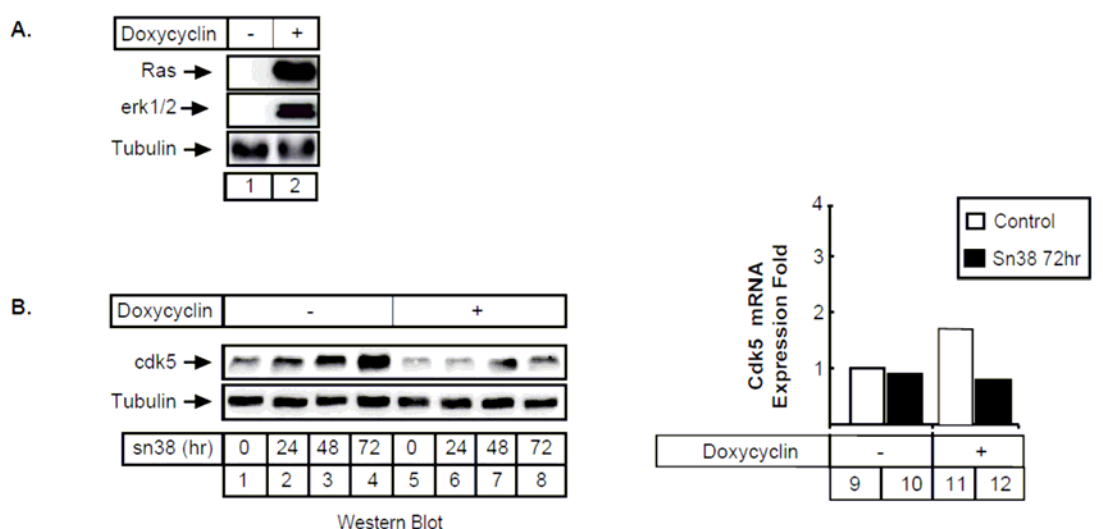


Figure 29 | L'induction de Ras entraîne la perte de l'expression de cdk5

A : Les cellules HT29 HRASV12 sont traitées à la doxycycline 50ng/ml. Le lysat cellulaire a été analysé par western blot avec des anticorps dirigés contre Ras, Erk et la tubuline (n=4).

B : Les cellules HRASV12 sont traitées comme précédemment puis l'expression de cdk5 et de la tubuline a été analysée par western blot après traitement avec du Sn38 5ng/ml pendant 24, 48 ou 72h. En parallèle, l'expression du taux d'ARNm de cdk5 est mesurée par RT-QPCR (n=5).

Au laboratoire, Sophie De Carné a montré que la protéine Ras était exprimée après la transfection et qu'elle induisait la phosphorylation de Erk (Figure 29, piste 1,2). Elle a aussi montré que l'induction de Ras entraîne une répression de l'expression de cdk5 après l'inhibition des topoisomérases. En effet, contrairement à ce qui est observé dans des cellules

HT29 non transfectées où l'inhibition des topoisomérases induit une surexpression de cdk5, en présence de Ras, une induction moindre de cdk5 n'a été observée (Figure 29, piste 1-8). Suite à l'induction de Ras et à un traitement au Sn38, une légèrement diminution de l'expression de l'ARNm de cdk5 n'a été observée (Figure 29, lignes 9-12).

En parallèle, la phosphorylation de STAT3 sur la sérine a été analysée par western blot et nous avons montré que l'induction de ras entraîne une inhibition de la phosphorylation de la sérine après traitement au Sn38 (Figure 30, piste 7-8). La perte de l'induction de cdk5 dans ce modèle d'induction de ras semble entraîner une perte de l'induction de l'expression de la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine 727.

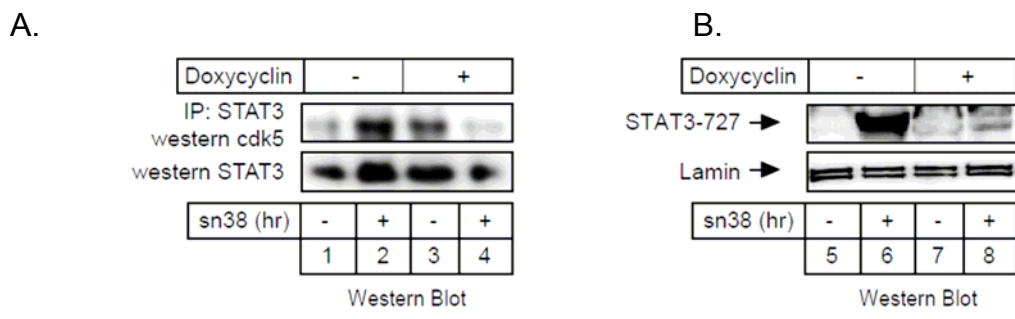


Figure 30 | Ras entraîne une perte de la formation du complexe STAT/cdk5 et de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727

A. Les cellules sont traitées comme précédemment et le facteur de transcription STAT3 a été immunoprécipité. Les échantillons ont été analysés par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre cdk5 et STAT3 (n=2).

B. Suite à une stimulation identique à la précédente, la phosphorylation sur le résidu sérine 727 de STAT3 a été analysée par western blot (n=2).

Nous avons voulu aussi connaître l'implication de l'induction de ras dans la formation du complexe cdk5/STAT3. Nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation où nous avons observé que l'induction de Ras entraîne une perte de la formation du complexe cdk5/STAT3 après traitement (Figure 30, lignes 1-4). En effet, ayant observé une perte de l'expression de cdk5 après traitement, le complexe ne peut alors plus se former.

Nous avons vu dans les résultats précédents que cdk5 semblait responsable de l'inhibition de la cycline D1 après traitement au sn38. Nous avons vérifié dans notre modèle d'induction de ras si le traitement au Sn38 pouvait toujours entraîner une répression de la cycline D1. Nous avons observé après l'induction de ras et du traitement au Sn38 des cellules qu'il n'y avait plus de répression de l'expression du niveau protéique de la cycline D1 (Figure 31).

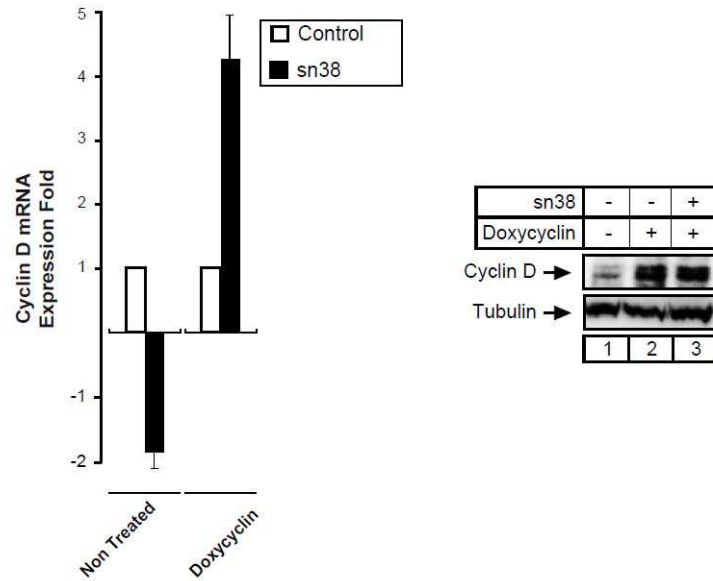


Figure 31 | L'induction de ras entraine une inhibition de la perte de la cycline D1 après inhibition des topoisomérases.

Les cellules HT29 HRASV12 sont traitées comme précédemment. La quantité d'ARNm de la cycline D1 est mesurée par RT-QPCR (n=3).

Le lysat cellulaire total a été analysé par western blot avec des anticorps dirigés contre la cycline D1 et la tubuline.

Afin de vérifier si la surexpression de la cycline D1 était due à une régulation transcriptionnelle, nous avons mesuré l'expression des ARN messagers de la cycline D1 après induction de l'oncogène HRasV12 et l'inhibition des topoisomérases. Aucune répression de la cycline D1 n'est alors visible. Nous pensons que STAT3 pourrait être phosphorylé sur son résidu tyrosine 705 suite à l'induction de Ras et non plus sur son résidu sérine, ceci entrainerait une surexpression de la cycline D1 dans les cellules par sa fixation sur le promoteur du gène. Cependant aucune phosphorylation de STAT3 sur le résidu tyrosine 705 n'est observée suite à l'induction de Ras mais il est possible de penser qu'un autre facteur de transcription comme par exemple AP1 puisse permettre la transcription du gène de la cycline D1 en coopération avec STAT3.

Pour conclure, nous avons observé une perte de l'induction de l'expression de cdk5 ainsi qu'une perte de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 suite à une induction de l'oncogène HRasV12 normalement induite par un traitement au Sn38. En parallèle, une induction de l'expression de la cycline D1 a pu être mise en évidence laissant penser que l'induction de l'oncogène ras puisse inhiber la voie de signalisation cdk5/STAT3 (Figure 32).

Il est à présent bien connu que la réponse première de la cellule à l'induction d'un oncogène est l'entrée en sénescence. En effet, la stimulation de la prolifération cellulaire par

l'oncogène va induire des dommages de l'ADN qui vont entraîner un arrêt du cycle. Mais l'oncogène Ras ayant un rôle dans l'induction de la prolifération cellulaire, il est compréhensible de retrouver une activation des gènes de prolifération comme la cycline D1. L'inhibition de la voie STAT3/cdk5 par l'activation de l'oncogène Ras pourrait être une des raisons de l'échappement de certaines cellules à cette entrée en sénescence. Les cellules surexprimant Ras inhibent alors les voies pouvant entraîner un arrêt du cycle cellulaire. De plus, en empêchant, la réparation des dommages de l'ADN, il est possible de penser que ces cellules possèdent en plus une grande instabilité génomique (Figure 32). Des expériences complémentaires doivent maintenant confirmer ces résultats préliminaires.

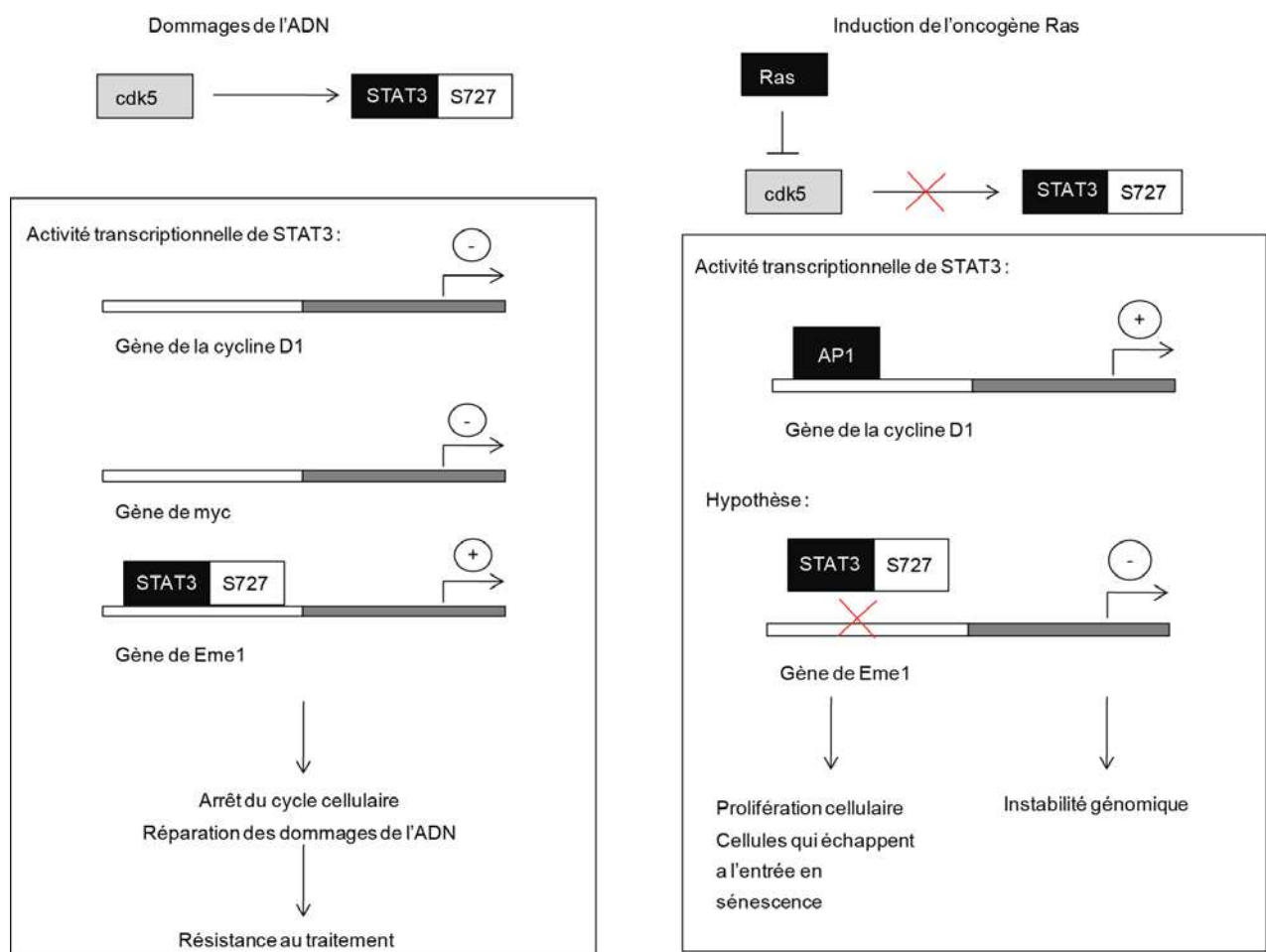


Figure 32 | Hypothèse : Régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription STAT3 suite aux dommages de l'ADN induits par l'inhibition des topoisomères de type I

Cdk5 phosphoryle STAT3 sur la sérine 727. Le facteur de transcription va entraîner la transcription du gène de Eme1. Eme1 va permettre une réparation des dommages induits par le Sn38. Suite à l'induction de Ras, lors du traitement au Sn38, aucune activation de cdk5 et aucune induction de la phosphorylation de la sérine 727 n'est observée ce qui laisse à penser que le gène de Eme1 ne sera pas transcrit. L'activation de la voie des MAP kinase pourrait permettre l'activation d'un facteur de transcription (comme AP1) qui pourrait permettre ainsi la transcription du gène de la cycline D1. Suite à l'induction de Ras, certaines cellules pourraient alors continuer de proliférer sans réparer leur ADN. Ceci conduirait à une augmentation de la prolifération cellulaire et à l'apparition d'instabilité génomique.

Partie II :

La voie Myc/Max/Miz-1 régule l'expression de la kinase Aurora A suite à l'inhibition des topoisomérase de type I

Dans les travaux précédents, nous avons montré que l'utilisation des inhibiteurs de topoisomérases de type I entraînaient une activation du facteur de transcription STAT3 par phosphorylation sur la sérine 727. Ce traitement conduit aussi à la répression de l'expression de myc et de la cycline D1. En parallèle, un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M a été observé. Ayant observé une activation de STAT3 en phase G2/M, nous nous sommes donc demandé si le facteur de transcription STAT3 ne pouvait pas réguler des gènes impliqués dans la phase G2 du cycle cellulaire. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la régulation d'une protéine impliquée dans la phase G2/M : la protéine Aurora A. En effet, la kinase Aurora A est une protéine clef impliquée dans le déroulement de la mitose et est localisée au niveau des centrosomes. Cette kinase est impliquée dans la duplication des centrosomes, dans l'induction du point de contrôle mitotique et aussi pour activer le complexe cycline B/cdk1. Dans des lignées cancéreuses du cancer du colon, une équipe a montré qu'une augmentation du nombre de centromères causait une mauvaise ségrégation des chromosomes entraînant une CIN qui serait due à un rôle pathologique des protéines Aurora (Ganem et al., 2009). De plus, son expression est dérégulée dans de nombreux cancers, une forte expression de la kinase souvent due à une amplification de son gène situé au niveau du chromosome 20q13, a été détectée dans de nombreuses tumeurs épithéliales comme les cancers du sein, de l'ovaire, les cancers gastriques, pancréatiques et colorectaux (Zhou et al., 1998). Dans ces cancers, le gène amplifié d'Aurora A est associé à un haut niveau de CIN (Ewart-Toland et al., 2003). De plus quelques études semblent également impliquer cette kinase dans la résistance des cellules tumorales aux traitements. Une étude montre que des cellules dans lesquelles p53 est active et qui surexpriment Aurora A, passent le point de contrôle du fuseau induit par le nocodazole. Dans ces conditions, Aurora A interagit avec cdc20 et l'active par phosphorylation (Farruggio et al., 1999). D'autre part, une étude réalisée dans les cellules HeLa montre que la surexpression d'Aurora A entraîne une absence d'arrêt des cellules lors de la mitose, malgré l'induction du point de contrôle du fuseau mitotique par le taxol. Les cellules entrent en anaphase malgré la formation de fuseaux anormaux et des kinétochores mal attachés aux microtubules (Anand et al., 2003). Nous souhaitons déterminer si la phosphorylation de STAT3 pouvait permettre la régulation du gène d'Aurora A en réponse aux dommages de l'ADN.

1. Les inhibiteurs de topoisomérases induisent une perte de l'expression de la kinase Aurora A

Afin d'étudier l'expression de la kinase Aurora, il a été nécessaire de synchroniser les cellules colorectales HCT116 en phase G2/M du cycle cellulaire. En effet, l'expression de la kinase est transitoire et est maximale en phase G2. Nous avons réalisé une synchronisation des cellules en phase G1/S par de l'hydroxyurée suivie d'un relargage des cellules pendant 9h avec du sérum pour une synchronisation en phase G2/M. Des expériences de cytométrie en flux ont permis de confirmer que les cellules se trouvaient en majorité en phase G2 suite à 9h de relargage. Les expériences de western-blot et de RT-QPCR ont permis d'observer que les lysats cellulaires obtenus après la synchronisation en phase G2/M correspondaient au pic d'expression de la kinase Aurora A. Ceci nous a permis de confirmer l'expression d'Aurora A en phase G2.

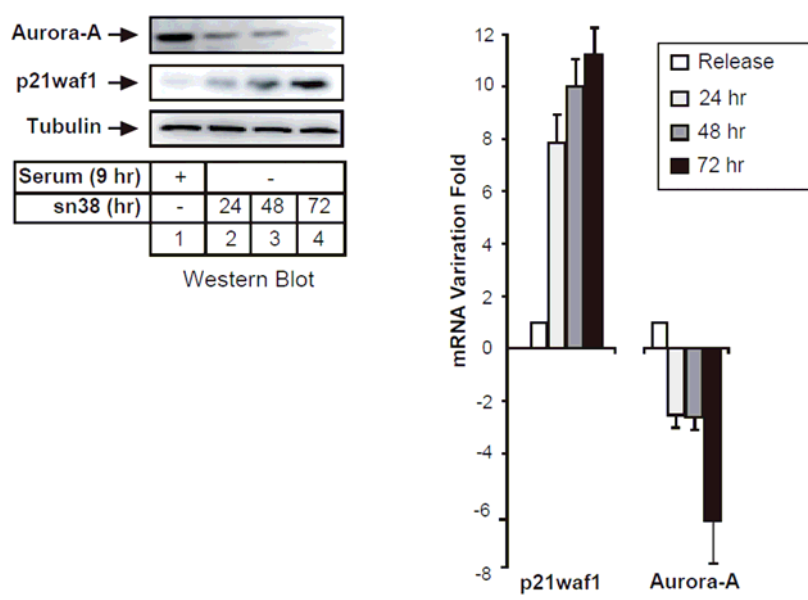


Figure 33 | L'inhibition des topoisomérases induit une perte de l'expression d'Aurora A

Les cellules HCT116 sont synchronisées en phase G2 du cycle avec de l'hydroxyurée et un relargage en sérum pendant 9h où traitées au sn38 (5ng/ml) pendant le temps indiqué. L'expression d'Aurora A, de p21 et de la tubuline est analysée par western blot. Dans les mêmes conditions, l'expression de l'ARNm d'Aurora A et de p21 a été analysée par RT-PCR quantitative.

Par la suite, nous avons voulu vérifier que la kinase Aurora était bien une cible du traitement aux inhibiteurs de topoisomérases. Pour cela, nous avons comparé des cellules synchronisées en phase G2/M grâce à la technique précédente et des cellules traitées par l'inhibiteur de topoisomérase et qui sont elles mêmes arrêtées en phase G2 après 48h de traitement. Comparées à des cellules synchronisées par l'hydroxyurée et le sérum en phase G2/M, nous avons observé une perte de l'expression protéique d'Aurora A ainsi qu'une perte

de l'expression de son ARNm (Figure 33). Ces résultats suggèrent une régulation transcriptionnelle du gène et non une dégradation protéique par le protéasome.

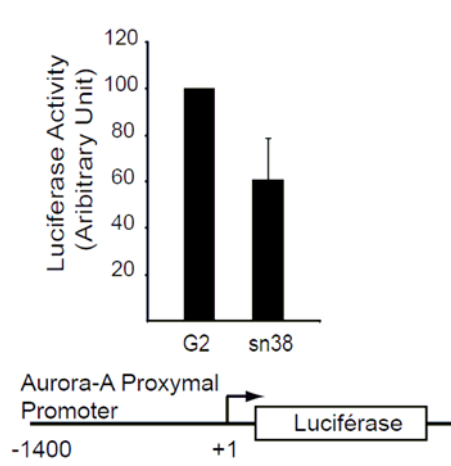


Figure 34 | L'inhibition des topoisomérases entraîne une perte de la transcription d'Aurora A

Les cellules HCT116 sont transfectées avec un vecteur (500ng) comprenant le promoteur proximal d'Aurora A couplé au gène de la luciférase. Les cellules ont ensuite été synchronisées en phase G2 ou traitées avec du sn38. Les extraits cytoplasmiques ont été préparés afin de mesurer l'activité de la luciférase (n=3).

Des expériences de luciférase avec un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur proximal d'Aurora A, nous ont permis aussi de confirmer cette perte de la transcription du gène d'Aurora A (Figure 34). De plus nous avons observé au niveau du promoteur d'Aurora A, par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine, une perte du recrutement des coactivateurs de la transcription comme l'ARN polymérase de type II ou de CBP ou bien encore de l'acétylation de l'histone H3.

2. L'expression d'Aurora A n'est pas médiée par les protéines STAT3 ou p53 et p21

La régulation de la protéine semble être due à une régulation transcriptionnelle. Le traitement induisant un arrêt en phase G2/M et STAT3 étant phosphorylé, ceci nous a conforté dans l'idée que le facteur de transcription STAT3 pouvait réguler la transcription d'Aurora A. Suite à la découverte de sites consensus de fixation de STAT3 sur le promoteur d'Aurora A, les expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées pour vérifier si STAT3 pouvait se fixer sur ce gène. Cependant, aucun recrutement de STAT3 n'a été observé sur le promoteur entre des cellules synchronisées en G2/M ou traitées au Sn38 (Figure 35). Nous avons donc cherché d'autres protéines qui pouvaient être responsables de cette inhibition d'Aurora A.

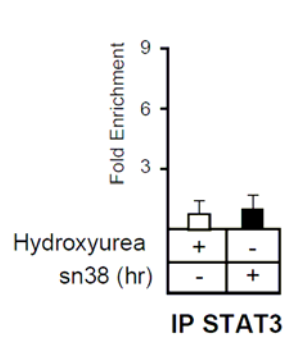


Figure 35 | STAT3 n'est pas recrutée sur le promoteur d'Aurora A suite à l'inhibition des topoisomérases

Les cellules HCT 116 sont traitées comme précédemment et l'ADN soluble a été amplifié par des amorces qui recouvrent la région -655/-380 de fixation de STAT3 (n=3)

L'étude par western blot de l'expression de la protéine p21 et de la protéine p53, nous a indiqué que les deux protéines sont induites après traitement au Sn38. Des études précédentes menées au laboratoire ont montré que p21 pouvait posséder des fonctions de répresseur transcriptionnel de gènes du cycle cellulaire suite à un traitement génotoxique (Vigneron et al., 2006). Nous avons donc voulu déterminer si dans ces conditions, la voie p21/p53 pouvait permettre la répression d'Aurora A. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de p53 et de p21 sur l'expression de la kinase Aurora A. Pour cela, des cellules HCT116 déficientes en p21 où les deux allèles du gène de p21 sont délétés par recombinaison homologue, ont été synchronisées en phase G2 ou traitées au Sn38 et l'expression de la kinase Aurora A a été étudiée par western-blot ou par RT-PCR. Pour confirmer le résultat, nous avons utilisé des cellules HT29 dans lesquelles la protéine p53 est mutée sur son domaine de liaison à l'ADN. Les cellules ont été synchronisées en phase G2/M comme précédemment ou traitées au Sn38. Dans les deux cas, nous avons observé une perte de l'expression de la protéine ainsi que de son ARNm. Malgré l'activation de p53 et p21 lors d'un traitement génotoxique, et leur implication dans la régulation des gènes impliqués dans la transition G2/M, nous avons conclu que l'inhibition de la kinase Aurora A était indépendante des protéines p53 et p21.

3. Myc régule l'expression de la kinase Aurora A

Myc est un facteur de transcription qui participe à l'activation du cycle cellulaire. Il est notamment connu pour activer la transcription du gène de la cycline B, un régulateur clef de la transition G2/M. A ceci s'ajoute le fait que des études menées au laboratoire ont montré

que son expression était diminuée suite à des dommages de l'ADN induits par le Sn38. Une analyse bioinformatique du promoteur d'Aurora A nous a permis de mettre en évidence des sites de fixation de myc sur le promoteur, faisant de myc un facteur de transcription potentiel pouvant se lier au promoteur d'Aurora A. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de myc dans notre modèle et nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait être responsable de la régulation de la kinase Aurora A.

Afin de vérifier l'influence de l'inhibition de myc sur le taux d'expression d'Aurora A, des lysats de cellules de lignée colorectale LS114T transfectées de manière stable avec un plasmide codant pour un répresseur (LS174T R1). Ces cellules LS174T R1 ont ensuite été transfectées de façon stable avec le plasmide pTER inducible à la doxycycline contenant deux ARNs interférents différents de c-myc (LS174T #1 et LS174T #2). Nous avons alors observé une répression de l'expression de la kinase Aurora A suite à l'inactivation de myc après un traitement des cellules à la doxycycline. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine, nous ont ensuite indiqué que myc était recrutée sur le promoteur d'Aurora A et que l'histone H3 était acétylée dans des conditions normales ce qui n'est plus le cas suite à la perte de myc. Suite à la synchronisation des cellules dans les différentes phases du cycle, nous avons observé que myc était recruté sur le promoteur d'Aurora A lors de la phase G2/M du cycle.

Myc est un facteur de transcription connu pour fonctionner grâce à des partenaires qui sont les protéines Max, Mad, Miz-1. Max est un coactivateur de myc alors que mad et miz-1 sont plutôt des répresseurs. Nous avons voulu déterminer si le cofacteur max était recruté sur le promoteur d'Aurora A en association avec myc au cours du cycle cellulaire. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées sur ces cellules synchronisées et nous ont permis de conclure que myc et max sont effectivement recrutées sur le promoteur en phase G2. Afin de vérifier l'association des deux protéines sur le promoteur, des expériences de ChIP en série (Re-ChIP) ont été réalisées. L'ADN soluble a été dans un premier temps immunoprécipité avec un anticorps dirigé contre myc. Un traitement au DTT a permis ensuite de déstabiliser le complexe et l'ADN soluble a été à nouveau immunoprécipité avec un anticorps dirigé contre la protéine max. Ceci nous a permis de conclure que les protéines étaient retrouvées associées sur le promoteur uniquement pendant la phase G2 du cycle cellulaire (Figure 36).

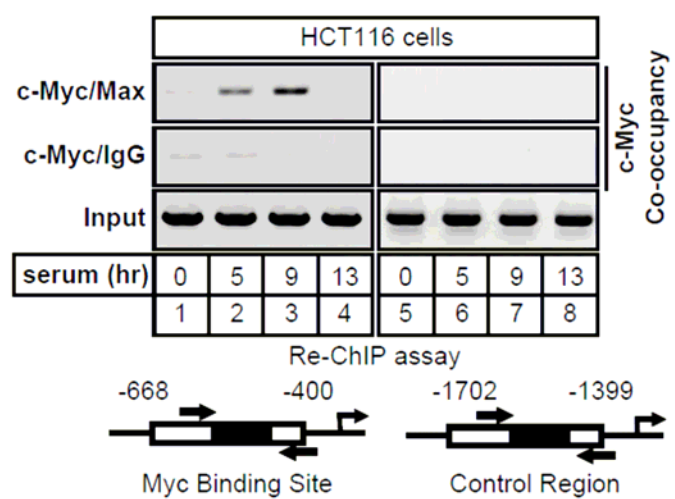


Figure 36 | Myc et Max sont associées sur le promoteur d'Aurora A en phase G2

Les cellules HCT116 ont été synchronisées en phase G1/S avec de l'hydroxyurée et relarguées suivant les temps indiqués dans du milieu additionné de 3% de sérum. La chromatine soluble a été immunoprécipitée avec un anticorps dirigé contre myc. Le complexe a été dissocié et la chromatine a été immunoprécipitée à nouveau avec un anticorps dirigé contre Max. L'ADN a été amplifié avec des amorces qui recouvrent la région -668/-400 du promoteur d'Aurora A et analysé par PCR semi-quantitative (n=3).

4. L'inhibition des topoisomérases induit une perte du recrutement du complexe myc/max sur le promoteur d'Aurora A

Des expériences de western-blot indiquent que le traitement au Sn38 induit une répression de l'expression de Myc et pas de variation de l'expression de Max. De plus, l'analyse du taux de l'ARNm par RT-PCR de ces deux protéines nous a donné les mêmes résultats. En parallèle, une nette augmentation du taux protéique de Mad ainsi qu'une surexpression de son ARNm ont été observés. Afin de savoir si max et mad étaient recrutés sur le promoteur d'Aurora A suite au traitement, des expériences de ChIP ont été réalisées. Suite à un traitement au Sn38, une baisse du recrutement de max et de myc a été observée. Concernant, la protéine Mad aucun recrutement n'a été observé en croissance ou sur des cellules synchronisées en phase G2. Cependant, le traitement au sn38 entraîne une fixation de Mad sur le promoteur (Figure 37). Ces expériences permettent de conclure que le complexe Myc/Max est recruté en phase G2 sur le promoteur d'Aurora A et que ce recrutement ne s'observe plus suite au traitement au Sn38 (Figure 37).

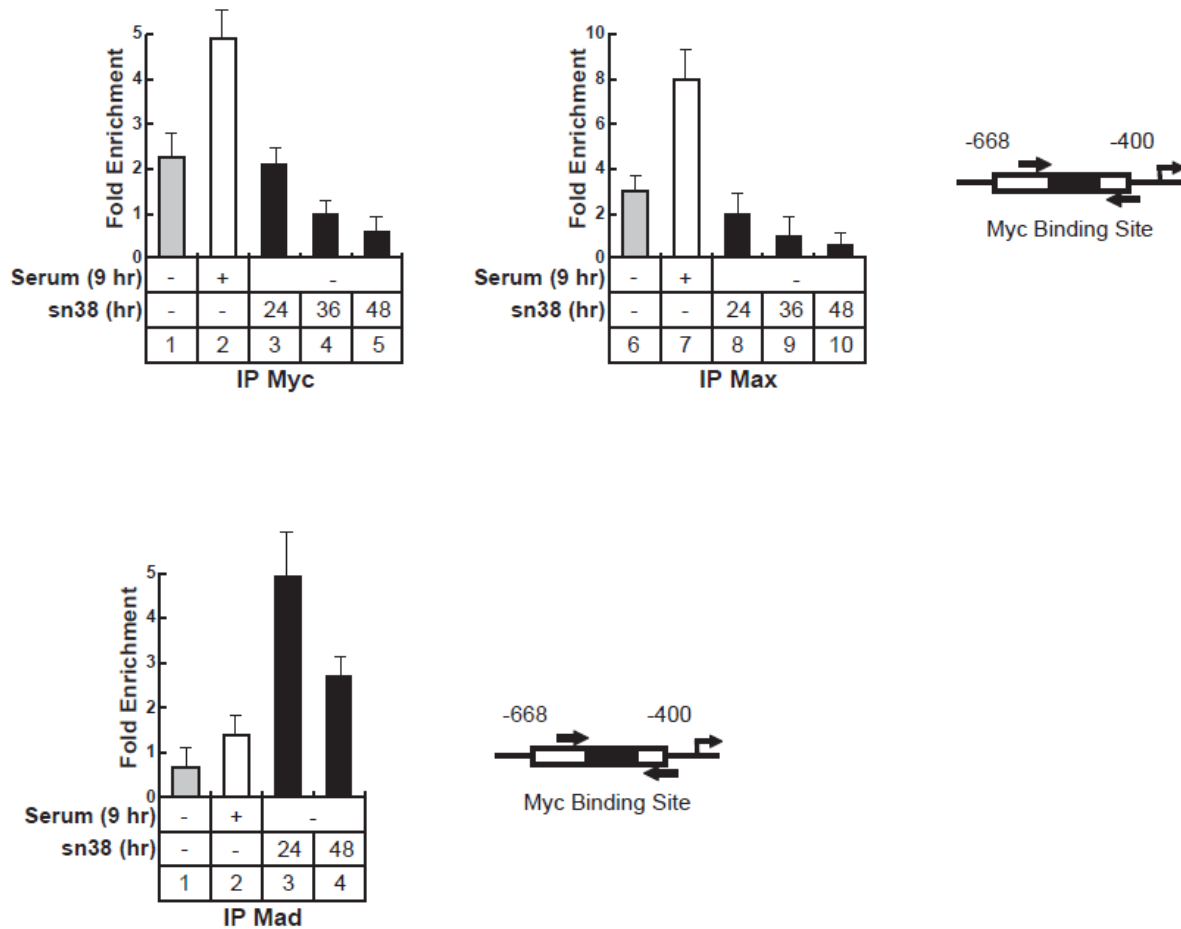


Figure 37 | L'inhibition des topoisomérases induit une perte du recrutement de Myc et Max et la fixation de Mad sur le promoteur d'Aurora A

Les cellules HCT 116 sont traitées comme précédemment et l'ADN soluble a été immunoprécipité avec des anticorps dirigés contre myc, max et mad. Ensuite, l'ADN est amplifié par des amorces qui recouvrent le site de fixation de myc sur le promoteur d'Aurora A (n=3)

5. Le Sn38 induit un recrutement de Miz-1 sur le promoteur d'Aurora A

La répression des gènes cibles de myc est connue pour être régulée par Miz-1 qui forme un complexe répresseur en association avec myc. Mais, il a aussi été décrit que Miz-1 pouvait entraîner la répression de gènes indépendamment de myc. Nous avons voulu savoir si cette protéine pouvait être impliquée dans la régulation d'Aurora A suite à l'inhibition des topoisomérases. L'expression de la protéine et de l'ARNm de miz-1 a été analysée suite à un traitement au Sn38 et aucune variation n'a été observée. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine nous ont permis de suivre le recrutement de miz-1 en phase G2 ou suite à l'inhibition des topoisomérases au niveau du promoteur d'Aurora A. Au contraire de ce qui a été observé pour myc et max, une augmentation du recrutement de Miz-1

au niveau du promoteur a été observée suite au traitement (Figure 38). Nous en avons conclu que le traitement au Sn38 induit un recrutement de Miz-1 sur le promoteur d'Aurora A qui pourrait donc être impliqué dans la perte du recrutement des co-activateurs de la transcription.

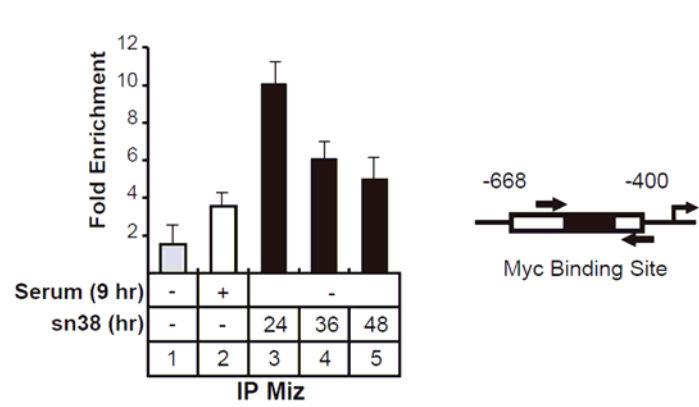


Figure 38 | L'inhibition des topoisomérases induit une augmentation du recrutement de Mad sur le promoteur d'Aurora A

Les cellules HCT 116 sont traitées comme précédemment et l'ADN soluble a été immunoprécipité avec un anticorps dirigé contre miz. Ensuite, l'ADN est amplifié par des amorces qui recouvrent le site de fixation de myc sur le promoteur d'Aurora A (n=3).

6. Des SAHF sont localisées sur le promoteur d'Aurora A suite à l'inhibition des topoisomérases

Nous avons montré précédemment qu'un traitement des cellules HCT116 ou HT29 par l'inhibiteur des topoisomérases induit l'entrée en sénescence des cellules. La sénescence est un arrêt de la prolifération cellulaire irréversible qui est caractérisé par la formation de foci d'hétérochromatine que l'on appelle des SAHF (senescence-associated heterochromatic foci). Ces SAHF comportent des marqueurs comme la protéine HP1 γ (Heterochromatin protein 1) ou la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9Me3), ce qui permet de maintenir sous forme condensée l'ADN des gènes de prolifération (Narita et al., 2003). Nous avons voulu savoir si le promoteur d'Aurora A possédait de tels marqueurs suite au traitement des cellules HCT116 avec l'inhibiteur des topoisomérases. Des analyses par western blot de lysats cellulaires ont permis de montrer une induction de la phosphorylation de l'histone H2AX ainsi qu'une augmentation de la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3. Ces résultats ont été confirmés par des expériences d'immunofluorescence qui permettent aussi de mettre en évidence par le marquage au DAPI de l'ADN, des foci d'hétérochromatine dans le noyau seulement après l'inhibition des topoisomérases. Une analyse par FACS a permis de quantifier ces deux marqueurs. Afin de déterminer si ces marqueurs sont retrouvés sur le

promoteur proximal d'Aurora A, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont été réalisées. Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation du recrutement de HP1 γ et une augmentation de la triméthylation de l'histone H3 (Figure 39). Cependant, aucun recrutement de pH2AX n'a pu être détecté après traitement. D'après ces résultats, nous pouvons conclure que les SAHF sont associées au promoteur proximal d'Aurora A suite au traitement par l'inhibiteur des topoisomérases et que le recrutement de HP1 γ et la triméthylation de l'histone H3 pourrait expliquer l'inhibition de la transcription du gène d'Aurora A par un remodelage transcriptionnel.

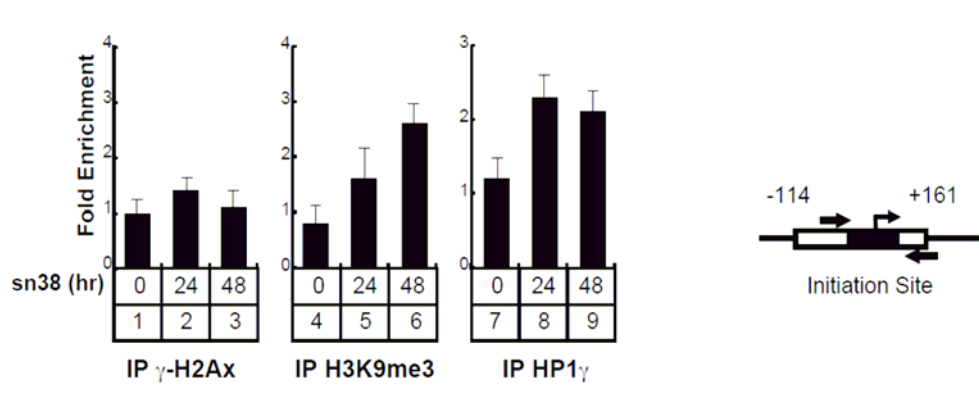


Figure 39 | L'inhibition des topoisomérases induit une augmentation du recrutement de HP1 γ et la triméthylation de l'histone H3 sur le promoteur d'Aurora A

Les cellules HCT 116 sont traitées comme précédemment et l'ADN soluble a été immunoprécipité avec un anticorps dirigé contre pH2AX, H3K9me3 et HP1 γ . Ensuite, l'ADN est amplifié par des amorces qui recouvrent le promoteur proximal d'Aurora A (n=3).

7. L'inhibition des topoisomérase entraîne une perte de la séparation des chromosomes

Afin de déterminer le rôle de la perte d'Aurora A dans la réponse aux inhibiteurs de topoisomérases, nous nous sommes intéressés à l'étude des centrosomes. En effet, nous avons vu auparavant que la kinase était impliquée dans la maturation et la séparation de ces centrosomes. Des expériences de microscopie réalisées par Julia Cherier, nous ont permis de remarquer que suite à un traitement au Sn38, seulement 30% des cellules exprimaient la kinase Aurora A et que 90% d'entre elles possédaient des centrosomes dupliqués mais non séparés. L'inhibition des topoisomérases n'affecte donc pas la duplication des centrosomes mais leur maturation et leur migration au niveau des pôles. Certainement due à cette absence de séparation des centrosomes, nous avons observé une inhibition de la prolifération cellulaire après traitement par des expériences de clonogénicité ainsi qu'une augmentation de l'entrée en sénescence par des tests de β -galactosidase. Nous avons conclu de ces expériences que

l'inhibition de la voie myc-Aurora A entraîne une perte de la séparation des centrosomes ce qui induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et une induction de la mort cellulaire.

Pour conclure, nous montrons que l'utilisation de l'inhibiteur de topoisomérase entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M par une nouvelle voie de signalisation qui entraîne la perte de l'expression d'Aurora A (Figure 40). Dans des conditions normales, la transcription d'Aurora A est liée à la fixation du complexe myc/max sur son promoteur durant la phase G2 du cycle cellulaire et aucun rôle de STAT3 n'a pu être mis en évidence dans cette régulation. A la suite du traitement, la protéine Mad est surexprimée et est recrutée au niveau du site de fixation de myc sur le promoteur d'Aurora A entraînant probablement une perte du recrutement du complexe Myc/Max. D'un autre côté, le facteur de transcription Miz-1 vient lui aussi se fixer sur le promoteur. Tous ces systèmes de régulation semblent entraîner la répression de la transcription d'Aurora A ayant sûrement pour conséquence l'inhibition de la séparation des centrosomes et l'entrée en sénescence des cellules. Nous avons en effet montré que l'inhibition des topoisomérases entraîne la formation de SAHF ainsi que la triméthylation de l'histone H3 et le recrutement de HP1 γ sur le promoteur proximal d'Aurora A. Ces résultats permettent de penser que l'inhibition d'Aurora A est un élément important de l'arrêt en phase G2/M en réponse aux inhibiteurs de topoisomérase et que cet effet est réprimé dans des tumeurs qui surexpriment la voie myc/Aurora A. Ceci permettrait alors à ces cellules d'échapper aux points de contrôle mitotique.

D'après les résultats obtenus dans la partie I, nous pouvons penser que l'inhibition des topoisomérases induit une activation de la kinase cdk5 qui va entraîner la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine 727. Ce traitement n'induit pas la phosphorylation du résidu tyrosine 705 de STAT3. Le facteur de transcription ne peut donc pas se fixer sur le promoteur de son gène cible myc, aboutissant à une perte de l'expression de myc et par conséquent à une absence de son recrutement sur le promoteur d'Aurora A. La diminution de l'expression de myc associée à une perte de la fixation de son activateur Max sur le promoteur d'Aurora A ainsi qu'une surexpression de ses répresseurs Mad et Miz-1 abouti à une perte de l'expression d'Aurora A. L'inhibition d'Aurora A aura pour conséquence un blocage de la maturation et de la séparation des centrosomes ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire en phase G2.

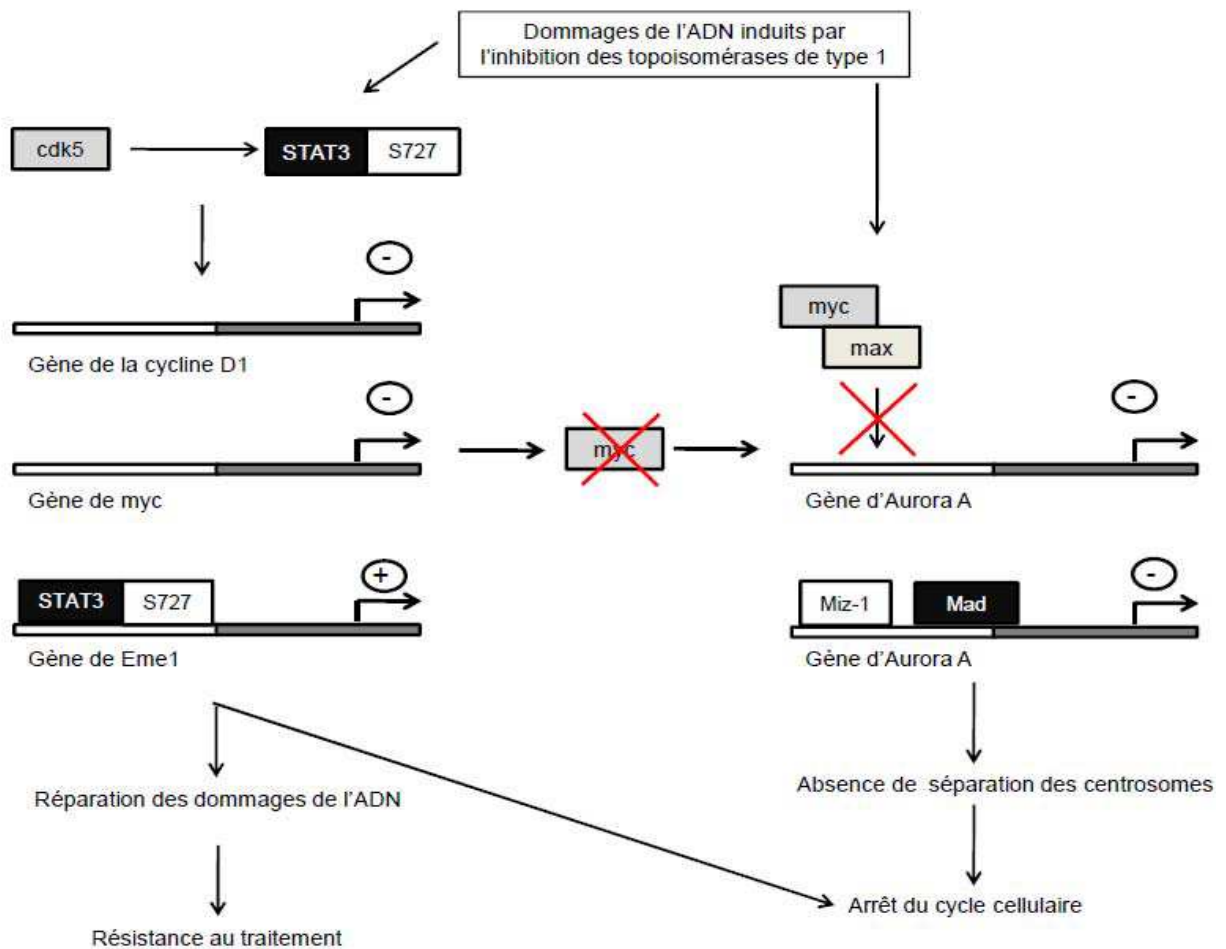


Figure 40 | Les dommages de l'ADN induits par l'inhibition des topoisomérases de type I entraînent un arrêt du cycle cellulaire

Cdk5 phosphoryle STAT3 sur la sérine 727. Le facteur de transcription va entraîner la transcription du gène d'Eme1 qui va permettre une réparation des dommages induits par le sn38. En parallèle, le facteur de transcription n'étant plus phosphorylé sur son résidu tyrosine 705, les gènes de la cycline D1 et de myc ne seront plus transcrits. Myc n'est alors plus exprimée dans la cellule et par conséquent ne pourra plus se fixer sur le promoteur d'Aurora A en association avec son partenaire Max. L'inhibition des topoisomérases entraîne aussi un recrutement de Miz-1 et de Mad sur le gène d'Aurora A participant ainsi à la perte de la transcription du gène qui est sûrement à l'origine de l'absence de séparation des centrosomes. Ceci permet d'engendrer un arrêt du cycle cellulaire qui permettrait à la cellule de réparer les dommages de l'ADN entraînant une résistance au traitement.

Résultats non publiés :

Les résultats précédents permettent de penser que l'inhibition d'Aurora A est un élément essentiel de l'arrêt en phase G2/M en réponse aux inhibiteurs de topoisomérase et que cet effet est réprimé dans des tumeurs qui surexpriment myc. Nous pensons que cette surexpression permettrait alors à des cellules d'échapper aux points de contrôle du cycle cellulaire. Nous avons voulu étudier la voie myc/AuroraA au sein de tumeurs de patients atteints de cancers colorectaux.

8. Aurora A et myc sont surexprimées dans les tumeurs colorectales et ce phénomène est associé à l'apparition d'instabilité génomique

L'activation d'Aurora A est connue pour entraîner l'apparition d'instabilités chromosomiques. Tout d'abord nous avons voulu déterminer si les tumeurs colorectales présentaient des signes d'instabilité.

Nous avons étudié l'aneuploïdie des cellules issues des échantillons de patients atteints de cancers colorectaux par cytométrie en flux (Figure 41). En parallèle, les ARNm des différents partenaires de cette voie ont été étudiés par RT-QPCR sur ces mêmes échantillons. Dans chacune de ces expériences, des tissus sains et des tissus issus de tumeurs ont été récupérés chez ces patients et comparés entre eux. Comme attendu, l'étude des profils de pics et le calcul des index d'instabilité génomique des patients ont permis de mettre en avant que la majorité des tumeurs colorectales possédait un fort taux d'instabilité génomique. Sept des neuf patients étudiés possèdent une instabilité génétique (Figure 41).

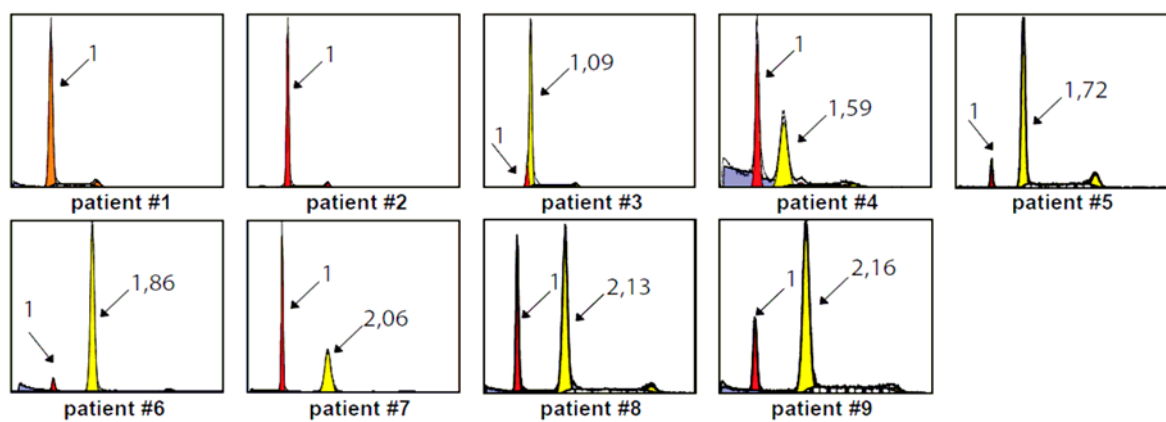


Figure 41 | Mesure du degré d'instabilité génétique au sein des tissus tumoraux

Analyse du profil génétique de tumeurs colorectales par cytométrie en flux. Les profils des patients sont analysés séparément suite au marquage de l'ADN par du iodure de propidium et l'index

d'instabilité a été déterminé par comparaison au tissu sain ($p < 0,001$). Lorsque l'index est supérieur à 1 cela signifie que la tumeur possède de l'instabilité.

Après avoir analysé l'instabilité génomique des tumeurs issues de patients atteints de cancers colorectaux, nous avons voulu connaître au sein de la tumeur l'expression des différents acteurs de la voie myc/Aurora A. Sur les différents tissus de tous les patients, le taux des ARNm d'Aurora A, de myc, de max, de miz-1, de mad et de p21 a été étudié. Les expériences ont été réalisées à partir des tissus de patients par comparaison des expressions des ARNm de chaque tissu sain comparé au tissu tumoral correspondant. Cette étude nous indique que les tumeurs exprimant de l'instabilité génomique présentent de fort taux d'ARNm de myc ($p = 0,022$) et d'Aurora A ($p < 0,01$). De plus cette instabilité génomique est associée à une perte de l'expression de Miz-1 ($p < 0,05$) et de Max ($p = 0,033$) et une très nette inhibition de Mad ($p = 0,002$) (Figure 42). Nous observons aussi une perte de l'expression de p21 dans ces tumeurs instables génomiquement (Figure 42).

De plus, une autre analyse des ARNm a permis de montrer que 6 des 7 tumeurs surexprimant myc possédaient en même temps un taux élevé d'Aurora A (Figure 43). Nous notons aussi que cette surexpression conjointe de myc et Aurora A est associée à l'instabilité génétique observée dans les tumeurs (Figure 43).

Les résultats précédents indiquent que l'inhibition de la transcription d'Aurora A est nécessaire à l'arrêt en phase G2/M du cycle cellulaire suite à l'inhibition des topoisomérases. Mais nous avons vu que dans les tumeurs colorectales la surexpression de myc était associée à la surexpression d'Aurora A. Cette surexpression de myc/Aurora A en association avec une inhibition de p21, Miz-1 et Mad est en plus associée à une instabilité génomique des tumeurs. Nous supposons que l'arrêt en G2/M dans la réponse aux inhibiteurs des topoisomérases de type I est inhibé dans les tumeurs par la surexpression de myc entraînant ainsi une résistance au traitement. Cette voie de signalisation myc/max/mad/miz-1 pourrait être utilisée pour classer les tumeurs de mauvais pronostics qui seraient résistantes à l'irinotécan. Ces données préliminaires demandent maintenant à être validées sur un nombre plus grand de patients.

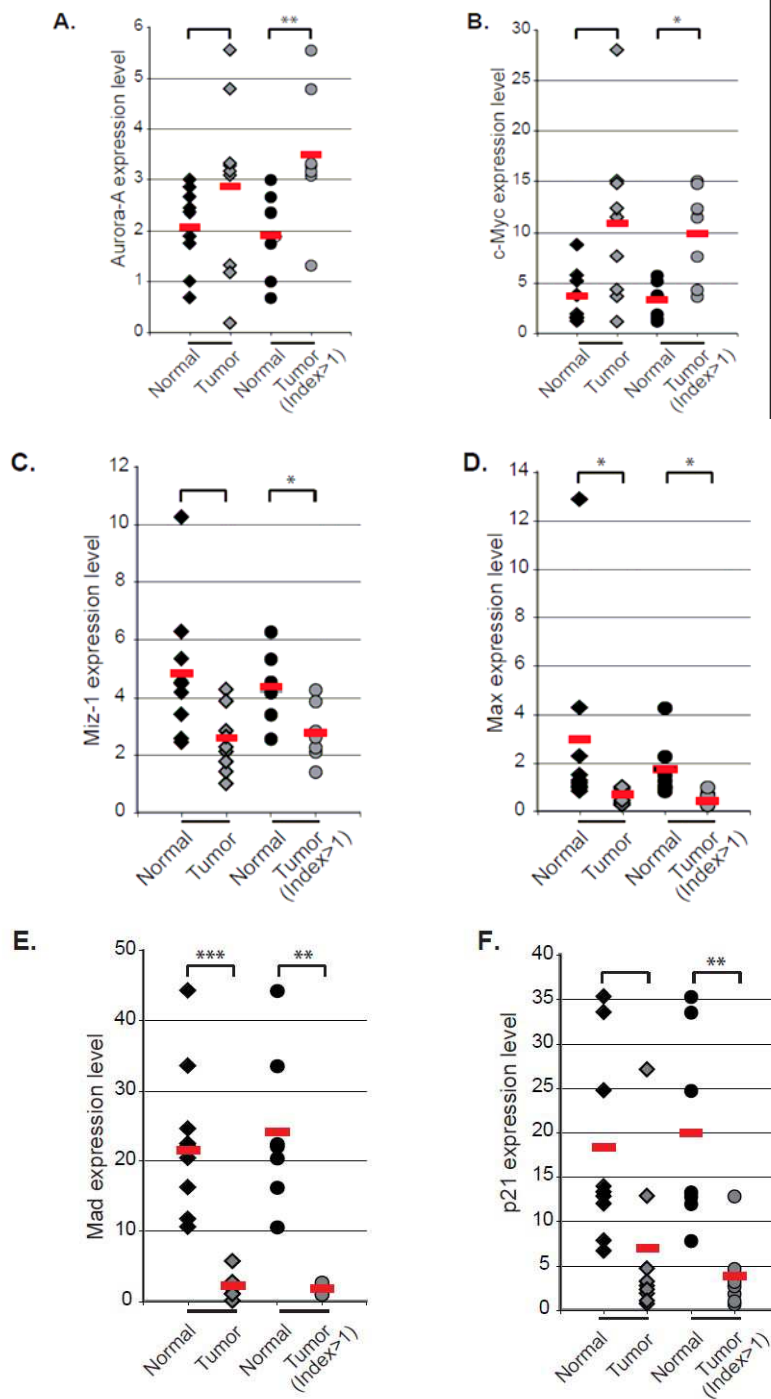


Figure 42 | Perte de l'expression de miz-1, mad et p21 et surexpression de myc et Aurora A au sein des tissus de tumeurs colorectales

A-F : l'expression des ARN messagers d'Aurora A, myc, miz-1, Max, mad et p21 a été caractérisée par des expériences de PCR quantitatives dans les échantillons tumoraux de patients atteints de cancers colorectaux. Dans chaque cas, l'expression des ARNm a été évaluée dans le tissu normal ou dans le tissu tumoral correspondant.

◆ Tous les tissus normaux ont été comparés aux tissus sains

● Les tissus normaux ont été comparés aux tissus des tumeurs possédant de l'instabilité génomique (index > 1)

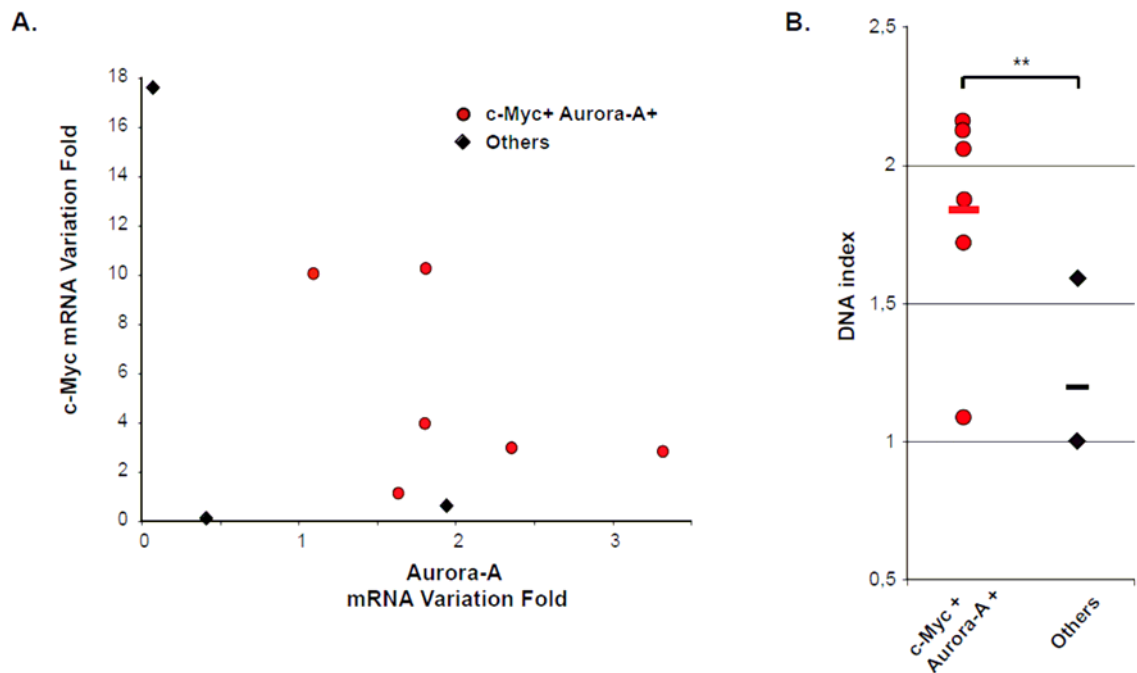


Figure 43 | la surexpression d'Aurora A et de myc est corrélée à une instabilité génomique dans les tumeurs colorectales

A : Les ARNm de myc et d'Aurora A ont été quantifiés et les tumeurs présentant une surexpression de myc et d'Aurora A ont été représentées en rouge. 6 des 7 tumeurs surexprimant myc possédaient en même temps un taux élevé d'Aurora A

B : L'index d'instabilité génomique des tumeurs exprimant un taux élevé de myc et d'Aurora est comparé à celui des autres tumeurs.

Partie III :

Etude des partenaires de STAT3 suite aux dommages de l'ADN induits par l'inhibition des topoisomérases de type I

Les cibles de STAT3 lorsque qu'elle est phosphorylée sur son résidu sérine 727 semblent donc être différentes de celles connues pour le dimère de STAT3 tyrosine 705. L'activité transcriptionnelle de STAT3 pourrait donc être modifiée suivant le résidu phosphorylé et nous pensons, que les interactions protéiques du facteur de transcription sont probablement différentes de celles établies lors de sa phosphorylation sur la tyrosine. De plus, la protéine n'étant pas phosphorylée sur la tyrosine, le facteur de transcription ne peut certainement pas se dimériser et nous pouvons supposer que STAT3 nécessite alors d'être associée avec un partenaire pour être transloquée dans le noyau. Nous avons donc cherché à découvrir de nouvelles cibles potentielles de STAT3, ceci par l'intermédiaire de deux techniques de protéomiques : la technique du double hybride ainsi que celle de spectrométrie de masse.

1. Détection de l'interaction STAT3/DDB2

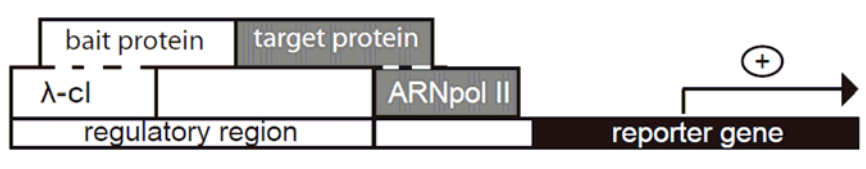


Figure 44 | Représentation de la technique du double hybride

La technique du double hybride consiste à exprimer dans une bactérie, une protéine appât et une protéine cible. La protéine appât est fusionnée avec le répresseur bactériophage λ (λ cl) alors que la protéine cible est fusionnée avec le domaine alpha de l'ARN polymérase. La liaison des 2 protéines recombinantes active la transcription du gène rapporteur, HIS3 qui permet la croissance des bactéries en milieu dépourvu d'histidine. Cette protéine est très faiblement exprimée dans les bactéries utilisées et confère donc un moyen de sélection. Un deuxième gène rapporteur est transcrit dans les mêmes conditions et confère aux bactéries une résistance à la streptomycine. L'interaction de deux protéines permet donc aux bactéries de pousser sur un milieu dépourvu d'histidine contenant de la streptomycine.

Dans notre modèle, la protéine appât clonée avec λ cl correspond au domaine c-terminal de STAT3 qui contient les deux sites de phosphorylation de STAT3 et notamment le résidu sérine 727. Les séquences d'ADN sont clonées dans un plasmide pBT qui possède un gène de résistance au chloramphénicol. La protéine cible correspond aux protéines de cellules LS174T traitées au sn38. En effet une banque d'ADNc a été créée à partir des ARNm exprimés par la cellule suite au traitement. Les séquences d'ADN sont clonées dans un plasmide pTRG qui

possède un gène de résistance à la tétracycline. Les bactéries sont transformées avec les deux plasmides dont les deux gènes de résistance servent de contrôle pour vérifier la transformation (Figure 44).

Lorsque les gènes rapporteurs sont transcrits et que les bactéries poussent en milieu dépourvu d’histidine mais contenant de la streptomycine, le plasmide pTRG va être extrait. La séquence cible va être isolée puis grâce à une analyse bioinformatique elle va être identifiée. Cette technique du double hybride (Figure 44), expérience réalisée par Marie-Laure Gervais, a permis d’identifier 93 protéines pouvant interagir avec STAT3 (annexe 1) (Figures 45 et 46).

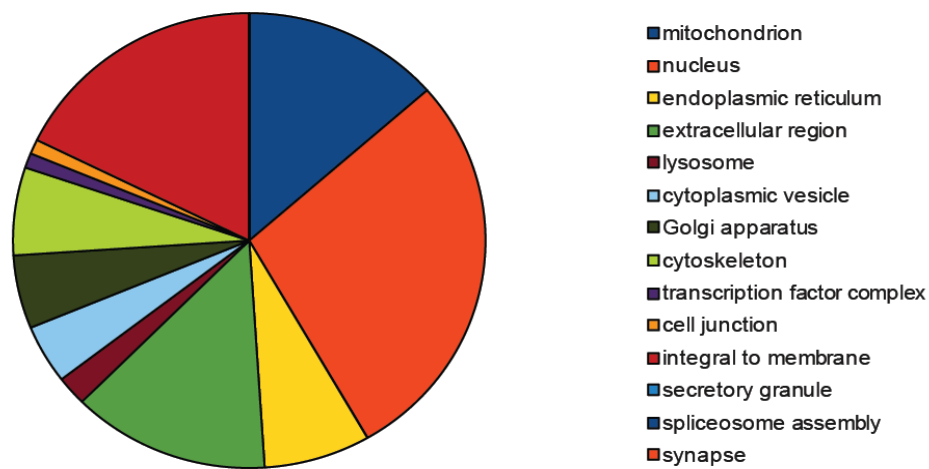


Figure 45 | Répartition dans les compartiments cellulaires des protéines identifiées par la technique du double hybride (par le logiciel GoMiner)

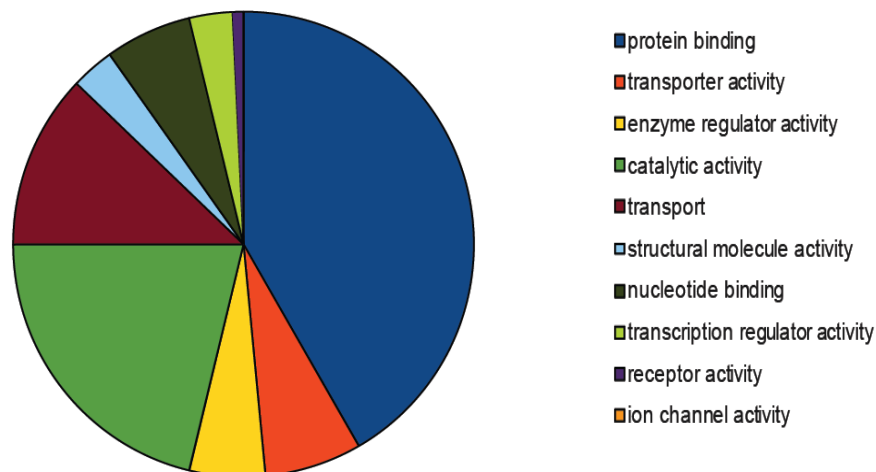


Figure 46 | Répartition des protéines identifiées par la technique du double hybride, suivant leurs fonctions biologiques (par le logiciel GoMiner)

Une protéine a particulièrement retenu notre attention, la protéine DDB2 en raison de son implication dans les dommages de l’ADN. DDB2 (damaged DNA-binding protein)

permet de recruter des facteurs du système NER au niveau des lésions de l'ADN via son interaction avec XPA et RPA (Wakasugi et al., 2001). Son association avec la protéine CBP va ensuite permettre le remodelage de la chromatine. Des mutations de cette protéine aboutissent à un système de réparation déficient qui conduit à la formation de cancers principalement de la peau (Sugasawa et al., 1998). La perte de DDB2 est aussi retrouvée dans des tumeurs colorectales (Kaiser et al., 2007). Des travaux plus récents mettent en avant un nouveau rôle pour la protéine DDB2. En effet, des cellules déficientes en DDB2 deviennent résistantes à l'apoptose suite à des dommages de l'ADN bien qu'il y ait une activation de p53 et de gènes pro-apoptotiques. Ceci s'expliquerait par un arrêt du cycle cellulaire dû à l'accumulation de p21 dans la cellule (Bagchi and Raychaudhuri) (Figure 47).

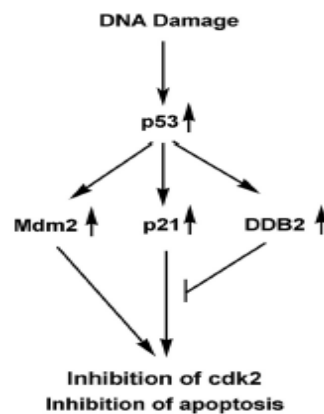


Figure 47 | Modèle d'induction de l'apoptose par DDB2

Dans les cellules exprimant DDB2, l'activité de cdk2 est inhibée par une augmentation du taux de p21 ainsi que par la surexpression de Mdm2. L'induction de DDB2 par p53 favorise l'entrée en apoptose des cellules (Stoyanova et al., 2009a).

Par la suite, l'analyse de DDB2 a mis en évidence un autre rôle de la protéine. Son étude a montré que la perte d'expression de la protéine bloquait l'entrée en sénescence des cellules suite à un stress, entraînant la formation de cassures de l'ADN. En effet, l'inhibition de DDB2 entraîne une perte de l'accumulation des ROS normalement nécessaire à l'induction de la sénescence précoce (Roy et al.). DDB2 possède la capacité de se fixer sur le promoteur de gènes antioxydants comme la catalase et MnSOD pour réprimer leur transcription en permettant le recrutement de Cul4A et en conduisant à la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (Roy et al.). En absence de DDB2, les deux gènes vont être transcrits entraînant ainsi une perte de l'accumulation des ROS. Deux rôles importants de

DDB2 ont pu être mis en évidence dans l'induction des systèmes de réparation et dans le contrôle du taux de radicaux libres.

Nous avons alors émis l'hypothèse que DDB2 pourrait se lier à STAT3 pour former une plateforme de réparation. Ceci permettrait son recrutement au niveau des zones de cassures de l'ADN. Son deuxième rôle qui implique DDB2 dans la transcription de gènes antioxydant et sa participation au phénotype de sénescence pourrait aussi expliquer sa liaison à STAT3. Dans notre modèle, STAT3 pourrait permettre à DDB2 d'aller se fixer sur ses gènes cibles pour favoriser l'entrée en sénescence en réponse au Sn38.

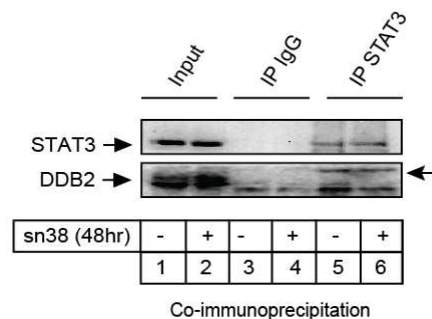


Figure 48 | STAT3 interagit avec DDB2

Des cellules HT29 ont été traitées ou non pendant 72h au Sn38 (5ng/ml). A partir des extraits nucléoplasmiques contenant la chromatine, nous avons immunoprécipité la protéine STAT3, puis la protéine DDB2 a ensuite été révélée par western blot à l'aide d'un anticorps spécifique (n=2).

Afin de vérifier, si STAT3 et DDB2 pouvaient interagir, nous avons réalisé une expérience de co-immunoprécipitation sur un extrait contenant le nucléoplasme et la chromatine. Ces expériences nous ont permis de montrer une interaction entre les protéines (Figure 48). STAT3 et DDB2 pourraient donc se fixer au niveau de l'ADN pour induire l'expression ou la répression de gènes cibles de STAT3. Afin de vérifier, la fixation de STAT3 et de DDB2 sur l'ADN, il serait intéressant de réaliser des expériences de gel retard ou d'immunoprécipitation de chromatine.

Ces résultats qui restent encore à être confirmés semblent témoigner d'une interaction entre les protéines STAT3 et DDB2 mais elle s'avère cependant constitutive. Cependant, nous n'avons pas vérifié si l'interaction entre la forme phosphorylée de STAT3 et DDB2 augmentait après traitement. Nous pensons que STAT3 et DDB2 forment initialement un

complexe dans le noyau, et qu'une fois phosphorylée sur son résidu sérine, ce complexe pourrait se fixer sur l'ADN. DDB2 pourrait alors recruter les répresseurs de la transcription comme Cul4A et permettre la triméthylation de l'histone H3 comme décrit pour le gène d'Aurora, pour entraîner l'entrée en sénescence. Le complexe STAT3 phosphorylé sur la sérine 727 et DDB2 pourrait permettre suite aux dommages de l'ADN d'inhiber des gènes prolifératifs pour permettre l'entrée en sénescence et permettre ainsi la réparation des dommages (Figure 49).

Mais DDB2 intervient aussi dans les systèmes de réparation de l'ADN, il est donc possible de penser que le complexe STAT3/DDB2 pourrait former une plateforme de réparation qui serait recrutée sur l'ADN au niveau des zones de cassures de l'ADN induites par le Sn38, après la phosphorylation du facteur de transcription STAT3. De plus des expériences de spectrométrie de masse qui seront développées ultérieurement ont montré une possible interaction de STAT3 avec la protéine H2AX. Ce complexe pourrait permettre la réparation des dommages induits par le Sn38, entraînant ainsi une résistance au traitement (Figure 50).

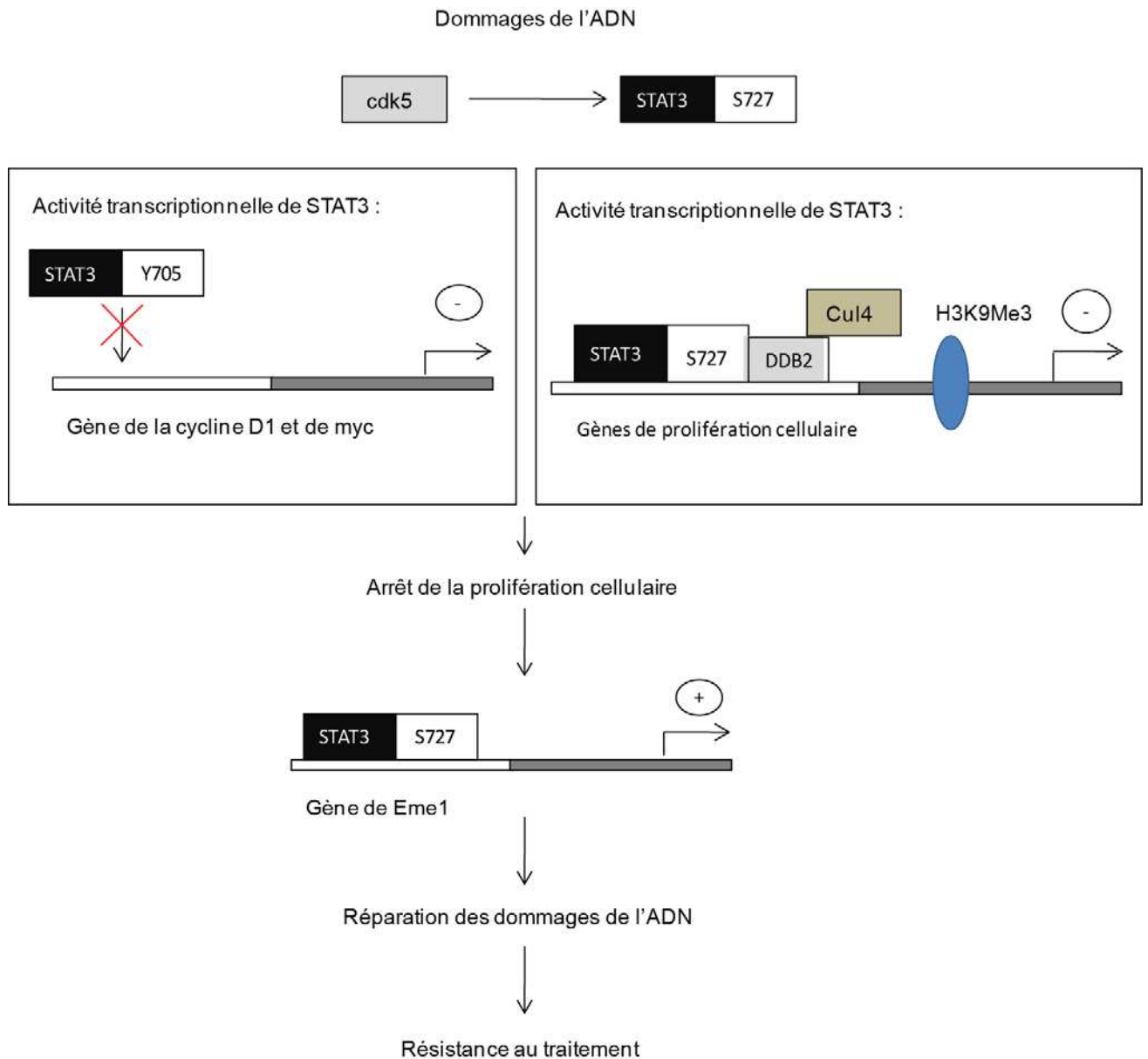


Figure 49 | 1^{ère} hypothèse : STAT3 S727 pourrait interagir avec DDB2 ce qui conduirait à l'entrée en sénescence suite à l'inhibition des topoisomérases

Nous avons émis l'hypothèse que suite au traitement au Sn38, STAT3 phosphorylée sur la sérine 727 pourrait se lier à DDB2 pour inhiber la transcription des gènes de prolifération cellulaire en recrutant Cul4 et en entraînant la triméthylation de l'histone H3 pour induire un arrêt du cycle, en parallèle de la perte de l'expression de la cycline D1 et de myc. STAT3 pourrait alors se fixer sur le gène d'Eme1 pour promouvoir la réparation des dommages de l'ADN, entraînant une résistance au traitement.

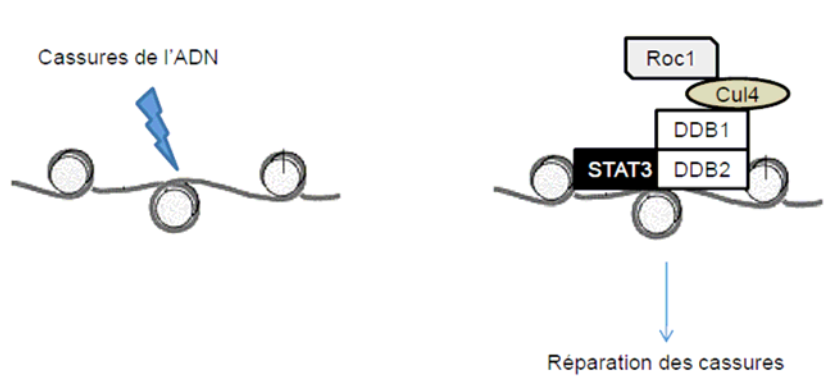


Figure 50 | 2^{ème} hypothèse : STAT3 S727 pourrait interagir avec DDB2 pour former une plateforme de réparation de l'ADN

Nous avons émis une deuxième hypothèse selon laquelle STAT3 et DDB2 pourraient interagir ensemble au niveau des zones de cassures induites par le Sn38 pour recruter les membres des complexes de réparation. La résistance au traitement pourrait être due à la réparation des dommages par cette plateforme. D'après les résultats obtenus dans la partie suivante, il est possible de penser que ce complexe pourrait être associé à l'histone H2AX.

2. Détection de l'interaction STAT3/ASPP2

Dans un second temps, une approche globale par spectrométrie de masse a été utilisée pour caractériser de nouvelles cibles de STAT3. Pour cela nous avons récupéré les partenaires de STAT3 en immunoprécipitant ce facteur après un traitement au Sn38. Les protéines ont été digérées par de la trypsine, les peptides ainsi obtenu ont été séparés selon leur hydrophobie à l'aide d'une nanochromatographie en phase liquide et déposés sur une plaque Maldi et analysés par spectrométrie de masse Maldi-Tof-Tof. Les profils peptidiques permettent d'identifier les différentes protéines contenues dans l'échantillon. Grâce à cette technique, nous avons ainsi pu identifier de nouveaux partenaires potentiels de STAT3. 140 protéines ont ainsi pu être mises en évidence (Annexe 2) (Figure 51 et 52). Nous nous sommes intéressés, plus particulièrement aux protéines faisant partie des systèmes de réparation de l'ADN, de la mitose et de l'apoptose comme par exemple ASPP2, DNA-PK, H2AX, INCENP, CEP250 (Tableau I). Suite à l'identification de ces protéines, des expériences doivent être réalisées afin de vérifier l'interaction de ces protéines avec STAT3. Ces nouveaux partenaires pourraient éventuellement être spécifiques de la réponse au Sn38.

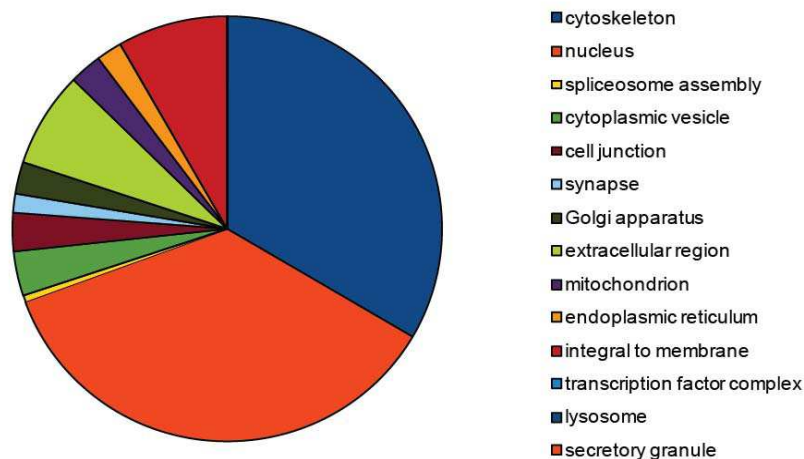


Figure 51 | Répartition dans les compartiments cellulaires des protéines identifiées par la technique de spectrométrie de masse (par le logiciel GoMiner)

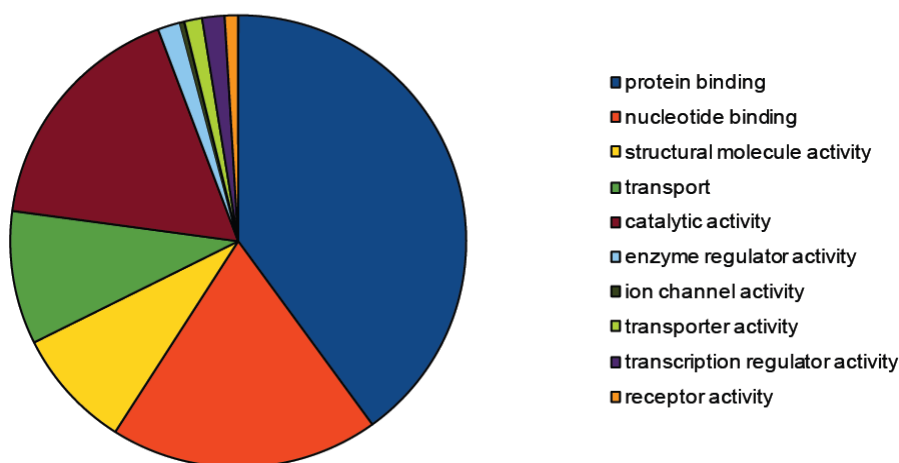


Figure 52 | Répartition des protéines identifiées par la technique de spectrométrie de masse, suivant leurs fonctions biologiques (par le logiciel GoMiner)

ASPP2 (Apoptosis-stimulating of p53 protein 2) est une protéine caractérisée comme un partenaire de p53. La famille des ASPP contient trois membres ASPP1, ASPP2 et iASPP qui se lient toutes au domaine de fixation à l'ADN de p53. ASPP1 et ASPP2 permettent de favoriser l'apoptose en conférant à p53 une meilleure affinité pour les promoteurs des gènes de l'apoptose comme Bax et PIG3 (Samuels-Lev et al., 2001). IASPP quant à lui protège de l'apoptose en empêchant la fixation de p53 sur ces promoteurs. L'association du facteur de transcription avec les protéines ASPP, permet donc un ciblage de p53. Il est possible de penser que la protéine ASPP2 permettrait de favoriser la fixation de STAT3 sur de nouveaux gènes cibles.

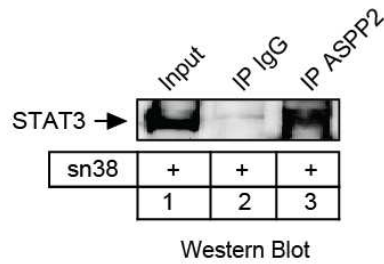
Dans un premier temps nous avons cherché à vérifier l'interaction par des expériences de co-immunoprécipitation de STAT3 avec ASPP2 ainsi que par des expériences de pull down. Ces deux expériences ont permis de confirmer l'interaction entre les deux protéines après traitement au Sn38 (Figure 53). Cependant, n'ayant réalisé cette expérience que suite à l'inhibition des topoisomérases, il nous est impossible de savoir si ce complexe est induit après traitement. Les expériences de pull-down nous permettent de conclure qu'ASPP2 pourrait se lier à la partie c-terminale de STAT3 qui contient les sites de phosphorylation du facteur de transcription (Figure 53). Seule la phosphorylation du résidu sérine est observable après traitement, nous pouvons donc penser qu'ASPP2 et STAT3 pourraient interagir par l'intermédiaire de cette phosphorylation.

Nom		Accession	Fonctions
Inner Centrosome protein	INCENP	Q9NQS7	INCENP est localisée le long des chromosomes dans les 1eres étapes de la mitose. Elle migre au niveau des centrosomes pendant la métaphase. (Earnshaw WC and Cooke CA, 1991) Cdk1 phosphoryle INCENP qui permet le recrutement et l'activation de la kinase Aurora B et le recrutement de plk1 au niveau des kinétochores. (Hidemasa Goto et al. 2006)
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	P78527	PRKDC est une serine/thréonine kinase qui intervient dans la détection des cassures double brin de l'ADN ainsi que dans le recrutement des protéines de réparation et elle phosphoryle l'histone H2AX sur la sérine 139. (Shao, RG et al. 1999)
Histone H2AX	H2AX	P16104	Suite aux cassures de l'ADN, l'histone est phosphorylé sur la sérine 139 par ATM/ATR ou la DNA-PK et intervient alors dans la réparation de l'ADN. pH2AX est localisé au niveau des cassures de l'ADN où il initie le recrutement des protéines impliquées dans la réparation des dommages de l'ADN comme Rad50. (Paull TT et al. 2000)
Apoptosis-stimulating of p53 protein 2	ASPP2	Q13625	ASPP2 régule l'apoptose et la croissance cellulaire en favorisant l'interaction de p53 avec le promoteur de ses gènes cibles. cette protéine inhibe aussi l'interaction de APPBP1 avec Cul1 et NEDD8, ce qui entraîne une perte de l'induction de l'apoptose normalement initiée par APPBP1 ce qui provoque un arrêt en phase G2/M. (Chen, Y et al. 2003)
Centrosome-associated protein CEP250	CEP250	Q9BV73	CEP250 est associé au centrosome et peut être phosphorylé par la protéine NEK2 (NIMA-related kinase 2) ce qui entraîne sa dissociation du centrosome. CEP250 est nécessaire à l'adhésion des centrioles lors de l'interphase. (Faragher AJ et al. 2004)

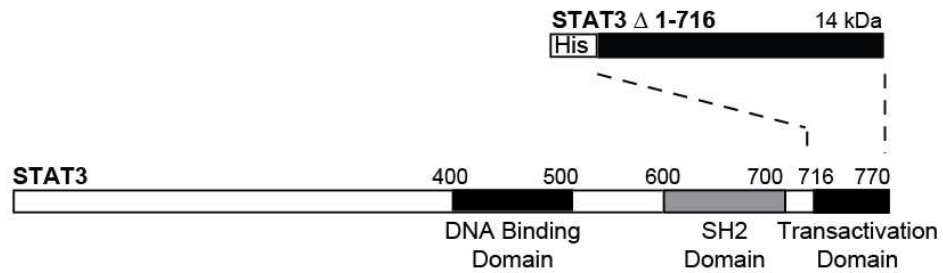
Tableau I | Identification des partenaires de STAT3 par spectrométrie de masse

Le facteur de transcription STAT3 a été immunoprécipité avec un anticorps reconnaissant la forme totale de la protéine dans un lysat cellulaire issu de cellules HT29 traitées pendant 72h au Sn38 5ng/ml. Les protéines du complexe ont été réduites puis digérées par la trypsine. Les échantillons ont été évaporés à l'aide d'un speed-vac puis repris dans 20µl de TFA à 0,1% pour mettre la séparation des peptides sur une chaine Nano-LC. L'analyse par le logiciel Mascot des résultats de l'analyse spectrométrique des peptides a permis d'identifier 140 protéines (annexe 2). Nous nous sommes intéressés, plus particulièrement aux protéines faisant partie des systèmes de réparation de l'ADN, de la mitose et de l'apoptose.

A.



B.



C.

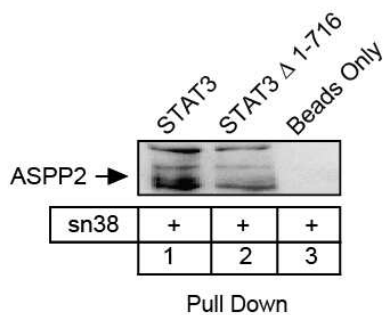


Figure 53 | ASPP2 interagit avec STAT3 après l'inhibition des topoisomérases

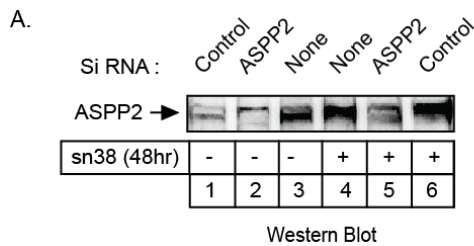
A : Les cellules HT29 sont traitées avec du Sn38 5ng/ml pendant 48 h. La protéine ASPP2 est immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps spécifique et l'échantillon est analysé par western blot avec un anticorps spécifique dirigé contre la forme totale de STAT3 (n=3).

B : Représentation des protéines de fusion utilisées pour le pull down.

C: Le lysat cellulaire total issu de cellules traitées au Sn38 pendant 48h avec la forme entière de la protéine STAT3-histidine ou avec la partie c-terminale de STAT3 (STAT3 Δ1-716-histidine) immobilisées sur des billes de nickel. Les échantillons ont été séparés sur gel d'acrylamide et l'interaction avec ASPP2 a été vérifiée par western-blot avec un anticorps dirigé contre ASPP2 (n=2).

Nous avons vu précédemment que l'inhibition des topoisomérases entraîne un arrêt des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire. Nous avons donc étudié les conséquences d'une perte d'ASPP2 sur la réponse des cellules au sn38, ceci par des expériences d'extinction de la protéine ASPP2 en suivant le profil du cycle cellulaire par cytométrie en flux (Figure 54). Nous avons constaté que l'inhibition d'ASPP2 entraîne une accumulation de la population cellulaire en phase G1 et diminution en phase G2/M après traitement. Ceci nous

laisse penser que la perte d'ASPP2 dans nos cellules après traitement au Sn38 entrainerait une perte du blocage en phase G2/M.



B.

Table 1 : Cell percentage in the different phase of the cell cycle

	Sub G1	G1	S	G2/M	8N
None	3,5	81,2	3,1	9,7	1,3
Sn38	14	24,5	3,9	52,8	3,5
Si control	5,7	78,9	2,7	9,9	1,4
Si control + Sn38	13,1	18,4	3,7	59,5	3,6
Si ASPP2	8,4	77,2	3,3	8,5	1,5
Si ASPP2 + Sn38	27,6	31,1	2,9	34,1	2,9

C.

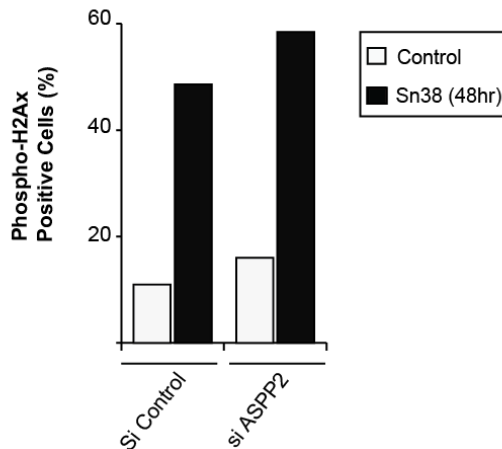


Figure 54 | ASPP2 entraine un arrêt en phase G2/M après inhibition des topoisomérases mais pas la réparation de l'ADN

A : Des cellules HT29 ont été transfectées avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre ASPP2 puis elles ont été traitées ou non avec du Sn38 5ng/ml pendant 48h. L'expression d'ASPP2 est contrôlée par western-blot.

B : Des cellules HT29 ont été transfectées avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre ASPP2 puis elles ont été traitées ou non avec du Sn38 5ng/ml pendant 48h. Le cycle cellulaire a été analysé par cytométrie en flux après marquage de l'ADN avec de l'iodure de propidium. Un tableau représentant le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle a ensuite été réalisé (n=2).

C : Des cellules HT29 ont été transfectées avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre ASPP2 puis elles ont été traitées ou non avec du Sn38 5ng/ml pendant 48h. Le marquage de l'histone γ H2AX des cellules a été analysé par cytométrie en flux après marquage avec un anticorps spécifique fluorescent (représentatif de 2 expériences).

Nous nous sommes ensuite demandés si la perte de l'expression d'ASPP2 modifiait les dommages de l'ADN après traitement au Sn38. Nous avons donc étudié le marquage de la protéine p-H2AX après l'inhibition d'ASPP2 avant et après traitement au Sn38 (Figure 54). La perte d'ASPP2 conduit une augmentation des dommages de 10% même en absence de traitement. Ces résultats ne sont pas aussi importants que ceux observés après inhibition de cdk5 ou de STAT3.

Pour conclure, les expériences de co-immunoprécipitation et de pull down semblent confirmer l'interaction entre STAT3 et ASPP2 mis en évidence par spectrométrie de masse. Les analyses des profils de facs obtenus après l'extinction d'ASPP2 permettent de remarquer que l'inhibition d'ASPP2 entraîne une perte du blocage des cellules en phase G2/M induit par le Sn38. Cependant la protéine ne s'avère pas être impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN. Nous émettons donc l'hypothèse suivant laquelle ASPP2 pourrait permettre de réguler l'activité transcriptionnelle de STAT3 au cours des dommages de l'ADN (Figure 55). Comme STAT3 phosphorylée sur la sérine 727 dans notre modèle n'est pas phosphorylé sur la tyrosine 705, la dimérisation de STAT3 est sûrement impossible et ASPP2 pourrait permettre au facteur de transcription de se fixer sur de nouvelles cibles, comme c'est le cas pour la protéine p53. La perte de l'expression d'ASPP2 semble en effet modifier la réponse des cellules aux inhibiteurs de topoisomérasés, en réduisant l'arrêt en phase G2/M. Cependant, le fait que les dommages de l'ADN ne soit pas plus importants suite à l'inhibition d'ASPP2 laisse à penser que d'autres facteurs pourraient permettre de recruter STAT3 sur le promoteur d'Eme1 par exemple.

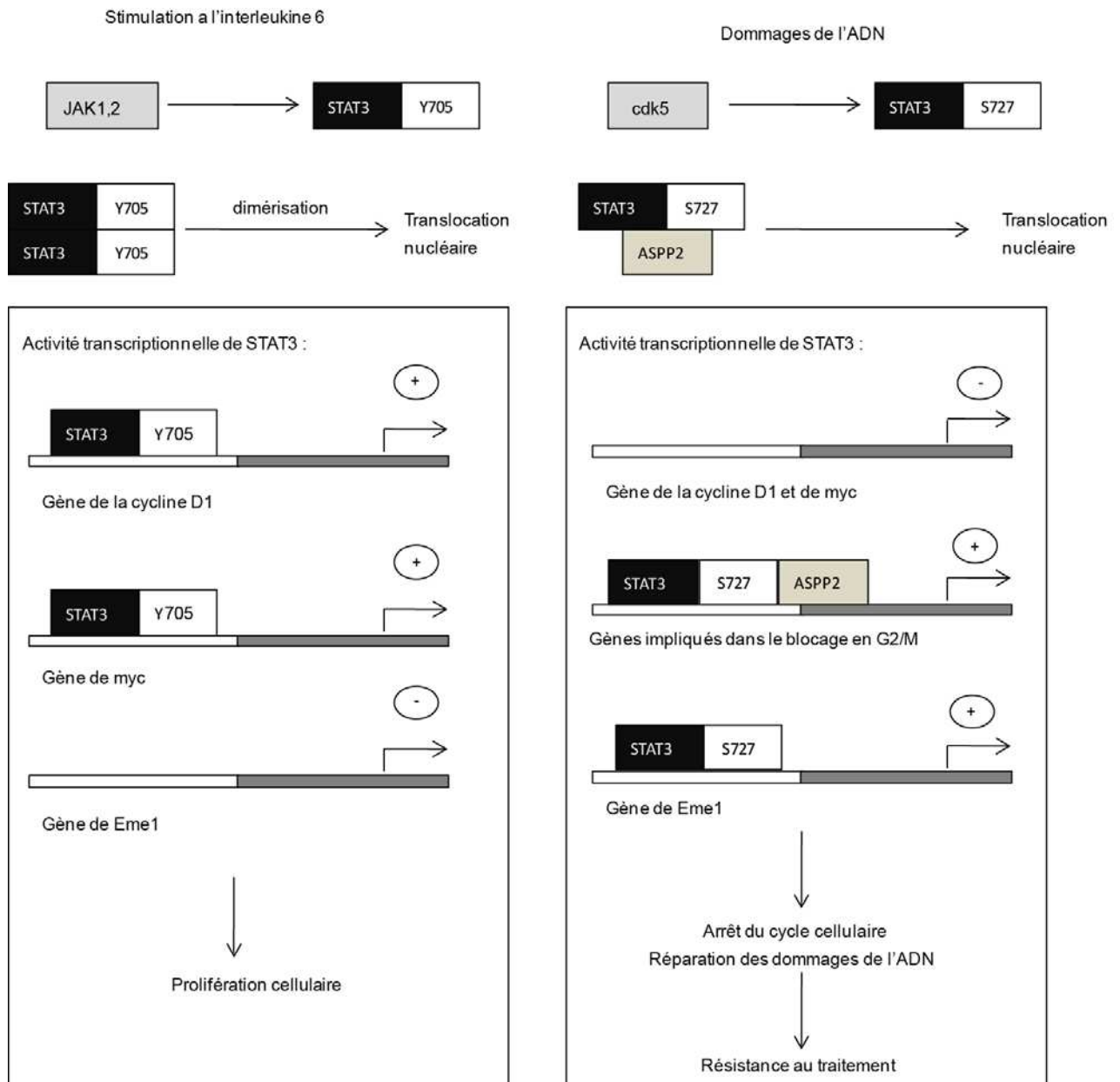


Figure 55 | ASPP2 pourrait interagir avec STAT3 pour modifier son affinité pour de nouveaux gènes cibles

En phase G1/S, STAT3 est phosphorylée sur la tyrosine 705 ce qui entraîne sa dimérisation et sa translocation nucléaire. STAT3 peut alors se fixer sur le promoteur de ces gènes cibles comme le gène de myc ou de la cycline D1. Suite aux dommages de l'ADN, cdk5 phosphoryle STAT3 sur la sérine 727. L'association du facteur de transcription avec la protéine ASPP2 pourrait permettre un ciblage de STAT3 vers de nouveaux gènes cibles conduisant à l'arrêt en phase G2/M. En parallèle, STAT3 pourrait conduire à la réparation de l'ADN en se fixant sur le promoteur d'Eme1 et à la résistance au traitement. ASPP2 serait donc un élément important de la réponse cellulaire au Sn38.

Annexe 1 | liste des protéines identifiées par l'expérience de double hybride

Nom	accession
activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67) (ATF4)	P18848
adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit (AP2S1)	P53680
adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit (AP3S2)	P59780
AKT1 substrate 1 (proline-rich) (AKT1S1)	Q96B36
aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1 (ALDH3A1)	Q6PKA6
amplified in osteosarcoma (OS9)	Q13438
annexin A1 (ANXA1)	P04083
anterior pharynx defective 1 homolog A (C. elegans) (APH1A)	Q96BI3
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C3 (subunit 9) (ATP5G3)	P48201
ATPase family, AAA domain containing 4 (ATAD4),	Q9BU68
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide (ATP1B1)	P05026
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9 (ABCC9)	O60706
ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1 (ABCD1)	P33897
blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae)-like (BET1L)	Q9NYM9
BTG family, member 3 (BTG3)	Q14201
catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa (CTNNA1),	P35221
cathepsin D (CTSD)	P07339
CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 5 (CDC42EP5)	Q6NZY7
centromere protein L (CENPL) ou ring finger protein 7 (RNF7)	Q8N0S6 ou P29590
cholinergic receptor, muscarinic 3 (CHRM3) ou immunoglobulin superfamily, member 11 (IGSF11) ???? ?	
chromosome 20 open reading frame 4 (C20orf4)	Q9Y312
chromosome 3 open reading frame 10 (C3orf10)	Q8WUW1
chromosome 7 open reading frame 49 (C7orf49),	Q9BWK5
coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2 (CHCHD2)	Q9Y6H1
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A)	P38936
cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage) (CST3),	P01034
cytochrome c oxidase subunit VIIc (COX7C)	P15954
cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1 (CYP51A1) ou mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme A (MGAT4A) ou SIX homeobox 4 (SIX4)	
damage-specific DNA binding protein 2 (DDB2),	Q92466
deoxyguanosine kinase (DGUOK)	Q16854
DiGeorge syndrome critical region gene 6 (DGCR6)	Q14129
dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit (DPM2)	O94777
dual specificity phosphatase 23 (DUSP23)	Q9BVJ7
ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (putative function) (ENTPD6)	O75354
EP400 N-terminal like	Q6ZTU2
eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1)	P68104
eukaryotic translation elongation factor 1 gamma (EEF1G)	P26641
eukaryotic translation initiation factor 3, subunit D (EIF3D)	O15371
family with sequence similarity 54, member B (FAM54B)	Q9H019
ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1),	P02794
ferritin, light polypeptide (FTL)	P02792
gem (nuclear organelle) associated protein 7 (GEMIN7)	Q9H840
GIY-YIG domain containing 1 (GIYD1)	
glutathione peroxidase 1 (GPX1)	P07203
glutathione S-transferase pi (GSTP1)	P09211
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	P04406
granulin (GRN)	P28799

guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1 (GNB2L1)	P63244
histocompatibility (minor) 13 (HM13)	Q8TCT9
hypothetical protein LOC283871 (LOC283871),	
imup-1 mRNA for immortalization-upregulated protein 1,	Q9GZP8
isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) gamma (IDH3G)	P51553
jumonji domain containing 4 (JMJD4)	Q9H9V9
kallikrein-related peptidase 6 (KLK6)	Q92876
keratin 18 (KRT18),	Q96910
keratin 8 (KRT8)	Q96910
kinesin family member 3A (KIF3A)	Q9Y496
lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3) (LGALS3)	P17931
MARCKS-like 1 (MARCKSL1)	P49006
MICAL-like 1 (MICALL1)	Q8N3F8
microsomal glutathione S-transferase 1 (MGST1)	P10620
mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans) (MTCH1),	Q9NZJ7
nasal embryonic LHRH factor (NELF)	Q6X4W1
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8 (NEDD8)	Q15843
neural proliferation, differentiation and control, 1 (NPDC1)	Q9NQX5
N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG)	P29372
nuclear transport factor 2 (NUTF2)	P61970
ornithine decarboxylase antizyme 1 (OAZ1)	P54368
patatin-like phospholipase domain containing 7 (PNPLA7),	Q6ZV29
peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA)	P62937
peroxiredoxin 1 (PRDX1)	Q06830
peroxiredoxin 2 (PRDX2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	P32119
placenta-specific 8 (PLAC8)	Q9NZF1
proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein (PRELP)	P51888
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3 (PSMD3)	O43242
RNA binding protein S1, serine-rich domain (RNPS1)	Q15287
S100 calcium binding protein A6 (S100A6)	P06703
SAPK substrate protein 1 (LOC51035)	Q04323
sequestosome 1 (SQSTM1)	Q13501
small EDRK-rich factor 2 (SERF2)	P84101
solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2 (SLC12A2)	P55011
stratifin (SFN)	P31947
superoxide dismutase 3, extracellular (SOD3)	P08294
thymosin beta 4, X-linked (TMSB4X),	P62328
transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast) (TMED10)	P49755
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9 (TNFSF9)	P41273
tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide (YWHAQ)	Q53RR5
ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 (UBA52)	Q3MIH3
upstream transcription factor 1 (USF1)	P22415
WD repeat and SOCS box-containing 2 (WSB2)	Q9NYS7
within bgcn homolog (Drosophila) (WIBG), mRNA	Q9BRP8
zinc finger with KRAB and SCAN domains 5 (ZKSCAN5)	Q9Y2L8

Annexe 2 | liste des protéines identifiées par l'expérience de spectrométrie de masse

Nom	Accession
Myosin-14 OS; GN=MYH14 PE=1 SV=1	Q7Z406
Myosin-9 OS; GN=MYH9 PE=1 SV=4	P35579
Actin, cytoplasmic 2 OS; GN=ACTG1 PE=1 SV=1	P63261
Myosin-VI OS; GN=MYO6 PE=1 SV=4	Q9UM54
Myosin-Ic OS; GN=MYO1C PE=1 SV=1	O00159
Myosin regulatory light chain MRLC2 OS; GN=MYLC2B PE=1 SV=2	O14950
Myosin regulatory light chain MRLC3 OS; GN=MRLC3 PE=1 SV=2	P19105
LIM domain and actin-binding protein 1 OS; GN=LIMA1 PE=1 SV=1	Q9UHB6
Myosin light polypeptide 6 OS; GN=MYL6 PE=1 SV=2	P60660
General transcription factor II-I OS; GN=GTF2I PE=1 SV=2	P78347
Tubulin alpha-1B chain OS; GN=TUBA1B PE=1 SV=1	P68363
Tubulin alpha-4A chain OS; GN=TUBA4A PE=1 SV=1	P68366
Tubulin alpha-1C chain OS; GN=TUBA1C PE=1 SV=1	Q9BQE3
Myosin-10 OS; GN=MYH10 PE=1 SV=2	P35580
Signal transducer and activator of transcription 3 OS; GN=STAT3 PE=1 SV=2	P40763
Tubulin beta chain OS; GN=TUBB PE=1 SV=2	P07437
Clathrin heavy chain 1 OS; GN=CLTC PE=1 SV=5	Q00610
Myosin-Id OS; GN=MYO1D PE=1 SV=2	O94832
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 OS; GN=HNRNPUL1 PE=1 SV=2	Q9BUJ2
Histone H2A type 1-E OS; GN=HIST1H2AE PE=1 SV=2	P28001
Histone H2A type 1-B OS; GN=HIST1H2AB PE=1 SV=2	P04908
Histone H2A type 1-J OS; GN=HIST1H2AJ PE=1 SV=3	Q99878
Histone H2A type 1-H OS; GN=HIST1H2AH PE=1 SV=3	Q96KK5
Histone H2A type 1-D OS; GN=HIST1H2AD PE=1 SV=2	P20671
Histone H2A type 1 OS; GN=HIST1H2AG PE=1 SV=2	P0C0S8
Villin-1 OS; GN=VIL1 PE=1 SV=3	P09327
LIM domain only protein 7 OS; GN=LMO7 PE=1 SV=2	Q8WWI1
Actin-related protein 3 OS; GN=ACTR3 PE=1 SV=3	P61158
Stress-70 protein, mitochondrial OS; GN=HSPA9 PE=1 SV=2	P38646
Histone H4 OS; GN=HIST1H4A PE=1 SV=2	P62805
Elongation factor 1-alpha 1 OS; GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	P68104
Putative elongation factor 1-alpha-like 3 OS; GN=EEF1AL3 PE=5 SV=1	Q5VTE0
Beta-actin-like protein 2 OS; GN=ACTBL2 PE=1 SV=2	Q562R1
Histone H3.1 OS; GN=HIST1H3A PE=1 SV=2	P68431
Coiled-coil domain-containing protein 71 OS; GN=CCDC71 PE=2 SV=2	Q8IV32
Titin OS; GN=TTN PE=1 SV=2	Q8WZ42
Tropomyosin beta chain OS; GN=TPM2 PE=1 SV=1	P07951
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS; GN=KRT1 PE=1 SV=5	P04264
Histone H2B type 2-E OS; GN=HIST2H2BE PE=1 SV=3	Q16778
Histone H2B type 1-C/E/F/G/I OS; GN=HIST1H2BC PE=1 SV=3	P62807

Histone H2B type 1-J OS; GN=HIST1H2BJ PE=1 SV=3	P06899
Histone H2B type 1-K OS; GN=HIST1H2BK PE=1 SV=3	O60814
Histone H2B type 1-M OS; GN=HIST1H2BM PE=1 SV=3	Q99879
Histone H2B type 1-L OS; GN=HIST1H2BL PE=1 SV=3	Q99880
Histone H2B type 1-N OS; GN=HIST1H2BN PE=1 SV=3	Q99877
Histone H2B type 1-D OS; GN=HIST1H2BD PE=1 SV=2	P58876
Histone H2B type 1-H OS; GN=HIST1H2BH PE=1 SV=3	Q93079
Histone H2B type 1-B OS; GN=HIST1H2BB PE=1 SV=2	P33778
Histone H2B type 1-O OS; GN=HIST1H2BO PE=1 SV=3	P23527
Histone H2B type 3-B OS; GN=HIST3H2BB PE=1 SV=3	Q8N257
Histone H2B type 2-F OS; GN=HIST2H2BF PE=1 SV=3	Q5QNW6
Histone H2B type F-S OS; GN=H2BFS PE=1 SV=2	P57053
Annexin A2 OS; GN=ANXA2 PE=1 SV=2	P07355
Putative annexin A2-like protein OS; GN=ANXA2P2 PE=5 SV=2	A6NMY6
RNA-binding protein FUS OS; GN=FUS PE=1 SV=1	P35637
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS; GN=HNRNPH1 PE=1 SV=4	P31943
Myosin-Vb OS; GN=MYO5B PE=1 SV=2	Q9ULV0
Heat shock cognate 71 kDa protein OS; GN=HSPA8 PE=1 SV=1	P11142
Thyroid hormone receptor-associated protein 3 OS; GN=THRAP3 PE=1 SV=2	Q9Y2W1
Actin-related protein 2 OS; GN=ACTR2 PE=1 SV=1	P61160
Alpha-actinin-4 OS; GN=ACTN4 PE=1 SV=2	O43707
Myosin-Ie OS; GN=MYO1E PE=2 SV=1	Q12965
Protein TFG OS; GN=TFG PE=1 SV=1	Q92734
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS; GN=KRT10 PE=1 SV=4	P13645
Lamin-A/C OS; GN=LMNA PE=1 SV=1	P02545
Tropomodulin-3 OS; GN=TMOD3 PE=1 SV=1	Q9NYL9
ANKRD26-like family C member 1A OS; GN=A26C1A PE=1 SV=3	Q6S8J3
ANKRD26-like family C member 1B OS; GN=A26C1B PE=1 SV=1	A5A3E0
Myosin-7B OS; GN=MYH7B PE=2 SV=2	A7E2Y1
DNA topoisomerase 2-alpha OS; GN=TOP2A PE=1 SV=3	P11388
Myosin-Vc OS; GN=MYO5C PE=1 SV=1	Q9NQX4
F-actin-capping protein subunit beta OS; GN=CAPZB PE=1 SV=4	P47756
Gelsolin OS; GN=GSN PE=1 SV=1	P06396
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS; GN=GAPDH PE=1 SV=3	P04406
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 OS; GN=ARPC4 PE=1 SV=3	P59998
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS; GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2	P22626
Putative tropomyosin alpha-3 chain-like protein OS; PE=5 SV=2	A6NL28
Galectin-4 OS; GN=LGALS4 PE=1 SV=1	P56470
Src substrate cortactin OS; GN=CTTN PE=1 SV=1	Q14247
Target of Myb protein 1 OS; GN=TOM1 PE=1 SV=2	O60784
Tropomyosin alpha-3 chain OS; GN=TPM3 PE=1 SV=1	P06753
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS; GN=PPIA PE=1 SV=2	P62937
Peptidylprolyl cis-trans isomerase A-like 4B OS; GN=PPIAL4B PE=2 SV=1	Q9Y536
Toll-interacting protein OS; GN=TOLLIP PE=1 SV=1	Q9H0E2
Fragile X mental retardation 1 protein OS; GN=FMR1 PE=1 SV=1	Q06787

Myosin-15 OS; GN=MYH15 PE=1 SV=4	Q9Y2K3
Catechol O-methyltransferase OS; GN=COMT PE=1 SV=2	P21964
Inner centromere protein OS; GN=INCENP PE=1 SV=2	Q9NQS7
AT-hook-containing transcription factor 1 OS; GN=AHCTF1 PE=1 SV=2	Q8WYP5
Granulins OS; GN=GRN PE=1 SV=2	P28799
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS; GN=HSD17B4 PE=1 SV=3	P51659
Supervillin OS; GN=SVIL PE=1 SV=1	O95425
Zinc finger protein GLI1 OS; GN=GLI1 PE=1 SV=1	P08151
Myosin-I _f OS; GN=MYO1F PE=1 SV=2	O00160
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS; GN=PRKDC PE=1 SV=3	P78527
Splicing factor, arginine/serine-rich 3 OS; GN=SFRS3 PE=1 SV=1	P84103
Splicing factor, arginine/serine-rich 7 OS; GN=SFRS7 PE=1 SV=1	Q16629
Ig kappa chain C region OS; GN=IGKC PE=1 SV=1	P01834
Glycogen phosphorylase, brain form OS; GN=PYGB PE=1 SV=5	P11216
Myosin-I _b OS; GN=MYO1B PE=1 SV=3	O43795
Dynein heavy chain 11, axonemal OS; GN=DNAH11 PE=1 SV=2	Q96DT5
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 OS; GN=HNRNPH3 PE=1 SV=2	P31942
Nesprin-1 OS; GN=SYNE1 PE=1 SV=2	Q8NF91
Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 OS; GN=MDC1 PE=1 SV=3	Q14676
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS; GN=HNRNPU PE=1 SV=5	Q00839
Myosin-I _{Xb} OS; GN=MYO9B PE=1 SV=2	Q13459
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS; GN=DDOST PE=1 SV=2	P39656
Hypoxia-inducible factor 3 alpha OS; GN=HIF3A PE=1 SV=2	Q9Y2N7
40S ribosomal protein S26 OS; GN=RPS26 PE=1 SV=3	P62854
Putative 40S ribosomal protein S26-like 1 OS; GN=RPS26L1 PE=5 SV=1	Q5JNZ5
Myosin-11 OS; GN=MYH11 PE=1 SV=3	P35749
Calnexin OS; GN=CANX PE=1 SV=2	P27824
ATP-dependent RNA helicase DDX3Y OS; GN=DDX3Y PE=1 SV=2	O15523
ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS; GN=DDX3X PE=1 SV=3	O00571
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS; GN=HNRNPA1 PE=1 SV=4	P09651
Putative heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like protein 3 OS; GN=HNRPA1L3 PE=5 SV=1	P0C7M2
Meteorin-like protein OS; GN=METRNL PE=2 SV=1	Q641Q3
Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoform 4 OS; GN=MACF1 PE=1 SV=1	Q96PK2
Actin, alpha skeletal muscle OS; GN=ACTA1 PE=1 SV=1	P68133
Actin, gamma-enteric smooth muscle OS; GN=ACTG2 PE=1 SV=1	P63267
Actin, alpha cardiac muscle 1 OS; GN=ACTC1 PE=1 SV=1	P68032
Actin, aortic smooth muscle OS; GN=ACTA2 PE=1 SV=1	P62736
F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS; GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	P52907
E3 ubiquitin-protein ligase RNF8 OS; GN=RNF8 PE=1 SV=1	O76064
Histone H2A type 2-B OS; GN=HIST2H2AB PE=1 SV=3	Q8IUE6
Histone H2A.x OS; GN=H2AFX PE=1 SV=2	P16104
Histone H2A type 1-A OS; GN=HIST1H2AA PE=1 SV=3	Q96QV6
Myosin-XVIII _a OS; GN=MYO18A PE=1 SV=3	Q92614
Zinc finger CCCH domain-containing protein 18 OS; GN=ZC3H18 PE=1 SV=1	Q86VM9

Elongation factor Tu, mitochondrial OS; GN=TUFM PE=1 SV=2	P49411
Exonuclease 3'-5' domain-like-containing protein 2 OS; GN=EXDL2 PE=2 SV=1	Q9NVH0
UPF0544 protein C5orf45 OS; GN=C5orf45 PE=2 SV=1	Q6NTE8
60S ribosomal protein L27a OS; GN=RPL27A PE=1 SV=2	P46776
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein OS; GN=ARPC5L PE=1 SV=1	Q9BPX5
Actin, cytoplasmic 1 OS; GN=ACTB PE=1 SV=1	P60709
Tubulin beta-2B chain OS; GN=TUBB2B PE=1 SV=1	Q9BVA1
Tubulin beta-2A chain OS; GN=TUBB2A PE=1 SV=1	Q13885
Histone H3.3 OS; GN=H3F3A PE=1 SV=2	P84243
Histone H3.2 OS; GN=HIST2H3A PE=1 SV=3	Q71DI3
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS; GN=HNRNPF PE=1 SV=3	P52597
Myosin light chain 6B OS; GN=MYL6B PE=1 SV=1	P14649
F-actin-capping protein subunit alpha-2 OS; GN=CAPZA2 PE=1 SV=3	P47755
Splicing factor, proline- and glutamine-rich OS; GN=SFPQ PE=1 SV=2	P23246
Cation channel sperm-associated protein 2 OS; GN=CATSPER2 PE=1 SV=2	Q96P56
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS; GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2	P51991
60S ribosomal protein L10 OS; GN=RPL10 PE=1 SV=4	P27635
60S ribosomal protein L10-like OS; GN=RPL10L PE=1 SV=3	Q96L21
ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS; GN=DDX1 PE=1 SV=2	Q92499
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12 OS; GN=HSD17B12 PE=1 SV=2	Q53GQ0
Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1 OS; GN=GFPT1 PE=1 SV=3	Q06210
Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit OS; GN=GNAI2 PE=1 SV=3	P04899
Ig lambda chain V-I region WAH OS; PE=1 SV=1	P04208
Ig lambda chain V-I region VOR OS; PE=1 SV=1	P01699
Ig lambda chain V-I region NEWM OS; PE=1 SV=1	P01703
Barrier-to-autointegration factor OS; GN=BANF1 PE=1 SV=1	O75531
Four and a half LIM domains protein 3 OS; GN=FHL3 PE=1 SV=3	Q13643
CD59 glycoprotein OS; GN=CD59 PE=1 SV=1	P13987
CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2 OS; GN=CD2BP2 PE=1 SV=1	O95400
Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 OS; GN=ARPC2 PE=1 SV=1	O15144
Myosin-binding protein C, fast-type OS; GN=MYBPC2 PE=1 SV=1	Q14324
Collagen alpha-1(I) chain OS; GN=COL1A1 PE=1 SV=4	P02452
Protein dopey-1 OS; GN=DOPEY1 PE=1 SV=1	Q5JWR5
Uncharacterized protein C9orf93 OS; GN=C9orf93 PE=2 SV=1	Q6TFL3
Myosin-4 OS; GN=MYH4 PE=1 SV=1	Q9Y623
Dihydropyrimidinase OS; GN=DPYS PE=1 SV=1	Q14117
Phosphate carrier protein, mitochondrial OS; GN=SLC25A3 PE=1 SV=2	Q00325
Proteasome subunit alpha type-1 OS; GN=PSMA1 PE=1 SV=1	P25786
Uncharacterized protein KIAA0586 OS; GN=KIAA0586 PE=1 SV=2	Q9BVV6
Sodium/hydrogen exchanger 5 OS; GN=SLC9A5 PE=2 SV=2	Q14940
Apelin receptor OS; GN=APLNR PE=2 SV=1	P35414
Bromodomain-containing protein 3 OS; GN=BRD3 PE=1 SV=1	Q15059
Protein SEC13 homolog OS; GN=SEC13 PE=1 SV=3	P55735

Tropomodulin-2 OS; GN=TMOD2 PE=1 SV=1	Q9NZR1
Trichohyalin OS; GN=TCHH PE=1 SV=1	Q07283
Protocadherin gamma-B1 OS; GN=PCDHGB1 PE=2 SV=1	Q9Y5G3
Apoptosis-stimulating of p53 protein 2 OS; GN=TP53BP2 PE=1 SV=2	Q13625
Centrosome-associated protein CEP250 OS; GN=CEP250 PE=1 SV=2	Q9BV73
Cadherin-5 OS; GN=CDH5 PE=1 SV=4	P33151

Discussion et conclusion

Le cancer colorectal est le cancer le plus répandu tout sexe confondu en France. Son incidence a augmenté de 40% en 20 ans ce qui s'explique notamment par la mise en place de dépistage des populations à risque. En outre, l'environnement actuel, l'alimentation ou la sédentarité favorisent l'augmentation du nombre de cas. Actuellement, la chirurgie et les traitements de chimiothérapie, quand le cancer est pris à temps, permettent très souvent une rémission. Ces traitements semblent donc très efficaces mais leur utilisation entraîne parfois l'apparition de toxicités ou des phénomènes de résistance qui limitent leur action. De nouvelles thérapies ciblant de manière spécifique les molécules impliquées dans le développement de la tumeur et dans la résistance aux traitements conventionnels ont donc fait leur apparition ces dernières années. Ainsi, le cetuximab, inhibiteur du récepteur à l'EGF a été mis sur le marché. Au laboratoire, nous cherchons donc à comprendre ces phénomènes afin de potentialiser l'effet des drogues actuellement administrées dans les cancers colorectaux comme l'irinotécan.

Les facteurs de transcription STAT3 sont impliqués dans la tumorigénèse colorectale et ils sont très souvent retrouvés activés dans de nombreux cancers par des oncogènes. L'utilisation de modèles murins a mis en évidence que ces facteurs de transcription étaient nécessaires pour la survie et le développement des tumeurs induites par l'oncogène v-src (Bromberg et al., 1998). La régulation de l'activité transcriptionnelle de STAT3 est un élément très important dans le développement tumoral et dans la réponse au traitement. Ainsi, la connaissance de ces cofacteurs et la compréhension des différents mécanismes de régulation des fonctions transcriptionnelles de STAT3 suscitent un grand intérêt. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de STAT3 pour supprimer la résistance des cellules tumorales aux agents de chimiothérapie classiques implique également de comprendre l'impact de ces thérapies, sur le fonctionnement de STAT3. STAT3 est une protéine qui possède deux sites de phosphorylation, celui de la tyrosine 705 ainsi que celui du résidu sérine 727. La phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 permet sa dimérisation, sa translocation nucléaire ainsi que la régulation de son activité transcriptionnelle (Yu et al., 2009). Cette phosphorylation est impliquée dans la tumorigénèse colorectale. La phosphorylation de la sérine 727 est aussi impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de STAT3 en absence de phosphorylation de la tyrosine 705 (Ceresa and Pessin, 1996; Yang et al., 2005). Par conséquent, il nous a semblé intéressant d'étudier le rôle de la phosphorylation de STAT3

sur son résidu sérine dans la réponse cellulaire aux stress génotoxiques induits par les agents de chimiothérapie couramment utilisés en clinique comme les inhibiteurs de topoisomérases.

Différentes approches sont utilisées pour inactiver les facteurs de transcription STAT3 et certaines ont déjà fourni des résultats intéressants. Il est possible tout d'abord de cibler les tyrosines kinases responsables de la phosphorylation de STAT3 (Jak, src) au moyen de molécules inhibitrices (Garcia et al., 2001) ou d'induire la surexpression des inhibiteurs naturels de STAT3 comme les PIAS (protein inhibitor of activated STAT3) (Ogata et al., 2006). PIAS3 bloque la liaison du facteur de transcription STAT3 sur ses gènes cibles, inhibant ainsi son activité transcriptionnelle. Mais ces approches ciblent principalement la protéine STAT3 lorsqu'elle est phosphorylée sur la tyrosine. Une autre approche consisterait à cibler directement STAT3 lorsqu'il est phosphorylé sur son résidu sérine ou bien à inhiber directement la kinase cdk5. En effet, l'étude de l'expression ou de l'activation de cdk5 dans les tumeurs colorectales pourrait être utilisée comme marqueur dans les tumeurs colorectales pour étudier le profil de résistance des patients. La kinase cdk5 pourrait être un facteur important lors du choix thérapeutique à mettre en place. Dans le futur, cdk5 pourrait être une cible intéressante chez des patients possédant une tumeur présentant des caractéristiques spécifiques telles qu'une augmentation de son expression et qui suggérerait une capacité moindre des cellules à répondre au traitement. Un inhibiteur de cdk5 pourrait éventuellement être utilisé en association avec le sn38 pour augmenter l'efficacité du traitement.

I. La kinase cdk5 régule le facteur de transcription STAT3 pour réduire les dommages de l'ADN induits par l'inhibiteur de topoisomérase I et entraîner un arrêt en phase G2/M

- Régulation de la phosphorylation de STAT3

Initialement, l'étude de cdk5 a été restreinte aux cellules nerveuses où ses partenaires p35 et p39 sont fortement exprimés. Nous avons montré, après l'inhibition des topoisomérases, que la kinase, par l'intermédiaire de son association avec son partenaire p35 est impliquée dans l'inhibition de la transcription des gènes cibles connus de STAT3. Cependant, nous avons montré une liaison entre p35 et STAT3 en absence de Sn38 et une diminution de cette association après 48h de traitement. Or p35 est une protéine qui peut être clivée par une protéase, la calpaïne (Kusakawa et al., 2000), pour former la protéine p25 lors des stress neurotoxiques (Lee et al., 2000), ischémiques ou oxydatifs. Il serait donc intéressant d'étudier l'activation de la calpaïne et du clivage de la protéine p35 suite à l'action des

inhibiteurs de topoisomérases. Les stress cités précédemment pourraient activer les métalloprotéinases impliquées dans l'activation des calpaïnes. De plus, le clivage de p35 en p25 semble permettre la translocation de cdk5 dans le noyau (Saito et al., 2007). La protéine p35 pourrait être clivée après le traitement en p25, expliquant ainsi la perte de la liaison entre STAT3 et p35 car STAT3 formerait alors un complexe avec p25. De plus dans notre modèle, cdk5 est bien retrouvée dans le noyau mais la protéine p35 n'y est pas présente ceci pourrait être expliqué par le fait que cdk5 lorsqu'elle est nucléaire se retrouve associée non plus à la protéine p35 mais à p25. Il serait intéressant d'étudier la localisation de cdk5 suite au blocage du clivage de p35 et de regarder la régulation de l'activité transcriptionnelle de STAT3.

Nos travaux montrent que la kinase cdk5 est responsable de cette phosphorylation du domaine c-terminal de STAT3. Bien que sa structure ressemble fortement à celle des cdk5, cette kinase ne semble pas intervenir dans la régulation du cycle cellulaire mais semble réguler l'activité transcriptionnelle de STAT3 en le phosphorylant sur son résidu S727. Dans ces conditions STAT3 n'est plus phosphorylée sur la tyrosine 705. Une étude portée sur la kinase apoptotique AATYK montre que la protéine peut être phosphorylée sur son résidu sérine 34 par cdk5 et que cette phosphorylation empêche la phosphorylation d'AATYK sur son résidu tyrosine par les protéines de la famille de src (Tsutsumi et al.). Dans notre modèle, nous retrouvons des résultats similaires où STAT3 n'est plus phosphorylée sur son résidu tyrosine après traitement alors qu'il l'est sur son résidu sérine et que les gènes cibles habituels de STAT3 phosphorylé sur tyrosine 705 ne sont plus transcrits. De plus STAT3 peut être phosphorylée sur son résidu tyrosine par src. Il serait intéressant de regarder pourquoi et comment la phosphorylation du résidu sérine par cdk5 pourrait inhiber celle de la tyrosine générée par src.

- Rôle des oncogènes src et ras dans la régulation de la voie cdk5/STAT3

Les oncogènes src et ras sont très souvent mutés dans les cancers colorectaux. De plus, ils sont très souvent à l'origine de la résistance des cellules tumorales aux agents de chimiothérapies.

Des travaux précédents du laboratoire ont montré l'implication de l'EGFR et de la protéine src dans l'activation de la voie oncogénique STAT3/Eme1 (Vigneron et al., 2008). Il faudrait donc vérifier l'interaction de cdk5 avec le récepteur à l'EGF et avec l'oncogène src. De plus, il est connu que la kinase cdk5 peut être phosphorylée par des protéines de la famille

de src (Gao et al., 2004). Cdk5 pourrait aussi entraîner en retour la phosphorylation de src pour réguler son activité (Gao et al., 2004). L'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique de src, le SKI, ou l'utilisation du cetuximab, anticorps dirigé contre le récepteur à l'EGF qui permet chez certains patients de sensibiliser la tumeur colorectale aux inhibiteurs de topoisomérase I (Cunningham et al., 2004), pourrait empêcher l'activation de la kinase cdk5. Ceci permettrait d'expliquer la résistance des cellules qui surexpriment l'oncogène src faisant aussi de cdk5 une cible thérapeutique.

L'oncogène kras est muté dans 40% des cancers colorectaux et peut intervenir très tôt dans le développement des adénomes. Dans nos travaux, nous avons remarqué que l'oncogène ras semble inhiber la voie de réparation induite par le Sn38 et entraîner l'activation des gènes de prolifération comme la cycline D1, ceci est compréhensible car l'oncogène ras possède un rôle dans l'induction de la prolifération cellulaire. Mais dans notre modèle l'induction de ras entraîne l'entrée en sénescence des cellules et une induction de p21. Il doit donc exister au sein de la cellule, des freins à la transformation induite par ras. Une étude publiée dans le journal Science en 2009 (Gough et al., 2009) montre que la transformation oncogénique par l'oncogène ras est dépendante de la phosphorylation sur la sérine 727 de STAT3 au niveau de la mitochondrie et non à l'accumulation nucléaire de STAT3 après la phosphorylation de son résidu tyrosine. Dans notre modèle une induction courte de l'oncogène induit un arrêt du cycle cellulaire. Cependant, suite à une stimulation longue, certaines cellules échappent à cette entrée en sénescence et recommencent à proliférer. L'absence de phosphorylation de STAT3 sur la sérine suite à une courte induction de ras pourrait expliquer que les cellules rentrent en sénescence. Les cellules qui échappent à cet arrêt du cycle et qui recommencent à proliférer après une induction longue de ras seront peut-être celles qui vont exprimer un fort taux de cdk5 et de STAT3 phosphorylée sur la sérine. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de cdk5 et la phosphorylation de STAT3 dans les cellules qui ont échappées à l'entrée en sénescence induite par ras ou dans des tumeurs de patients où kras est mutée.

- Implication de la phosphorylation de STAT3 dans la régulation du cycle cellulaire

Nous avons observé suite à l'activation de cdk5 une perte de l'expression de la cycline D et de myc qui sont des protéines impliquées dans la transition entre les phases G0 et G1, mais myc est aussi une protéine qui intervient dans l'induction de l'apoptose. La perte de son

expression peut donc entraîner une inhibition de l'apoptose. Nous pensons que cette inhibition de l'apoptose pourrait être un mécanisme utilisé par la cellule pour résister aux inhibiteurs de topoisomérasés. L'apoptose est un phénomène irréversible où la cellule est détruite et nous pensons que cette inhibition de l'apoptose pourrait permettre de favoriser le développement tumoral. La réponse première de l'activation des oncogènes est l'entrée en apoptose ou en sénescence des cellules, mais à des stades plus avancés de la tumeur, ces processus ne sont plus détectés efficacement, ce qui explique le fait que la progression tumorale continue car les cellules ont échappé à ces mécanismes. Il est donc possible de penser qu'il puisse se passer la même chose après l'initiation des processus de sénescence et de mort cellulaire induite par les dommages créés par le Sn38. Certaines cellules tumorales pourraient inhiber les voies de maintien de ces phénotypes pour continuer à proliférer malgré les dommages de l'ADN. Elles possèderaient ainsi de l'instabilité génomique et deviendraient résistantes aux inhibiteurs de topoisomérasés.

Le complexe cdk5/p35 active STAT3 par phosphorylation de la sérine 727. Nous avons remarqué cependant que l'extinction de la phosphorylation n'était pas totale après la perte de cdk5 supposant un temps de demie vie long de STAT3 ou bien la possibilité que d'autres kinases puissent phosphoryler le facteur de transcription. Ceci supposerait une autre voie de signalisation entraînant la phosphorylation de STAT3. Cette phosphorylation étant associée à un arrêt en phase G2/M du cycle cellulaire, Hélène Sellier, étudiante en thèse au laboratoire, a étudié le rôle de ce facteur de transcription après phosphorylation de la sérine au cours de la phase G2 et montré que ce facteur peut se fixer sur de nouveaux gènes cibles impliqués dans cette phase du cycle. D'après ses résultats, il est envisageable que la protéine STAT3 possède une activité transcriptionnelle en phase G2 après avoir été phosphorylée sur son résidu sérine mais dans les conditions de progression cellulaire en phase G2/M, STAT3 ne semble pas être activée par cdk5. Une autre étude montre aussi le rôle de la phosphorylation du résidu sérine de STAT3 au cours de la phase G2/M suite à une phosphorylation de cdk1, mais dans ces conditions cette phosphorylation entraîne l'inhibition de son activité transcriptionnelle (Shi et al., 2006).

Le rôle de la phosphorylation du résidu sérine de STAT3 suite à une phosphorylation par cdk5 ne semble pas être impliqué pas dans la progression en phase G2 mais dans la réparation des dommages de l'ADN via la transcription du gène qui code pour la protéine Emel. Cette phosphorylation de STAT3 au niveau de la sérine semble donc être à la base d'une nouvelle activité transcriptionnelle de STAT3 suite aux dommages de l'ADN et

sûrement en phase G2/M. Il sera donc important de caractériser d'autres gènes cibles de STAT3 qui pourraient être de nouvelles cibles impliquées dans la réponse à la chimiothérapie.

II. La voie Myc/Max/Miz-1 régule l'expression de la kinase Aurora A suite à l'inhibition des topoisomérases de type I

Suite aux dommages induits par des agents génotoxiques, la cellule va activer ses points de contrôle et s'arrêter en phase G2/M du cycle cellulaire. Il est connu que la voie ATM/ATR/chk va être activée pour induire l'expression du gène suppresseur de tumeur p53 et par conséquent promouvoir l'activation du gène de p21. En parallèle, la phosphatase cdc25 est inactivée, entraînant un arrêt du cycle cellulaire. Or, la progression des cellules à travers le cycle cellulaire et la mitose est assurée par l'apparition séquentielle de différentes protéines comme les cyclines, mais également les kinases mitotiques. Par exemple, l'entrée en mitose se caractérise par l'augmentation d'expression de la kinase Aurora A qui active la phosphatase cdc25B, participant alors à l'activation du complexe cycline B/cdk1 au niveau des centrosomes, et constitue donc un régulateur clé de la transition G2/M. De plus, la surexpression d'Aurora A est très fréquemment retrouvée dans différentes tumeurs humaines. Cette surexpression est associée à une amplification du nombre des centrosomes récemment associée à l'instabilité chromosomique de type CIN (Lentini et al., 2007). Nous nous sommes donc intéressés à l'effet du Sn38 sur l'expression de la kinase Aurora A et l'arrêt en phase G2/M.

- Régulation de la transcription du gène qui code pour Aurora A

Une étude réalisée au laboratoire montre que les dommages de l'ADN induisent l'expression de la protéine p21 (Vigneron et al., 2006), et qu'elle est responsable de l'inhibition de plusieurs gènes cibles de STAT3 comme c-myc ou cdc25A dans les fibroblastes humains et dans la lignée tumorale HCT116. Nous avons donc pensé que l'inhibition de la kinase Aurora A pouvait être due à l'activation et à la fixation de p21 sur son promoteur car nous avons remarqué une perte de l'expression de la kinase suite au traitement alors que les protéines p21 et p53 sont activées. Cependant, nous avons montré que la perte d'Aurora était indépendante de ces deux protéines par l'utilisation d'une lignée où p53 est mutée dans son domaine de liaison à l'ADN et l'utilisation d'une lignée n'exprimant plus

p21. Néanmoins, nous avons remarqué dans l'étude précédente une activation du facteur de transcription STAT3 au niveau de la sérine S727, nous nous sommes donc intéressés à son recrutement au niveau du promoteur d'Aurora A avant et après traitement mais aucune variation de sa fixation sur le promoteur n'a pu être mise en évidence. Cependant, le facteur de transcription STAT3 régule l'expression de c-myc suite à l'inhibition des dommages de l'ADN (Vigneron et al., 2006). Nous avons montré ici que la perte de l'expression de myc occasionnée par l'inhibition des topoisomérases entraînait un arrêt de la transcription de la kinase Aurora A au cours de la phase G2 du cycle cellulaire. Les études de chIP au cours du cycle cellulaire, nous permettent de dire que myc est recruté sur le promoteur d'Aurora A seulement au cours de la phase G2 du cycle cellulaire.

Or myc est un facteur de transcription essentiellement exprimé en phase G1 et aucun recrutement de myc n'est observé sur le promoteur dans ces conditions. Il serait intéressant de comprendre pourquoi myc ne peut pas se fixer sur le promoteur d'Aurora A au cours de la phase G1. Myc doit probablement se lier à un partenaire spécifique lors de la phase G2 pour pouvoir se fixer sur le promoteur d'Aurora A. Suite à l'induction des dommages de l'ADN, cette perte de transcription d'Aurora A est aussi due à la perte du recrutement d'un complexe entre myc et son co-activateur max et à la fixation des protéines mad et de miz-1 sur le promoteur de la kinase. Il serait intéressant de regarder si myc permet l'activation de la transcription en phase G2 par le recrutement de cofacteurs comme TRAPP ou TIP60, une histone acétylase ou des ATPases comme TIP48 ou TIP49 permettant le remodelage de la chromatine ou bien de vérifier si myc est seulement impliqué dans la régulation du programme d'élongation de l'ARNm d'Aurora A par son association avec P-TEF et cdk9.

La protéine Mad semble aussi avoir un rôle majeur dans la régulation d'Aurora A car elle est très fortement réprimée dans les tissus tumoraux des patients. Des expériences de co-immunoprécipitation pourraient nous permettre de vérifier si cette protéine peut se lier à max pour inhiber le complexe myc/max. Il est probable que mad puisse former un complexe avec Max, ceci entraînant la séquestration de la protéine Max dans le noyau en se fixant sur les sites de liaison entre max et myc. Le complexe myc/max, ne pouvant plus alors se former, ceci entraînerait un arrêt de la transcription d'Aurora A.

- Formation des SAHFs et induction de la sénescence suite à l'inhibition des topoisomérases

Des expériences de chIP ont permis de montrer que les protéines mad et miz sont recrutées sur le promoteur après le traitement mais il serait intéressant de regarder si ces protéines sont associées sur le promoteur pour permettre le recrutement de la protéine HP1 γ et la méthylation de la lysine 9. Nous avons remarqué en effet que l'inhibition de la transcription d'Aurora A semblait être due à une méthylation du gène. Sur son site d'initiation nous avons remarqué une triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 ainsi que le recrutement de HP1 γ associés à l'apparition de SAHFs. Comme miz-1 est une protéine connue pour inhiber la transcription lors de son association avec des répresseurs de la transcription comme Bcl6 (Phan et al., 2005), nous pensons qu'elle pourrait permettre aussi le recrutement de HP1 γ pour inhiber la transcription d'Aurora A. L'utilisation des inhibiteurs de topoisomérases entraîne donc une perte de la transcription d'Aurora A et une méthylation ainsi qu'une perte de la maturation des centrosomes. L'utilisation d'une lignée colorectale stable exprimant Aurora A de façon inductible, nous permettrait d'analyser plus aisément l'effet de la surexpression de la kinase sur la survie cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN. Nous pourrions vérifier si la surexpression d'Aurora A seule suffit à inhiber l'effet du Sn38 ou si elle doit être accompagnée d'une perte des répresseurs de la transcription comme mad et miz.

- Etude de la kinase Aurora dans les tumeurs colorectales

Du fait de son implication dans l'établissement du nombre de pôles et de fuseaux mitotiques, la dérégulation d'Aurora A semble être impliquée dans la tumorigénèse. Nous avons donc regardé l'expression de la kinase et de la protéine myc dans les tissus tumoraux de patients. La surexpression de myc est associée à celle d'Aurora A et est corrélée avec la formation d'instabilités génomiques dans les tumeurs colorectales. Il serait intéressant d'étudier le marquage de la kinase Aurora A chez les patients et par des études rétrospectives d'étudier leur réponse au traitement. Cependant, des marquages préliminaires d'Aurora A réalisés par le Dr Isabelle Valo au Centre Paul Papin ne semblent pas concluants dans les tumeurs colorectales. En effet, le tissu digestif est en perpétuel renouvellement au niveau des cryptes et exprime fortement la kinase. De même, les cellules en haut de ces cryptes expriment aussi cette kinase ne permettant pas l'obtention d'un marquage spécifique dans ce tissu. Du fait de la difficulté pour marquer Aurora A, l'étude des protéines Mad et Miz pourrait être envisagée.

III. La voie de signalisation cdk5/STAT3/myc/Aurora A

Nous pensons que le facteur de transcription STAT3 suite à l'inhibition des topoisomérases, est phosphorylé par cdk5 sur son résidu sérine 727. A la suite de cette phosphorylation, le facteur de transcription n'est plus recruté sur le promoteur de myc. Dans un premier temps, la perte de l'expression de myc permettrait une inhibition de l'apoptose qui pourrait entraîner une résistance au traitement. Dans un deuxième temps, l'absence de myc associée au recrutement des répresseurs miz et mad sur le promoteur d'Aurora A ainsi que la méthylation du gène aboutirait à la perte de l'expression de la kinase. La perte d'Aurora est associée à un arrêt en phase G2/M des cellules traitées au sn38 grâce à l'inhibition de la séparation des centrosomes. Une surexpression de la kinase Aurora A, entrainerait donc un défaut de l'arrêt en phase G2 et pourrait expliquer une résistance à l'inhibition des topoisomérases. La dérégulation de l'expression des cofacteurs, max, mad et miz pourrait aussi entraîner une inhibition de l'arrêt en phase G2.

En parallèle, la phosphorylation de STAT3 permet la transcription de l'endonucléase, Eme1. Cette induction d'Eme1 permet la réparation des dommages de l'ADN induits par le Sn38.

Afin de confirmer notre hypothèse, il serait intéressant d'étudier si la perte de l'expression de la kinase cdk5 pourrait avoir un rôle sur la régulation de la kinase Aurora A. L'étude de la kinase n'a pas pu être réalisée sur les ARNm de patients comme celle réalisée pour myc, Aurora A et ses régulateurs transcriptionnels car aucune variation de l'ARNm de cdk5 n'est observée suite à l'inhibition des topoisomérases. L'augmentation de l'expression semble être due à une stabilisation de la protéine, cependant l'analyse immunohistologique de cdk5 sur des lames de patients résistants à l'irinotécan et présentant une surexpression d'Aurora A pourrait être réalisée. Une surexpression de Aurora A ou de cdk5 pourrait être un bon indicateur de la réponse des cellules au traitement.

IV. Etude de l'interaction entre STAT3 et DDB2 suite aux dommages de l'ADN induits par l'inhibition des topoisomérases de type I

Les cibles transcriptionnelles de STAT3 lorsqu'il est phosphorylé sur son résidu sérine 727 semblent être différentes de celles connues pour le dimère de STAT3 tyrosine 705. L'activité transcriptionnelle de STAT3 est donc modifiée suivant le résidu phosphorylé et nous avons pensé que les partenaires protéiques de ce facteur de transcription phosphorylé sur le résidu sérine devaient être différents de ces partenaires habituellement décrits. Nous avons donc cherché à découvrir de nouvelles cibles potentielles de STAT3.

La technique du double hybride à partir d'une banque d'ADN complémentaires obtenue à partir de cellules colorectales traitées au Sn38 a permis de mettre en avant 93 partenaires potentiels de STAT3 phosphorylé sur la sérine. Nous avons étudié particulièrement la protéine DDB2 impliquée dans les dommages de l'ADN induits par le traitement (Stoyanova et al., 2009b). Nous avons pu vérifier le lien entre les deux protéines par des expériences de co-immunoprécipitation mais cependant aucune variation de l'interaction n'a pu être mise en évidence après traitement. Nous avons émis deux hypothèses pouvant expliquer le rôle de l'interaction de STAT3 avec DDB2.

- 1^{ère} hypothèse : STAT3 permet le recrutement de DDB2 au niveau des sites de cassures de l'ADN

D'après nos résultats, nous pensons que STAT3 et DDB2 pourraient être liées de manière constitutive. DDB2 pourrait être recrutée par STAT3 au niveau des zones de cassure de l'ADN pour activer les systèmes de réparation. De plus, dans les expériences de spectrométrie de masse, nous avons vu que STAT3 pouvait se lier à l'histone pH2AX, une autre protéine impliquée dans la reconnaissance des cassures de l'ADN et dans le recrutement des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Cependant, ces résultats sont préliminaires et n'ont pas été confirmés par des expériences d'immunoprécipitation.

- 2^{ème} hypothèse : L'interaction de STAT3 avec DDB2 permet l'entrée en sénescence

Une seconde hypothèse concernant l'interaction entre STAT3 et DDB2 a été émise à partir de ces résultats. Dans la littérature, un nouveau rôle de DDB2 a été décrit dans la réponse aux cassures de l'ADN. DDB2 permet l'induction de la sénescence, phénomène qui est ici indépendant de l'activation de p53 ou de p16. L'inhibition de DDB2 dans ces conditions entraîne une résistance au traitement (Roy et al.).

DDB2 peut bloquer l'expression de gènes antioxydants, la catalase et la SOD, ce qui aboutit à l'accumulation des ROS et à l'entrée en sénescence. En fait, DDB2 permet la répression de ces gènes par la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3. Or nous avons vu que suite à l'inhibition des topoisomérases de nombreux gènes semblaient méthylés et l'ADN condensé pour former des SAHFs. Pour son activité transcriptionnelle, DDB2 nécessite une association avec un facteur de transcription qui permettrait son recrutement au niveau des promoteurs cibles. Nous supposons que STAT3 pourrait permettre à DDB2 de se fixer sur l'ADN pour permettre la répression des gènes impliqués dans la progression cellulaire et aboutir à l'arrêt en phase G2/M du cycle.

- Implication du complexe STAT3/DDB2 dans la répression de la transcription

L'interaction de DDB2 avec STAT3 pourrait donc permettre d'inhiber la transcription de gènes. Une étude de 2004 (Metge et al., 2004) semble en effet impliquer la protéine STAT3 dans l'inhibition de la protéine PCM1. Dans cette étude, la perte de STAT3 entraîne la surproduction de PCM1 sans régulation post-traductionnelle. La régulation de PCM1 par STAT3 n'a pas été décrite dans cette étude mais nous pouvons supposer que dans des conditions normales, STAT3 pourrait permettre le recrutement d'un répresseur de la transcription sur le promoteur de PCM1 comme par exemple DDB2 pour inhiber la transcription du gène.

Cette étude montre aussi l'implication de la protéine STAT3 dans la duplication des centrosomes chez le hamster (Metge et al., 2004). Dans ce papier, la perte de l'expression de STAT3 entraîne un arrêt de la duplication des centrosomes et STAT3 semble aussi impliquée dans la régulation post-traductionnelle de la γ -tubuline impliquée dans la duplication des centrosomes. Or nous avons vu que la perte de l'expression de la kinase Aurora A suite à l'inhibition des topoisomérases induit elle aussi une perte de la séparation des centrosomes. L'action de STAT3 et la perte d'Aurora A permettrait peut-être d'entraîner conjointement l'inhibition de la séparation des centrosomes et l'arrêt en phase G2/M.

V. Etude de l'interaction entre STAT3 et ASPP2

D'autres partenaires potentiels de STAT3 ont pu être mis en évidence par des expériences de spectrométrie de masse après immunoprécipitation du facteur de transcription.

140 protéines ont ainsi pu être identifiées par cette technique. Mais nous nous sommes intéressés aux protéines faisant partie des systèmes de réparation de l'ADN, de la mitose et de l'apoptose comme par exemple ASPP2, DNA-PK, H2AX, INCENP, CEP250. Les protéines DNA-PK et pH2AX sont des protéines impliquées dans la réparation des dommages de l'ADN et sont recrutées précocement au niveau des zones de cassures. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que nous avons émise suivant laquelle STAT3 pourrait se fixer au niveau des zones de cassures induites par le Sn38 pour apporter les protéines de réparation comme DDB2 et permettre la réparation des dommages. INCENP et CEP250 sont des protéines impliquées dans le déroulement de la mitose, suggérant que la protéine pourrait réguler cette phase pour inhiber le cycle cellulaire. Lorsque STAT3 est phosphorylée sur la sérine après l'inhibition des topoisomérases, il pourrait permettre l'arrêt en phase G2/M par la régulation des protéines impliquées dans le point de contrôle mitotique. Cependant pour toutes ces protéines, l'interaction n'a pas encore été vérifiée par co-immunoprécipitation.

En ce qui concerne la protéine ASPP2 cependant, les expériences de pull down et de co-immunoprécipitation nous ont permis de confirmer l'interaction avec STAT3. La famille des ASPP contient trois membres ASPP1, ASPP2 et iASPP qui se lient toutes au domaine de fixation à l'ADN de p53. ASPP1 et ASPP2 permettent de favoriser l'apoptose en conférant à p53 une meilleure affinité pour les promoteurs des gènes de l'apoptose comme Bax et PIG3. Comme pour ce qui a été décrit auparavant pour p53, ASPP2 pourrait permettre de favoriser la fixation de STAT3 sur de nouveaux promoteurs. Nous avons constaté que l'inhibition d'ASPP2 entraîne une diminution du nombre de cellules en phase G2/M après traitement. Nous pensons que la perte d'ASPP2 dans nos cellules après l'inhibition des topoisomérases entrainerait une réponse moindre des cellules à l'inhibiteur des topoisomérases car elles ne semblent plus bloquées en phase G2/M. Ceci pourrait être du à une perte de la fixation de STAT3 sur ces nouveaux gènes cibles. Cependant, la perte d'ASPP2 ne conduit qu'à une augmentation des dommages de 10% même en absence de traitement. ASPP2 pourrait favoriser la fixation de STAT3 suite à sa phosphorylation sur la sérine sur le promoteur de gènes impliqués dans la régulation du cycle et non dans ceux qui interviennent dans la réparation des dommages de l'ADN qui pourraient être régulés par l'association de STAT3 avec un partenaire différent.

VI. Conclusion

Les travaux présentés dans ce manuscrit montrent que l'activation du facteur de transcription STAT3, en particulier au sein des tumeurs colorectales peut être à l'origine de la résistance aux traitements de chimiothérapie. A partir de nos résultats, nous proposons l'hypothèse selon laquelle la forme de STAT3 phosphorylée sur la sérine et la kinase cdk5 pourrait être des marqueurs importants lors du choix thérapeutique à mettre en place. Ces données suggèrent que STAT3 phosphorylée sur la sérine ou bien la kinase cdk5 pourraient être des facteurs prédictifs de la réponse aux traitements génotoxiques. Ces données suggèrent également que l'inhibition de STAT3 ou de cdk5 pourrait renforcer ces thérapies et ouvrir sur un nouvel arsenal thérapeutique pour traiter les patients.

Cependant, ces travaux soulèvent différents points nécessitant un éclaircissement si l'on veut dans le futur envisager de mettre en pratique cette dernière hypothèse.

Au cours de la progression tumorale, la cellule traverse tout un ensemble de stress. Des études ont ainsi montré que lors de l'initiation de l'oncogenèse, la cellule doit supporter un stress génomique détecté dans la tumeur par la phosphorylation de l'histone H2AX (Bartkova et al., 2005). Ce stress génomique active normalement les points de contrôle du cycle cellulaire, la sénescence ou l'apoptose ainsi que la réparation des dommages de l'ADN. Dans les premiers stades de la carcinogenèse, on détecte effectivement la sénescence et l'apoptose qui doivent alors permettre de contrôler la croissance de la tumeur (Bartkova et al., 2005) (Collado et al., 2005). Cependant à des stades plus avancés, ces processus ne sont plus détectés efficacement, ce qui traduit le fait que la progression tumorale s'est accompagnée de l'échappement des cellules à ces mécanismes. Or les traitements génotoxiques produisent exactement le même type de dommages que les oncogènes. Il est alors possible de penser que la réponse observée lors de l'utilisation des inhibiteurs de topoisomérases est une réponse identique à l'activation d'un stress oncogénique. Par l'induction de mécanismes protecteurs, STAT3 lorsqu'il est phosphorylé sur la sérine 727 par cdk5 pourrait être considéré comme un suppresseur de tumeur. Ces mécanismes pourraient être cependant détournés par la cellule tumorale pour réparer les dommages de l'ADN et bloquer l'entrée en sénescence. La cellule pourrait ainsi continuer à proliférer avec des dommages créant ainsi de l'instabilité génomique. STAT3 pourrait alors présenter plusieurs fonctions. Une fonction normale permettant la réparation et l'entrée en sénescence, et une fonction oncogénique utilisant ces activités pour favoriser la prolifération tumorale et l'instabilité génétique (Figure 56). Dans les tumeurs présentant une activation de src ou une augmentation de l'expression de la kinase Aurora A, nous pensons que le traitement ne sera pas efficace. Il serait donc nécessaire de

contrôler l'activation de src et l'expression de Aurora A avant d'administrer le traitement (Figure 56b). De plus, la présence de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine corrélée à l'oncogène kras permet la transformation cellulaire. La présence de la phosphorylation de STAT3 pourrait donc être associée à l'agressivité de la tumeur.

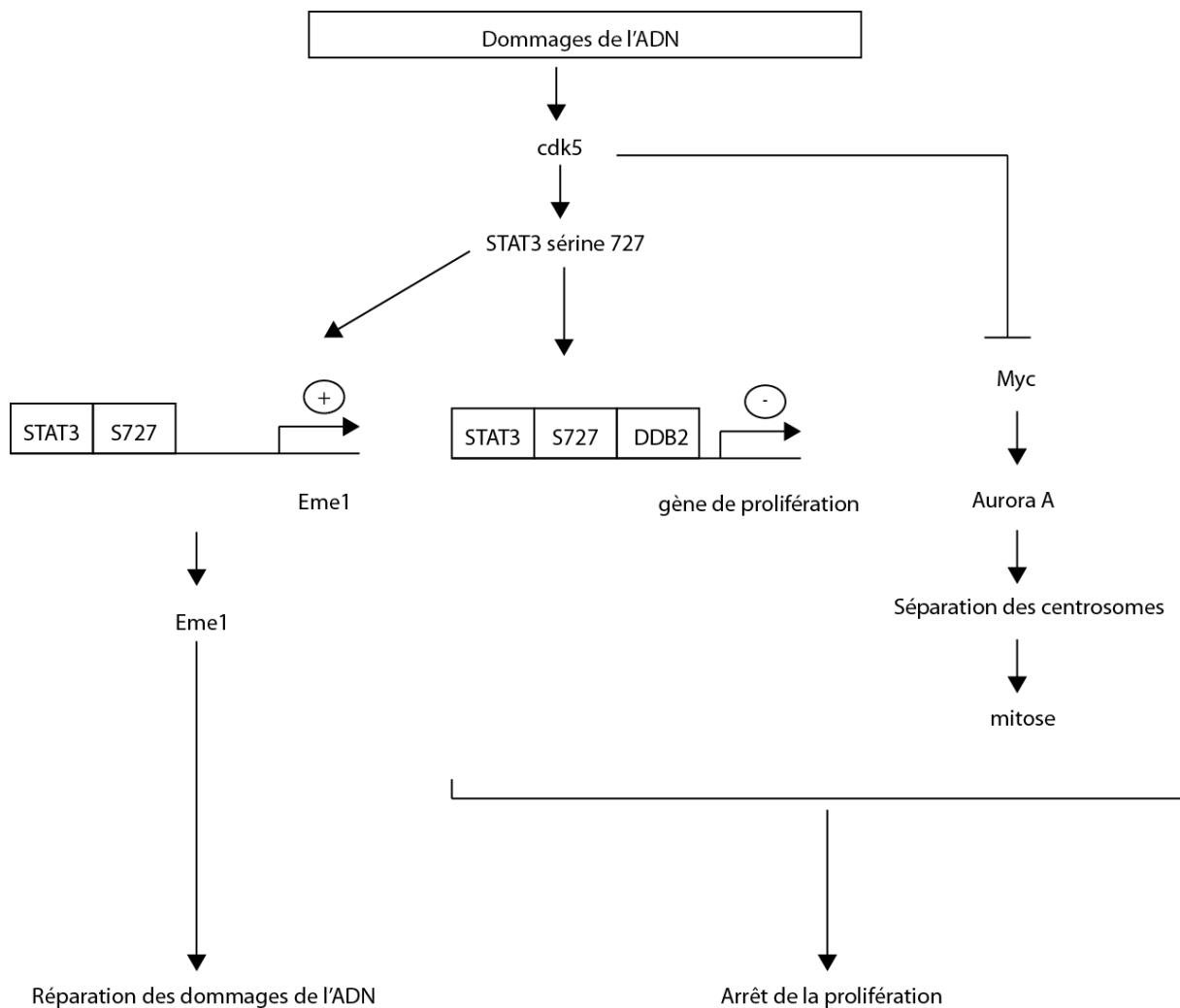


Figure 56 | Hypothèse du rôle de la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine dans le contrôle du cycle cellulaire

Nous avons vu que suite aux dommages de l'ADN induits par l'inhibiteur des topoisomérases, STAT3 était phosphorylé sur son résidu sérine 727 pour permettre la transcription d'eme1 et donc la réparation des dommages.

Nous supposons que lorsque STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine ceci entraîne l'inhibition de la transcription des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, notamment ceux de la phase G2/M. Ceci pourrait être possible par le recrutement et son association avec la protéine DDB2 qui permet la méthylation des gènes.

Cette hypothèse contribue à décrire STAT3 comme un suppresseur de tumeur lorsqu'il est phosphorylé sur son résidu sérine 727 dans des conditions normales. Dans des conditions

oncogéniques, en présence de ras ou de src, ces fonctions seraient détournées pour favoriser le développement tumoral.

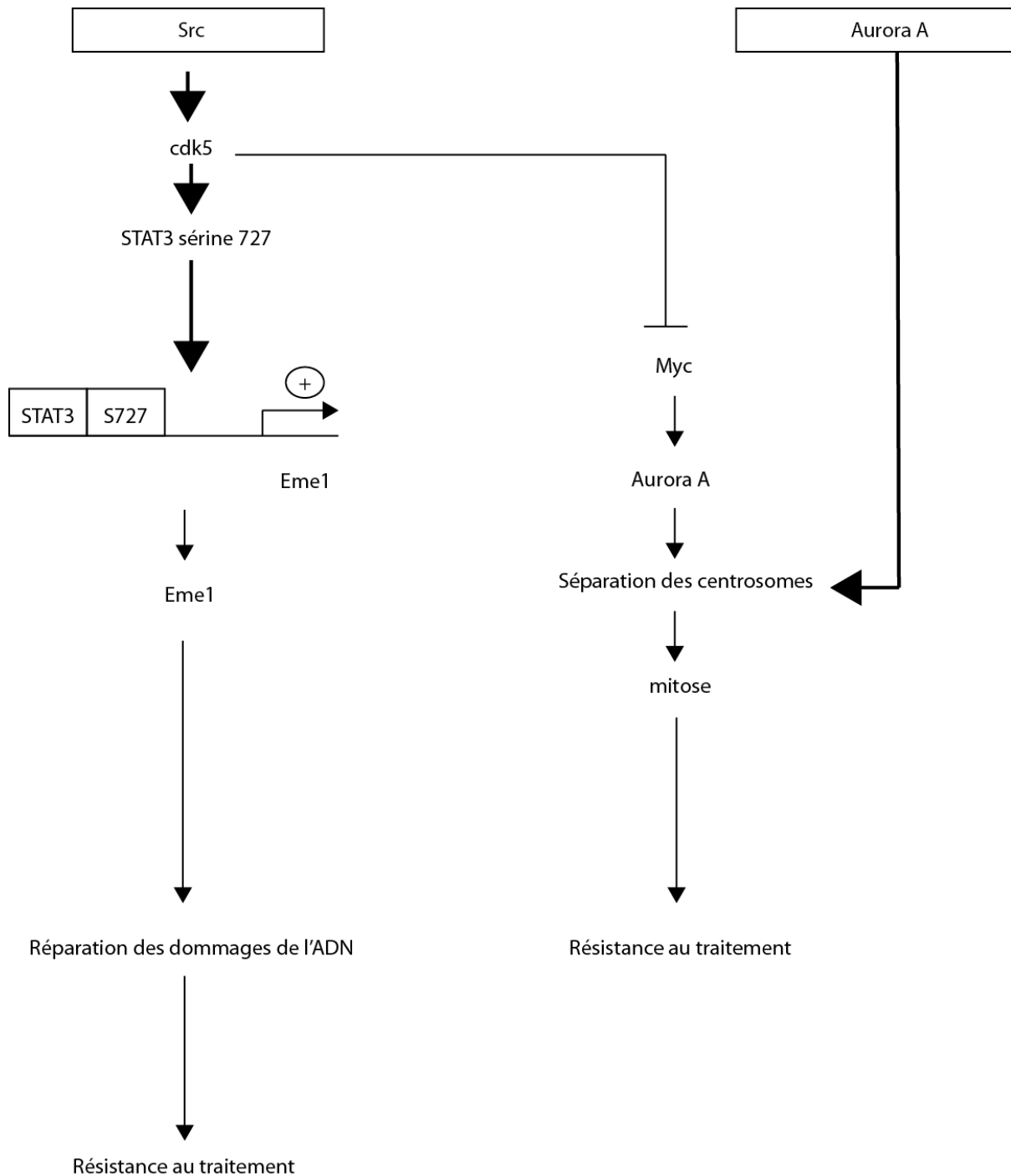


Figure 56 b | Hypothèse des phénomènes de résistance aux inhibiteurs de topoisomérases

Nous avons vu que suite aux dommages de l'ADN induits par l'inhibiteur des topoisomérases, STAT3 était phosphorylé sur son résidu sérine 727 pour permettre la transcription d'eme1, la réparation des dommages et l'arrêt en phase G2.

Dans des conditions oncogéniques, en présence de l'oncogène src, la voie cdk5/STAT3 serait suractivée pour permettre une réparation accrue des dommages de l'ADN et une résistance au traitement. Lorsque la kinase A est surexprimée, bien que la voie cdk5/STAT3 soit activée, les cellules passeront le point de contrôle mitotique, entraînant la prolifération cellulaire et une résistance au traitement.

Bibliographie

- Ahn, J. Y., Schwarz, J. K., Piwnica-Worms, H., and Canman, C. E. (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res* 60, 5934-5936.
- Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X. J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M., and Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77, 63-71.
- Al Rashid, S. T., Dellaire, G., Cuddihy, A., Jalali, F., Vaid, M., Coackley, C., Folkard, M., Xu, Y., Chen, B. P., Chen, D. J., *et al.* (2005). Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks in vivo. *Cancer Res* 65, 10810-10821.
- Alexander, K., Yang, H. S., and Hinds, P. W. (2004). Cellular senescence requires CDK5 repression of Rac1 activity. *Mol Cell Biol* 24, 2808-2819.
- Amati, B., Frank, S. R., Donjerkovic, D., and Taubert, S. (2001). Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta* 1471, M135-145.
- Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y., and Alkalay, I. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* 16, 1066-1076.
- Anand, S., Penrhyn-Lowe, S., and Venkitaraman, A. R. (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 3, 51-62.
- Anderson, C. B., Neufeld, K. L., and White, R. L. (2002). Subcellular distribution of Wnt pathway proteins in normal and neoplastic colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8683-8688.
- Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Lohez, O. D., and Margolis, R. L. (2001). Neither p21WAF1 nor 14-3-3sigma prevents G2 progression to mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells after DNA damage, but p21WAF1 induces stable G1 arrest in resulting tetraploid cells. *Cancer Res* 61, 7660-7668.
- Andrews, P. D. (2005). Aurora kinases: shining lights on the therapeutic horizon? *Oncogene* 24, 5005-5015.
- Armanious, H., Gelebart, P., Mackey, J., Ma, Y., and Lai, R. STAT3 upregulates the protein expression and transcriptional activity of beta-catenin in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 3, 654-664.
- Asada, A., Yamamoto, N., Gohda, M., Saito, T., Hayashi, N., and Hisanaga, S. (2008). Myristoylation of p39 and p35 is a determinant of cytoplasmic or nuclear localization of active cyclin-dependent kinase 5 complexes. *J Neurochem* 106, 1325-1336.
- Aziz, M. H., Hafeez, B. B., Sand, J. M., Pierce, D. B., Aziz, S. W., Dreckschmidt, N. E., and Verma, A. K. Protein kinase Cvarepsilon mediates Stat3Ser727 phosphorylation, Stat3-regulated gene expression, and cell invasion in various human cancer cell lines through integration with MAPK cascade (RAF-1, MEK1/2, and ERK1/2). *Oncogene*.
- Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. Damaged-DNA Binding Protein-2 Drives Apoptosis Following DNA Damage. *Cell Div* 5, 3.
- Baker, D. J., Jeganathan, K. B., Malureanu, L., Perez-Terzic, C., Terzic, A., and van Deursen, J. M. (2006). Early aging-associated phenotypes in Bub3/Rae1 haploinsufficient mice. *J Cell Biol* 172, 529-540.
- Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281, 1674-1677.

- Barre, B., Vigneron, A., and Coqueret, O. (2005). The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter. *J Biol Chem* *280*, 15673-15681.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J. M., Lukas, C., *et al.* (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* *434*, 864-870.
- Baudino, T. A., and Cleveland, J. L. (2001). The Max network gone mad. *Mol Cell Biol* *21*, 691-702.
- Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., and Conti, E. (2003). Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell* *12*, 851-862.
- Ben David, Y., Prideaux, V. R., Chow, V., Benchimol, S., and Bernstein, A. (1988). Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus. *Oncogene* *3*, 179-185.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M. A., Vidal, M. N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., and Vousden, K. H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* *126*, 107-120.
- Besser, D., Bromberg, J. F., Darnell, J. E., Jr., and Hanafusa, H. (1999). A single amino acid substitution in the v-Eyk intracellular domain results in activation of Stat3 and enhances cellular transformation. *Mol Cell Biol* *19*, 1401-1409.
- Bhonde, M. R., Hanski, M. L., Notter, M., Gillissen, B. F., Daniel, P. T., Zeitz, M., and Hanski, C. (2006). Equivalent effect of DNA damage-induced apoptotic cell death or long-term cell cycle arrest on colon carcinoma cell proliferation and tumour growth. *Oncogene* *25*, 165-175.
- Bienvendu, F., Barre, B., Giraud, S., Avril, S., and Coqueret, O. (2005). Transcriptional regulation by a DNA-associated form of cyclin D1. *Mol Biol Cell* *16*, 1850-1858.
- Bienz, M., and Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* *103*, 311-320.
- Bischoff, J. R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., *et al.* (1998). A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J* *17*, 3052-3065.
- Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* *251*, 1211-1217.
- Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1992). Regulation of Myc: Max complex formation and its potential role in cell proliferation. *Tohoku J Exp Med* *168*, 195-202.
- Blaker, H., Scholten, M., Sutter, C., Otto, H. F., and Penzel, R. (2003). Somatic mutations in familial adenomatous polyps. Nuclear translocation of beta-catenin requires more than biallelic APC inactivation. *Am J Clin Pathol* *120*, 418-423.
- Boccaccio, C., Ando, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C., and Comoglio, P. M. (1998). Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* *391*, 285-288.
- Bode, A. M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* *4*, 793-805.
- Boiko, A. D., Porteous, S., Razorenova, O. V., Krivokrysenko, V. I., Williams, B. R., and Gudkov, A. V. (2006). A systematic search for downstream mediators of tumor suppressor function of p53 reveals a major role of BTG2 in suppression of Ras-induced transformation. *Genes Dev* *20*, 236-252.
- Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., and Srivastava, S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of

international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 5248-5257.

Bommer, G. T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A. J., Kuick, R., Love, R. E., Zhai, Y., Giordano, T. J., Qin, Z. S., Moore, B. B., *et al.* (2007). p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol* 17, 1298-1307.

Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M., and Luscher, B. (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* 15, 2042-2047.

Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* 18, 5321-5333.

Bowen, K. A., Doan, H. Q., Zhou, B. P., Wang, Q., Zhou, Y., Rychahou, P. G., and Evers, B. M. (2009). PTEN loss induces epithelial--mesenchymal transition in human colon cancer cells. *Anticancer Res* 29, 4439-4449.

Bowman, T., Broome, M. A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W. J., Sedivy, J. M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S. A., and Jove, R. (2001). Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7319-7324.

Boyd, K. E., and Farnham, P. J. (1999). Identification of target genes of oncogenic transcription factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 222, 9-28.

Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 109, 1139-1142.

Bromberg, J. F., and Darnell, J. E., Jr. (1999). Potential roles of Stat1 and Stat3 in cellular transformation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64, 425-428.

Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Besser, D., Lathem, W. W., and Darnell, J. E., Jr. (1998). Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol* 18, 2553-2558.

Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., and Darnell, J. E., Jr. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295-303.

Canman, C. E., and Lim, D. S. (1998). The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene* 17, 3301-3308.

Carter, S. L., Eklund, A. C., Kohane, I. S., Harris, L. N., and Szallasi, Z. (2006). A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* 38, 1043-1048.

Cartron, P. F., Juin, P., Oliver, L., Martin, S., Meflah, K., and Vallette, F. M. (2003). Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 23, 4701-4712.

Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J. L., Nunez, G., *et al.* (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10, 105-115.

Ceresa, B. P., and Pessin, J. E. (1996). Insulin stimulates the serine phosphorylation of the signal transducer and activator of transcription (STAT3) isoform. *J Biol Chem* 271, 12121-12124.

Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T. D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* 14, 278-288.

Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S., and Halazonetis, T. D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13777-13782.

- Cheng, C., Kussie, P., Pavletich, N., and Shuman, S. (1998). Conservation of structure and mechanism between eukaryotic topoisomerase I and site-specific recombinases. *Cell* 92, 841-850.
- Chin, Y. E., Kitagawa, M., Su, W. C., You, Z. H., Iwamoto, Y., and Fu, X. Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272, 719-722.
- Chung, J., Uchida, E., Grammer, T. C., and Blenis, J. (1997). STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17, 6508-6516.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., *et al.* (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
- Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N., and Golub, T. R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3260-3265.
- Cramer, A., Kleiner, S., Westermann, M., Meissner, A., Lange, A., and Friedrich, K. (2005). Activation of the c-Met receptor complex in fibroblasts drives invasive cell behavior by signaling through transcription factor STAT3. *J Cell Biochem* 95, 805-816.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., *et al.* (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351, 337-345.
- Dalla-Favera, R., Wong-Staal, F., and Gallo, R. C. (1982). Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient. *Nature* 299, 61-63.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.
- De Souza, C. P., Ellem, K. A., and Gabrielli, B. G. (2000). Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events. *Exp Cell Res* 257, 11-21.
- Decker, T., and Kovarik, P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19, 2628-2637.
- Decker, T., Kovarik, P., and Meinke, A. (1997). GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 17, 121-134.
- Desai, S. D., Zhang, H., Rodriguez-Bauman, A., Yang, J. M., Wu, X., Gounder, M. K., Rubin, E. H., and Liu, L. F. (2003). Transcription-dependent degradation of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Mol Cell Biol* 23, 2341-2350.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.
- Donzelli, M., and Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* 4, 671-677.
- Du, J., and Hannon, G. J. (2004). Suppression of p160ROCK bypasses cell cycle arrest after Aurora-A/STK15 depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8975-8980.
- Dumaz, N., and Meek, D. W. (1999). Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *Embo J* 18, 7002-7010.
- Duncan, D. S., McWilliam, P., Tighe, O., Parle-McDermott, A., and Croke, D. T. (2002). Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene* 21, 3253-3257.

- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouche, J. P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., *et al.* (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* *117*, 2523-2531.
- Dutertre, S., Descamps, S., and Prigent, C. (2002). On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene* *21*, 6175-6183.
- Engelhardt, M., Drullinsky, P., Guillem, J., and Moore, M. A. (1997). Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* *3*, 1931-1941.
- Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M. A., Gonzalez, S., Tarafa, G., Sidransky, D., Meltzer, S. J., *et al.* (2000). Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* *60*, 4366-4371.
- Ewart-Toland, A., Briassouli, P., de Koning, J. P., Mao, J. H., Yuan, J., Chan, F., MacCarthy-Morrogh, L., Ponder, B. A., Nagase, H., Burn, J., *et al.* (2003). Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nat Genet* *34*, 403-412.
- Eyers, P. A., Erikson, E., Chen, L. G., and Maller, J. L. (2003). A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr Biol* *13*, 691-697.
- Faragher, A. J., and Fry, A. M. (2003). Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles. *Mol Biol Cell* *14*, 2876-2889.
- Farruggio, D. C., Townsley, F. M., and Ruderman, J. V. (1999). Cdc20 associates with the kinase aurora2/Aik. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 7306-7311.
- Feng, L., Hollstein, M., and Xu, Y. (2006). Ser46 phosphorylation regulates p53-dependent apoptosis and replicative senescence. *Cell Cycle* *5*, 2812-2819.
- Fu, A. K., Fu, W. Y., Ng, A. K., Chien, W. W., Ng, Y. P., Wang, J. H., and Ip, N. Y. (2004). Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 6728-6733.
- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E. V., Bronson, R. T., and Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* *437*, 1043-1047.
- Fukada, T., Ohtani, T., Yoshida, Y., Shirogane, T., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *Embo J* *17*, 6670-6677.
- Ganem, N. J., Godinho, S. A., and Pellman, D. (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* *460*, 278-282.
- Gao, C. Y., Stepp, M. A., Fariss, R., and Zelenka, P. (2004). Cdk5 regulates activation and localization of Src during corneal epithelial wound closure. *J Cell Sci* *117*, 4089-4098.
- Gao, S. P., Mark, K. G., Leslie, K., Pao, W., Motoi, N., Gerald, W. L., Travis, W. D., Bornmann, W., Veach, D., Clarkson, B., and Bromberg, J. F. (2007). Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest* *117*, 3846-3856.
- Garcia, R., Bowman, T. L., Niu, G., Yu, H., Minton, S., Muro-Cacho, C. A., Cox, C. E., Falcone, R., Fairclough, R., Parsons, S., *et al.* (2001). Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* *20*, 2499-2513.
- Gartel, A. L., and Shchors, K. (2003). Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* *283*, 17-21.

- Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuasen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B. B., Bartek, J., and Khanna, K. K. (2003). Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 278, 14806-14811.
- Gatei, M., Young, D., Cersaletti, K. M., Desai-Mehta, A., Spring, K., Kozlov, S., Lavin, M. F., Gatti, R. A., Concannon, P., and Khanna, K. (2000). ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nat Genet* 25, 115-119.
- Giraud, S., Bienvenu, F., Avril, S., Gascan, H., Heery, D. M., and Coqueret, O. (2002). Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. *J Biol Chem* 277, 8004-8011.
- Giraud, S., Hurlstone, A., Avril, S., and Coqueret, O. (2004). Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the p21waf1 gene. *Oncogene* 23, 7391-7398.
- Glover, D. M., Leibowitz, M. H., McLean, D. A., and Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81, 95-105.
- Gopalan, G., Chan, C. S., and Donovan, P. J. (1997). A novel mammalian, mitotic spindle-associated kinase is related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *J Cell Biol* 138, 643-656.
- Gough, D. J., Corlett, A., Schlessinger, K., Wegrzyn, J., Larner, A. C., and Levy, D. E. (2009). Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science* 324, 1713-1716.
- Grinberg, A. V., Hu, C. D., and Kerppola, T. K. (2004). Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells. *Mol Cell Biol* 24, 4294-4308.
- Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., *et al.* (2006). Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 12, 11-19.
- Hanks, S., Coleman, K., Reid, S., Plaja, A., Firth, H., Fitzpatrick, D., Kidd, A., Mehes, K., Nash, R., Robin, N., *et al.* (2004). Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet* 36, 1159-1161.
- Hao, J., Li, T. G., Qi, X., Zhao, D. F., and Zhao, G. Q. (2006). WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 290, 81-91.
- Hawthorne, V. S., Huang, W. C., Neal, C. L., Tseng, L. M., Hung, M. C., and Yu, D. (2009). ErbB2-mediated Src and signal transducer and activator of transcription 3 activation leads to transcriptional up-regulation of p21Cip1 and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7, 592-600.
- Hemmann, U., Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Kurapkat, G., Grotzinger, J., Wollmer, A., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr., Graeve, L., *et al.* (1996). Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. *J Biol Chem* 271, 12999-13007.
- Higashimoto, Y., Saito, S., Tong, X. H., Hong, A., Sakaguchi, K., Appella, E., and Anderson, C. W. (2000). Human p53 is phosphorylated on serines 6 and 9 in response to DNA damage-inducing agents. *J Biol Chem* 275, 23199-23203.
- Hill, C., and Doyon, F. (2006). [The frequency of cancer in France in year 2002, and trends since 1968]. *Bull Cancer* 93, 7-11.
- Hinoi, T., Akyol, A., Theisen, B. K., Ferguson, D. O., Greenson, J. K., Williams, B. O., Cho, K. R., and Fearon, E. R. (2007). Mouse model of colonic adenoma-carcinoma progression based on somatic Apc inactivation. *Cancer Res* 67, 9721-9730.
- Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., and Saya, H. (2003). Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114, 585-598.

- Hofseth, L. J., Hussain, S. P., and Harris, C. C. (2004). p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 25, 177-181.
- Hooker, C. W., and Hurlin, P. J. (2006). Of Myc and Mnt. *J Cell Sci* 119, 208-216.
- Iacopetta, B. (2003). TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat* 21, 271-276.
- Irby, R. B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J. M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D. J., Jove, R., and Yeatman, T. J. (1999). Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet* 21, 187-190.
- Iritani, B. M., Delrow, J., Grandori, C., Gomez, I., Klacking, M., Carlos, L. S., and Eisenman, R. N. (2002). Modulation of T-lymphocyte development, growth and cell size by the Myc antagonist and transcriptional repressor Mad1. *Embo J* 21, 4820-4830.
- Jacobs, J. J., Scheijen, B., Voncken, J. W., Kieboom, K., Berns, A., and van Lohuizen, M. (1999). Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* 13, 2678-2690.
- Jain, N., Zhang, T., Kee, W. H., Li, W., and Cao, X. (1999). Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem* 274, 24392-24400.
- Jenab, S., and Morris, P. L. (1998). Testicular leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor mediate phosphorylation of signal transducers and activators of transcription (STAT)-3 and STAT-1 and induce c-fos transcription and activator protein-1 activation in rat Sertoli but not germ cells. *Endocrinology* 139, 1883-1890.
- Jin, J., Shirogane, T., Xu, L., Nalepa, G., Qin, J., Elledge, S. J., and Harper, J. W. (2003). SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev* 17, 3062-3074.
- Kaiser, S., Park, Y. K., Franklin, J. L., Halberg, R. B., Yu, M., Jessen, W. J., Freudenberg, J., Chen, X., Haigis, K., Jegga, A. G., *et al.* (2007). Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. *Genome Biol* 8, R131.
- Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H., Yuan, Z. M., Bondaruk, J., Suzuki, F., Fujii, S., Arlinghaus, R. B., Czerniak, B. A., and Sen, S. (2004). Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* 36, 55-62.
- Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M., and Sen, S. (2001). Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J Biol Chem* 276, 46219-46224.
- Kawada, M., Seno, H., Uenoyama, Y., Sawabu, T., Kanda, N., Fukui, H., Shimahara, Y., and Chiba, T. (2006). Signal transducers and activators of transcription 3 activation is involved in nuclear accumulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Cancer Res* 66, 2913-2917.
- Kawato, Y., Furuta, T., Aonuma, M., Yasuoka, M., Yokokura, T., and Matsumoto, K. (1991). Antitumor activity of a camptothecin derivative, CPT-11, against human tumor xenografts in nude mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 28, 192-198.
- Kimura, M., Kotani, S., Hattori, T., Sumi, N., Yoshioka, T., Todokoro, K., and Okano, Y. (1997). Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* and yeast Ipl1. *J Biol Chem* 272, 13766-13771.
- Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
- Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1999). STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med* 189, 63-73.
- Kleine-Kohlbrecher, D., Adhikary, S., and Eilers, M. (2006). Mechanisms of transcriptional repression by Myc. *Curr Top Microbiol Immunol* 302, 51-62.

- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *68*, 820-823.
- Kongkanunt, R., Bubb, V. J., Sansom, O. J., Wyllie, A. H., Harrison, D. J., and Clarke, A. R. (1999). Dysregulated expression of beta-catenin marks early neoplastic change in *Apc* mutant mice, but not all lesions arising in *Msh2* deficient mice. *Oncogene* *18*, 7219-7225.
- Konnikova, L., Simeone, M. C., Kruger, M. M., Kotecki, M., and Cochran, B. H. (2005). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res* *65*, 6516-6520.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in *APC*^{-/-} colon carcinoma. *Science* *275*, 1784-1787.
- Kunte, D. P., Wali, R. K., Koetsier, J. L., Hart, J., Kostjukova, M. N., Kilimnik, A. Y., Pyatkin, I. G., Strelnikova, S. R., and Roy, H. K. (2005). Down-regulation of the tumor suppressor gene C-terminal Src kinase: an early event during premalignant colonic epithelial hyperproliferation. *FEBS Lett* *579*, 3497-3502.
- Kusakawa, G., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. (2000). Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem* *275*, 17166-17172.
- Lane, D. P., and Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* *278*, 261-263.
- Lavin, M. F., and Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* *13*, 941-950.
- Lee, J. Y., Kang, M. B., Jang, S. H., Qian, T., Kim, H. J., Kim, C. H., Kim, Y., and Kong, G. (2009). Id-1 activates Akt-mediated Wnt signaling and p27(Kip1) phosphorylation through PTEN inhibition. *Oncogene* *28*, 824-831.
- Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M., and Tsai, L. H. (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* *405*, 360-364.
- Lentini, L., Amato, A., Schillaci, T., and Di Leonardo, A. (2007). Simultaneous Aurora-A/STK15 overexpression and centrosome amplification induce chromosomal instability in tumour cells with a MIN phenotype. *BMC Cancer* *7*, 212.
- Leslie, K., Lang, C., Devgan, G., Azare, J., Berishaj, M., Gerald, W., Kim, Y. B., Paz, K., Darnell, J. E., Albanese, C., *et al.* (2006). Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res* *66*, 2544-2552.
- Li, G. M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* *18*, 85-98.
- Lim, D. S., Kim, S. T., Xu, B., Maser, R. S., Lin, J., Petrini, J. H., and Kastan, M. B. (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* *404*, 613-617.
- Lin, W. F., Chen, C. J., Chang, Y. J., Chen, S. L., Chiu, I. M., and Chen, L. (2009). SH2B1beta enhances fibroblast growth factor 1 (FGF1)-induced neurite outgrowth through MEK-ERK1/2-STAT3-Egr1 pathway. *Cell Signal* *21*, 1060-1072.
- Littlepage, L. E., Wu, H., Andresson, T., Deanehan, J. K., Amundadottir, L. T., and Ruderman, J. V. (2002). Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 15440-15445.
- Liu, H., Ma, Y., Cole, S. M., Zander, C., Chen, K. H., Karras, J., and Pope, R. M. (2003). Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival. *Blood* *102*, 344-352.

- Loeb, L. A. (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51, 3075-3079.
- Lowe, S. W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315.
- Lu, W. J., Amatruda, J. F., and Abrams, J. M. (2009). p53 ancestry: gazing through an evolutionary lens. *Nat Rev Cancer* 9, 758-762.
- Ma, J., Zhang, T., Novotny-Diermayr, V., Tan, A. L., and Cao, X. (2003). A novel sequence in the coiled-coil domain of Stat3 essential for its nuclear translocation. *J Biol Chem* 278, 29252-29260.
- Magrath, I. (1990). The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res* 55, 133-270.
- Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M., and Vinkemeier, U. (2004). Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J Cell Biol* 165, 823-833.
- Maritano, D., Sugrue, M. L., Tininini, S., Dewilde, S., Strobl, B., Fu, X., Murray-Tait, V., Chiarle, R., and Poli, V. (2004). The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol* 5, 401-409.
- McArthur, G. A., Foley, K. P., Fero, M. L., Walkley, C. R., Deans, A. J., Roberts, J. M., and Eisenman, R. N. (2002). MAD1 and p27(KIP1) cooperate to promote terminal differentiation of granulocytes and to inhibit Myc expression and cyclin E-CDK2 activity. *Mol Cell Biol* 22, 3014-3023.
- McMahon, S. B., Wood, M. A., and Cole, M. D. (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* 20, 556-562.
- Melen, K., Kinnunen, L., and Julkunen, I. (2001). Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. *J Biol Chem* 276, 16447-16455.
- Melero, J. A., Stitt, D. T., Mangel, W. F., and Carroll, R. B. (1979). Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* 93, 466-480.
- Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E. A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *Embo J* 21, 483-492.
- Merlo, A., Herman, J. G., Mao, L., Lee, D. J., Gabrielson, E., Burger, P. C., Baylin, S. B., and Sidransky, D. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1, 686-692.
- Metge, B., Ofori-Acquah, S., Stevens, T., and Balczon, R. (2004). Stat3 activity is required for centrosome duplication in chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 279, 41801-41806.
- Michael, D., and Oren, M. (2003). The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* 13, 49-58.
- Michalovitz, D., Halevy, O., and Oren, M. (1990). Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* 62, 671-680.
- Morham, S. G., Kluckman, K. D., Voulomanos, N., and Smithies, O. (1996). Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection. *Mol Cell Biol* 16, 6804-6809.
- Muller, P. A., Caswell, P. T., Doyle, B., Iwanicki, M. P., Tan, E. H., Karim, S., Lukashchuk, N., Gillespie, D. A., Ludwig, R. L., Gosselin, P., *et al.* (2009). Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell* 139, 1327-1341.
- Musacchio, A., and Hardwick, K. G. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 731-741.

- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.
- Nassif, N. T., Lobo, G. P., Wu, X., Henderson, C. J., Morrison, C. D., Eng, C., Jalaludin, B., and Segelov, E. (2004). PTEN mutations are common in sporadic microsatellite stable colorectal cancer. *Oncogene* 23, 617-628.
- Ng, J., and Cantrell, D. (1997). STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes. Interleukin 2 and T cell antigen receptor signals converge upon serine 727. *J Biol Chem* 272, 24542-24549.
- Ng, Y. P., Cheung, Z. H., and Ip, N. Y. (2006). STAT3 as a downstream mediator of Trk signaling and functions. *J Biol Chem* 281, 15636-15644.
- O'Hagan, R. C., Ohh, M., David, G., de Alboran, I. M., Alt, F. W., Kaelin, W. G., Jr., and DePinho, R. A. (2000). Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev* 14, 2185-2191.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., and Taya, Y. (2000). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102, 849-862.
- Ogata, Y., Osaki, T., Naka, T., Iwahori, K., Furukawa, M., Nagatomo, I., Kijima, T., Kumagai, T., Yoshida, M., Tachibana, I., and Kawase, I. (2006). Overexpression of PIAS3 suppresses cell growth and restores the drug sensitivity of human lung cancer cells in association with PI3-K/Akt inactivation. *Neoplasia* 8, 817-825.
- Oskarsson, T., Essers, M. A., Dubois, N., Offner, S., Dubey, C., Roger, C., Metzger, D., Chambon, P., Hummler, E., Beard, P., and Trumpp, A. (2006). Skin epidermis lacking the c-Myc gene is resistant to Ras-driven tumorigenesis but can reacquire sensitivity upon additional loss of the p21Cip1 gene. *Genes Dev* 20, 2024-2029.
- Park, S., Kim, D., Kaneko, S., Szewczyk, K. M., Nicosia, S. V., Yu, H., Jove, R., and Cheng, J. Q. (2005). Molecular cloning and characterization of the human AKT1 promoter uncovers its up-regulation by the Src/Stat3 pathway. *J Biol Chem* 280, 38932-38941.
- Payne, G. S., Bishop, J. M., and Varmus, H. E. (1982). Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature* 295, 209-214.
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2, 764-776.
- Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., and Evan, G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* 3, 565-577.
- Peters, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* 9, 931-943.
- Petrini, J. H. (2000). The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase. *Curr Opin Cell Biol* 12, 293-296.
- Phan, R. T., Saito, M., Basso, K., Niu, H., and Dalla-Favera, R. (2005). BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* 6, 1054-1060.
- Phelps, R. A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, I. T., Rai, K., Broadbent, T., Sarkar, S., Burt, R. W., and Jones, D. A. (2009). A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* 137, 623-634.
- Pino, M. S., and Chung, D. C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2059-2072.

- Podsypanina, K., Ellenson, L. H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K. M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P. E., and Parsons, R. (1999). Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 1563-1568.
- Polakis, P. (2002). Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. *Curr Biol* *12*, R499-R501.
- Polakis, P., Hart, M., and Rubinfeld, B. (1999). Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol* *470*, 23-32.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* *6*, 789-802.
- Pommier, Y., Barcelo, J. M., Rao, V. A., Sordet, O., Jobson, A. G., Thibaut, L., Miao, Z. H., Seiler, J. A., Zhang, H., Marchand, C., *et al.* (2006). Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* *81*, 179-229.
- Pommier, Y., Redon, C., Rao, V. A., Seiler, J. A., Sordet, O., Takemura, H., Antony, S., Meng, L., Liao, Z., Kohlhagen, G., *et al.* (2003). Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat Res* *532*, 173-203.
- Puthier, D., Bataille, R., and Amiot, M. (1999). IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur J Immunol* *29*, 3945-3950.
- Qin, H. R., Kim, H. J., Kim, J. Y., Hurt, E. M., Klarmann, G. J., Kawasaki, B. T., Duhagon Serrat, M. A., and Farrar, W. L. (2008). Activation of signal transducer and activator of transcription 3 through a phosphomimetic serine 727 promotes prostate tumorigenesis independent of tyrosine 705 phosphorylation. *Cancer Res* *68*, 7736-7741.
- Ren, Z., and Schaefer, T. S. (2002). ErbB-2 activates Stat3 alpha in a Src- and JAK2-dependent manner. *J Biol Chem* *277*, 38486-38493.
- Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Le Guellec, R., Couturier, A., Doree, M., Philippe, M., and Prigent, C. (1998). The *Xenopus* protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J Cell Sci* *111 (Pt 5)*, 557-572.
- Rottmann, S., and Luscher, B. (2006). The Mad side of the Max network: antagonizing the function of Myc and more. *Curr Top Microbiol Immunol* *302*, 63-122.
- Rouault, J. P., Falette, N., Guehenneux, F., Guillot, C., Rimokh, R., Wang, Q., Berthet, C., Moyret-Lalle, C., Savatier, P., Pain, B., *et al.* (1996). Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. *Nat Genet* *14*, 482-486.
- Roy, N., Stoyanova, T., Dominguez-Brauer, C., Park, H. J., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. DDB2, an essential mediator of premature senescence. *Mol Cell Biol* *30*, 2681-2692.
- Saito, S., Goodarzi, A. A., Higashimoto, Y., Noda, Y., Lees-Miller, S. P., Appella, E., and Anderson, C. W. (2002). ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* *277*, 12491-12494.
- Saito, T., Konno, T., Hosokawa, T., Asada, A., Ishiguro, K., and Hisanaga, S. (2007). p25/cyclin-dependent kinase 5 promotes the progression of cell death in nucleus of endoplasmic reticulum-stressed neurons. *J Neurochem* *102*, 133-140.
- Sakaguchi, K., Saito, S., Higashimoto, Y., Roy, S., Anderson, C. W., and Appella, E. (2000). Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem* *275*, 9278-9283.
- Saltz, L. B., Cox, J. V., Blanke, C., Rosen, L. S., Fehrenbacher, L., Moore, M. J., Maroun, J. A., Ackland, S. P., Locker, P. K., Pirota, N., *et al.* (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* *343*, 905-914.

- Samuels-Lev, Y., O'Connor, D. J., Bergamaschi, D., Trigiante, G., Hsieh, J. K., Zhong, S., Campargue, I., Naumovski, L., Crook, T., and Lu, X. (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 8, 781-794.
- Sansom, O. J., Meniel, V. S., Muncan, V., Phesse, T. J., Wilkins, J. A., Reed, K. R., Vass, J. K., Athineos, D., Clevers, H., and Clarke, A. R. (2007). Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* 446, 676-679.
- Sansom, O. J., Reed, K. R., Hayes, A. J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I. P., Battle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I. S., *et al.* (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 18, 1385-1390.
- Schuringa, J. J., Dekker, L. V., Vellenga, E., and Kruijer, W. (2001). Sequential activation of Rac-1, SEK-1/MKK-4, and protein kinase Cdelta is required for interleukin-6-induced STAT3 Ser-727 phosphorylation and transactivation. *J Biol Chem* 276, 27709-27715.
- Schwarz, J. K., Lovly, C. M., and Piwnica-Worms, H. (2003). Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. *Mol Cancer Res* 1, 598-609.
- Sears, R. C. (2004). The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle* 3, 1133-1137.
- Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massague, J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol* 3, 400-408.
- Shah, M. A., and Schwartz, G. K. (2001). Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 7, 2168-2181.
- Shen, Y., Schlessinger, K., Zhu, X., Meffre, E., Quimby, F., Levy, D. E., and Darnell, J. E., Jr. (2004). Essential role of STAT3 in postnatal survival and growth revealed by mice lacking STAT3 serine 727 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 24, 407-419.
- Shi, X., Zhang, H., Paddon, H., Lee, G., Cao, X., and Pelech, S. (2006). Phosphorylation of STAT3 serine-727 by cyclin-dependent kinase 1 is critical for nocodazole-induced mitotic arrest. *Biochemistry* 45, 5857-5867.
- Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V. R., and Darnell, J. E., Jr. (1992). Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* 258, 1808-1812.
- Sparks, A. B., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998). Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 1130-1134.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., and Eilers, M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 3, 392-399.
- Stoyanova, T., Roy, N., Kopanja, D., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. (2009a). DDB2 decides cell fate following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 10690-10695.
- Stoyanova, T., Roy, N., Kopanja, D., Raychaudhuri, P., and Bagchi, S. (2009b). DDB2 (damaged-DNA binding protein 2) in nucleotide excision repair and DNA damage response. *Cell Cycle* 8, 4067-4071.
- Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., and Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348, 331-333.
- Strate, L. L., and Syngal, S. (2005). Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer Causes Control* 16, 201-213.
- Sudakin, V., Chan, G. K., and Yen, T. J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 154, 925-936.

- Sugasawa, K., Ng, J. M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P. J., Eker, A. P., Hanaoka, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* 2, 223-232.
- Sugimoto, K., Urano, T., Zushi, H., Inoue, K., Tasaka, H., Tachibana, M., and Dotsu, M. (2002). Molecular dynamics of Aurora-A kinase in living mitotic cells simultaneously visualized with histone H3 and nuclear membrane protein importin α . *Cell Struct Funct* 27, 457-467.
- Takagi, M., Absalon, M. J., McLure, K. G., and Kastan, M. B. (2005). Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 123, 49-63.
- Takahashi, T., Sano, B., Nagata, T., Kato, H., Sugiyama, Y., Kunieda, K., Kimura, M., Okano, Y., and Saji, S. (2003). Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci* 94, 148-152.
- Takemaru, K. I., and Moon, R. T. (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* 149, 249-254.
- Tan, T., and Chu, G. (2002). p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. *Mol Cell Biol* 22, 3247-3254.
- Tanaka, M., Ueda, A., Kanamori, H., Ideguchi, H., Yang, J., Kitajima, S., and Ishigatsubo, Y. (2002). Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1. *J Biol Chem* 277, 10719-10726.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.
- Tian, B., Yang, Q., and Mao, Z. (2009). Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death. *Nat Cell Biol* 11, 211-218.
- Tsutsumi, K., Takano, T., Endo, R., Fukuda, M., Ohshima, T., Tomomura, M., and Hisanaga, S. Phosphorylation of AATYK1 by Cdk5 suppresses its tyrosine phosphorylation. *PLoS One* 5, e10260.
- Turkson, J., Bowman, T., Adnane, J., Zhang, Y., Djeu, J. Y., Sekharam, M., Frank, D. A., Holzman, L. B., Wu, J., Sebt, S., and Jove, R. (1999). Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. *Mol Cell Biol* 19, 7519-7528.
- Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T. K., Hampton, G. M., and Wahl, G. M. (2002). c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* 9, 1031-1044.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., *et al.* (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.
- Vigneron, A., Cherier, J., Barre, B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2006). The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *J Biol Chem* 281, 34742-34750.
- Vigneron, A., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2008). The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Eme1 endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition. *Cancer Res* 68, 815-825.
- Wakasugi, M., Shimizu, M., Morioka, H., Linn, S., Nikaido, O., and Matsunaga, T. (2001). Damaged DNA-binding protein DDB stimulates the excision of cyclobutane pyrimidine dimers in vitro in concert with XPA and replication protein A. *J Biol Chem* 276, 15434-15440.
- Wall, M. E., Wani, M. C., and Taylor, H. (1976). Isolation and chemical characterization of antitumor agents from plants. *Cancer Treat Rep* 60, 1011-1030.

- Wang, J., Xie, L. Y., Allan, S., Beach, D., and Hannon, G. J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev* 12, 1769-1774.
- Wang, R., Cherukuri, P., and Luo, J. (2005). Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *J Biol Chem* 280, 11528-11534.
- Wang, X., Zhou, Y. X., Qiao, W., Tominaga, Y., Ouchi, M., Ouchi, T., and Deng, C. X. (2006). Overexpression of aurora kinase A in mouse mammary epithelium induces genetic instability preceding mammary tumor formation. *Oncogene* 25, 7148-7158.
- Webley, K., Bond, J. A., Jones, C. J., Blaydes, J. P., Craig, A., Hupp, T., and Wynford-Thomas, D. (2000). Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 20, 2803-2808.
- Wegenka, U.M., Buschmann, J., Luttkicken, C., Heinrich, P.C., and Horn, F. (1993). Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol* 13, 276-288.
- Wen, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1997). Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res* 25, 2062-2067.
- Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82, 241-250.
- Wold, M. S. (1997). Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 66, 61-92.
- Wolf, D., Admon, S., Oren, M., and Rotter, V. (1984). Abelson murine leukemia virus-transformed cells that lack p53 protein synthesis express aberrant p53 mRNA species. *Mol Cell Biol* 4, 552-558.
- Wong, N. A., and Pignatelli, M. (2002). Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 160, 389-401.
- Worthley, D. L., Whitehall, V. L., Spring, K. J., and Leggett, B. A. (2007). Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 13, 3784-3791.
- Xiao, H., Chung, J., Kao, H. Y., and Yang, Y. C. (2003). Tip60 is a co-repressor for STAT3. *J Biol Chem* 278, 11197-11204.
- Yan, S., Zhou, C., Zhang, W., Zhang, G., Zhao, X., Yang, S., Wang, Y., Lu, N., Zhu, H., and Xu, N. (2008). beta-Catenin/TCF pathway upregulates STAT3 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 271, 85-97.
- Yang, H. S., and Hinds, P. W. (2006). Phosphorylation of ezrin by cyclin-dependent kinase 5 induces the release of Rho GDP dissociation inhibitor to inhibit Rac1 activity in senescent cells. *Cancer Res* 66, 2708-2715.
- Yang, J., Chatterjee-Kishore, M., Staugaitis, S. M., Nguyen, H., Schlessinger, K., Levy, D. E., and Stark, G. R. (2005). Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res* 65, 939-947.
- Yang, J., Liao, X., Agarwal, M. K., Barnes, L., Auron, P. E., and Stark, G. R. (2007). Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev* 21, 1396-1408.
- Yang, J., and Stark, G. R. (2008). Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res* 18, 443-451.
- Yeaman, T. J. (2004). A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4, 470-480.
- Yokogami, K., Wakisaka, S., Avruch, J., and Reeves, S. A. (2000). Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol* 10, 47-50.

- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* *352*, 345-347.
- Yoshida, Y., Kumar, A., Koyama, Y., Peng, H., Arman, A., Boch, J. A., and Auron, P. E. (2004). Interleukin 1 activates STAT3/nuclear factor-kappaB cross-talk via a unique TRAF6- and p65-dependent mechanism. *J Biol Chem* *279*, 1768-1776.
- Yu, H., Pardoll, D., and Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* *9*, 798-809.
- Yuan, Z.L., Guan, Y.J., Chatterjee, D., and Chin, Y.E. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* *307*, 269-273.
- Zeng, Y., and Piwnica-Worms, H. (1999). DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol* *19*, 7410-7419.
- Zhang, J., Shen, B., Li, Y., and Sun, Y. (2001). STAT3 exerts two-way regulation in the biological effects of IL-6 in M1 leukemia cells. *Leuk Res* *25*, 463-472.
- Zhang, Q., Wang, H. Y., Marzec, M., Raghunath, P. N., Nagasawa, T., and Wasik, M. A. (2005). STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 6948-6953.
- Zhao, H., Nakajima, R., Kunimoto, H., Sasaki, T., Kojima, H., and Nakajima, K. (2004). Region 752-761 of STAT3 is critical for SRC-1 recruitment and Ser727 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* *325*, 541-548.
- Zhao, H., and Piwnica-Worms, H. (2001). ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* *21*, 4129-4139.
- Zhao, S., Weng, Y. C., Yuan, S. S., Lin, Y. T., Hsu, H. C., Lin, S. C., Gerbino, E., Song, M. H., Zdzienicka, M. Z., Gatti, R. A., *et al.* (2000). Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* *405*, 473-477.
- Zheng, S., Chen, P., McMillan, A., Lafuente, A., Lafuente, M. J., Ballesta, A., Trias, M., and Wiencke, J. K. (2000). Correlations of partial and extensive methylation at the p14(ARF) locus with reduced mRNA expression in colorectal cancer cell lines and clinicopathological features in primary tumors. *Carcinogenesis* *21*, 2057-2064.
- Zhivotovsky, B., and Kroemer, G. (2004). Apoptosis and genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 752-762.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W. L., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R., and Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* *20*, 189-193.
- Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* *12*, 2424-2433.
- Zindy, F., Knoepfler, P. S., Xie, S., Sherr, C. J., Eisenman, R. N., and Roussel, M. F. (2006). N-Myc and the cyclin-dependent kinase inhibitors p18Ink4c and p27Kip1 coordinately regulate cerebellar development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 11579-11583.
- Zou, L., and Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* *300*, 1542-1548.

RESUME

Les facteurs de transcription STAT3 sont activés et impliqués dans le développement tumoral par leurs effets sur la prolifération et la survie cellulaire. Lorsque STAT3 est phosphorylé sur la tyrosine 705, il semble impliqué dans la transformation cellulaire et dans l'échappement aux traitements classiques de chimiothérapie. Un second site de phosphorylation sur la sérine 727 a été décrit mais son implication dans la régulation de l'activité de STAT3 en réponse aux traitements a été peu étudiée.

Nous nous sommes donc intéressés au rôle de la phosphorylation de la sérine 727 de STAT3 dans la réponse de lignées cellulaires colorectales aux agents génotoxiques et plus particulièrement aux inhibiteurs de topoisomérases de type I. Le traitement entraîne une perte de la transcription de la cycline D1 et de myc, gènes cibles de STAT3 phosphorylée sur tyrosine 705 et une activation de la kinase cdk5. Cette dernière va phosphoryler STAT3 sur son résidu sérine 727 ce qui va lui permettre de se fixer sur le promoteur du gène de la protéine de réparation Emel, pour activer sa transcription. Ceci permet la réparation des dommages de l'ADN induits par le Sn38 et entraîne une diminution de la sensibilité au traitement. D'autre part, l'inhibition des topoisomérases entraîne une perte de la protéine myc normalement liée au promoteur d'Aurora A en phase G2/M et qui, associée au recrutement des répresseurs mad et miz aboutit à l'inhibition de la transcription de la kinase Aurora A. Une inhibition de la séparation des centrosomes est alors observée et entraîne un arrêt en phase G2/M.

En plus de la régulation de l'activité transcriptionnelle de STAT3 phosphorylée sur la sérine, nous nous sommes intéressés aux partenaires protéiques du facteur de transcription en réponse à sa phosphorylation. Par l'intermédiaire de la technique du double hybride et de la spectrométrie de masse, nous avons pu mettre en évidence deux nouveaux partenaires potentiels de STAT3. D'abord DDB2, protéine impliquée dans l'entrée en sénescence et dans la méthylation de l'ADN. Puis, ASPP2, une protéine qui confère à p53 une meilleure affinité de fixation à certains de ses promoteurs.

Nous pensons que la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 pourrait être impliquée dans l'induction de la sénescence et dans la réparation des dommages de l'ADN et que la cellule tumorale détournerait ces processus de protection pour réparer son ADN afin de résister au traitement. Les cellules pourraient alors proliférer avec un matériel génétique abîmé, ce qui rendrait ces cellules instables sur le plan génomique. La détection de cette phosphorylation de STAT3 pourrait être utilisée comme un marqueur de résistance aux inhibiteurs de topoisomérase. Ceci pourrait ainsi permettre de mieux prédire la réponse des patients à ce traitement.

DISCIPLINE : Biologie cellulaire et moléculaire

MOTS-CLEFS : STAT3, cdk5, c-myc, Aurora A, régulation transcriptionnelle, stress génotoxique, inhibiteur des topoisomérases, dommages de l'ADN, résistance aux traitements

Sandy Courapied

U892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers

Centre Régional de Lutte Contre de Cancer, Paul PAPIN

2 rue Moll

49933 ANGERS cedex 09