UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Université Henri Poincaré, Nancy I

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie, Santé, Environnement

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY I
EN ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Par

Vanessa MINIG

ETUDE DU MECANISME DE REGULATION DU GENE ET DE L'IMPORTANCE BIOLOGIQUE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE A MANGANESE DANS LA CROISSANCE TUMORALE MAMMAIRE

Soutenance publique le 27 mars 2009

Membres du jury :

Rapporteurs :	**Pr. Corinne ABBADIE**	**UMR 8161 – CNRS / Université de Lille, Lille**
	Dr. Angela SUTTON	**INSERM U698 – Université Paris XIII, Bobigny**
Examinateurs :		
Président	**Pr. Athanase VISVIKIS**	**UMR 7567 – CNRS / UHP Nancy I, Nancy**
	Dr. Jean BRETON	**UMR E3 – CEA / Université J. Fourier, Grenoble**
Directeur de thèse	**Pr. Philippe BECUWE**	**EA 4001 PREDICTHER – UHP Nancy I, Nancy**

Laboratoire de Biologie Cellulaire, EA 4001 PREDICTHER
Faculté des Sciences et Techniques – 54506 Vandoeuvre – Lès – Nancy

A mes parents, Denise et Hubert ...

REMERCIEMENTS

* * *

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Philippe BECUWE, directeur du laboratoire de Biologie Cellulaire de l'EA PREDICTHER, qui a dirigé ce travail de thèse. Au cours de ces années, ta grande disponibilité, ta rigueur scientifique, ton enthousiasme et tes précieux conseils m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions. Merci également pour tes encouragements, pour la correction du manuscrit et pour la bienveillance dont tu as fait preuve à mon égard pendant cette thèse. Sois assuré, Philippe, de mon profond respect, de ma gratitude et de toute ma sympathie.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement Madame Corinne Abbadie, Professeur à l'Université de Lille à l'UMR 8161, ainsi que Madame Angela SUTTON, Docteur à l'Université Paris XIII à l'INSERM U698, d'avoir consacré du temps à la lecture de ce manuscrit en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.
Je veux également adresser tous mes remerciements à Monsieur Athanase VISVIKIS, Professeur à l'UHP Nancy I à l'UMR 7567, d'avoir présidé cette commission d'examen, et à Monsieur Jean BRETON, Docteur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble à l'UMR E3, pour sa participation à ce jury de thèse.

J'associe à mes remerciements le comité de Meurthe et Moselle de la Ligue contre le Cancer pour le soutien financier de ma bourse de thèse, et le comité de la Meuse de la Ligue contre le Cancer pour le soutien financier annuel de notre projet scientifique.

Je voudrais ensuite adresser un remerciement particulier à tous nos collaborateurs de l'EA PREDICTHER, ainsi qu'à toutes les membres du laboratoire du Centre Alexis Vautrin de Nancy qui ont de près ou de loin aidé à la réalisation de ce travail.

Je tiens évidemment à remercier toutes celles avec qui j'ai eu le plaisir de partager le bureau, un grand merci à:

Zilal Kattan ; j'ai été ravie de travailler à tes côtés, je te remercie de m'avoir toujours remonté le moral (surtout lorsque les manip' ne fonctionnaient pas !). Je te souhaite bien sur un bon retour en Syrie, mais surtout de la réussite et beaucoup de bonheur avec ta petite famille.

Tu as découvert et apprécié une partie de notre pays, j'ai hâte que tu nous fasses visiter le tien !

Stéphanie Grandemange ; évidemment ta venue au labo a été trop tardive ! je tiens à te remercier pour ton soutien sans faille et tes conseils avisés lors de la rédaction et de la préparation de la soutenance de cette thèse. Je n'oublierai pas ta bonne humeur, nos longues discussions (pas toujours scientifiques !), les petits surnoms « charmants » que tu nous donnais ! Sois assurée, Steph, de toute ma reconnaissance et de toute mon amitié. Enfin, je suis persuadée « *qu'un jour ton prince viendra...*» !

Nadège Touche, pour les nombreuses répétitions lors de la préparation de la soutenance. Merci également pour toutes tes recommandations, car tu as été présente à toutes les étapes cruciales de ce doctorat.

Bérénice Schaerlinger, pour tes précieux conseils. A très bientôt j'espère pour une petite chevauchée à l'Eperon de Nancy !

A Murielle Guillaume,
Assez rapidement, nos relations ont évolué vers une amitié sincère et je tiens à te remercier pour les bons moments passés ensemble, mais également pour ton implication dans ce travail de thèse lors de la relecture du manuscrit et pour ton soutien sans faille. Ne perds pas ton enthousiasme, et continue à te battre pour tes étudiants, pour tes convictions (et pour la révolution !!!).

A nos inséparables techniciennes, Emilie Brunner et Vanessa Besancenot,
Les filles vous m'avez toujours été d'une grande aide et je tenais à vous témoigner toute ma reconnaissance pour le travail réalisé. Je vous remercie également pour tous ces bons moments passés autour d'une tasse à café (notamment à révolutionner la société !) et pour votre enthousiasme, votre sympathie et votre bonne humeur.

A notre Ch'tite biloute Nathalie Degousee,
Ces quelques paroles te reflètent si bien : « [...] Les gens du Nord ont dans le cœur le soleil qu'ils n'ont pas dehors. Les gens du Nord ouvrent toujours leurs portes à ceux qui ont souffert [...] » J'ai été ravie de te rencontrer et de travailler à tes côtés.

Aux nouvelles « Philipettes », Marie Ennen et Najat Ouzzine, bonne chance pour la suite de vos projets professionnels et personnels.

Pour mener à bien ce travail, j'ai également eu le plaisir de rencontrer et de travailler avec de nombreuses personnes. Merci à Michel Dauça, Lionel

Domenjoud, Cathy Fiatte, Annie Stoekel, Armelle Ropars, Sandra Kuntz et Jean-Pol Frippiat.

Un grand merci également à mes amis de toujours,
Annsof, Marine et Vincent, Nico, Johan, Sally, Dgenye, Marjo, Rodrigue, Pittou, Nikus, Noémie, Christine et Jérôme, Annso et tous les autres, pour tous nos grands moments passés ensemble, pour nos soirées et nos week-ends de « décompression ».
A Ritch et Filipe, pour les pauses clopes, vous êtes les prochains, courage !!

Un énorme merci à Brac, pour toutes les fois où tu m'as accompagnée les week-end au labo (tu es maintenant un pro du comptage cellulaire !), pour toute la mise en page de ce manuscrit et pour ton tendre soutien.

Merci à mes parents et à ma famille, pour leur soutien (même de loin du Friuli !), et pour leur présence le jour J.

A mon oncle Gérard...

SOMMAIRE

ABREVIATIONS **1**

INTRODUCTION **6**

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE **8**

I LE CANCER DU SEIN 8
1. Epidémiologie 8
2. Facteurs de risques liés au cancer du sein 9
A. Le sexe féminin 9
B. L'âge de la femme à la première grossesse 9
C. Un âge avancé 9
D. La durée de vie génitale 9
E. Les prédispositions génétiques 10
F. Les modifications du mode de vie des femmes 10
3. Anatomopathologie du cancer du sein 11
A. Les cancers du sein *in-situ* 11
B. Les carcinomes infiltrants 11
C. Les autres tumeurs malignes du sein 12
D. Les métastases 12
4. Les altérations génétiques somatiques 13
5. Les principaux marqueurs biologiques du cancer du sein 14
6. La cancérogenèse mammaire 16
A. Les antécédents familiaux 16
B. Rôle des œstrogènes 16
C. Rôle de la progestérone 18
D. Les facteurs de croissance de la famille des EGF et de l'insuline 18
E. La progression tumorale dans le cancer du sein 20

II LES ESPECES ACTIVES DE L'OXYGENE ET LES DEFENSES ANTIOXYDANTES DANS LE CANCER 22
1. Les différentes espèces actives de l'oxygène (EAO) 22
2. Les défenses antioxydantes 25
A. Les protéines enzymatiques éliminant les EAO 25
A.1. Les superoxydes dismutases (SOD) 25
A.2. La catalase (CAT) 26
A.3. Les glutathions peroxydases (GPX) 27
A.4. Les peroxyrédoxines 28
B. Les autres protéines et molécules antioxydantes 28
C. Les protéines de réparation des dommages oxydatifs 29
D. La régulation des défenses antioxydantes 30
3. Le rôle des EAO dans la transformation cellulaire 31
4. Le rôle des EAO et des défenses antioxydantes dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales 32
A. La production des EAO dans les cellules tumorales 32
B. Rôle des EAO dans la prolifération et la survie des cellules tumorales 33

C. Rôle des EAO dans la migration et l'invasion des cellules tumorales 35
D. Rôle des EAO dans l'angiogenèse tumorale 36
E. Rôle des défenses antioxydantes dans l'action des EAO sur les voies de signalisation 37

III LA SUPEROXYDE DISMUTASE DEPENDANTE DU MANGANESE (SOD MN OU SOD2) .. 39
1. Structure de la SOD Mn 39
2. Structure et régulation du gène de la SOD Mn 39
A. Structure du gène 39
B. Régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn 40
C. Régulation de l'expression induite de la SOD Mn 41
D. Régulation post-transcriptionnelle de la SOD Mn 42
E. Les voies de transduction responsables de la régulation de l'expression de la SOD Mn 43
3. Rôles biologiques de la SOD Mn dans les cellules 43
4. Rôle de la SOD Mn dans le cancer 44
A. Expression de la SOD Mn dans les cellules tumorales 45
B. Régulation de l'expression de la SOD Mn dans les cellules tumorales 45
C. Rôle de la SOD Mn dans la prolifération des cellules tumorales 47
D. Rôle de la SOD Mn dans l'invasion tumorale 49
E. Rôle de la SOD Mn dans l'angiogenèse tumorale 50
F. Rôle de la SOD Mn dans la résistance aux traitements anticancéreux 50
5. La SOD Mn dans le cancer du sein 52
A. Expression de la SOD Mn dans les cancers du sein 52
B. Régulation de l'expression du gène *SOD2* dans les cellules cancéreuses mammaires 53
C. La SOD Mn et la résistance aux traitements anticancéreux dans les cellules tumorales mammaires 54

IV LA PROTEINE DAMAGED DNA-BINDING 2 (DDB2) 55
1. Structure du gène et de la protéine DDB2 55
2. Importance biologique du complexe DDBP 56
3. Rôles biologiques de la DDB2 57
A. Réparation de l'ADN endommagé par les UV 57
B. Remodelage de la chromatine 59
C. Régulation du cycle cellulaire 59
D. Activité suppresseur de tumeur 60
E. Activité oncogénique 61

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE 62

MATERIELS & METHODES 65

I CULTURE CELLULAIRE 65
1. Conditions de culture 65
2. Traitements des cellules tumorales mammaires 65
A. Traitement par un inhibiteur des méthylases, la 5-azacytidine 66
B. Traitement par l'acide okadaique, un inhibiteur de la protéine phosphatase 2A (PP2A) 66
C. Traitement par les antioxydants 66
D. Traitement par les inducteurs du gène de la SOD Mn 66

3. Développement des modèles cellulaires transgéniques 67
A. Construction du vecteur plasmidique contenant l'ADN complémentaire inversé de la SOD Mn 67
A.1. Synthèse de l'ADNc par transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) 67
A.2. Clonage de l'ADNc dans le vecteur plasmidique pcDNA3,1(-) 68
B. Transfection stable des cellules 69
4. Etude in vitro de la croissance cellulaire et de la capacité à former des colonies 70
5. Etude in vitro de la migration cellulaire en chambre de Boyden 71
6. Test de cytotoxicité au MTT 71
7. Transfection transitoire des cellules par la technique de l'interférence à l'ARN 72

II ANALYSE DE L'ACTIVITE DE PROTEINES NUCLEAIRES SUR L'ADN 74
1. Etude de l'activité de fixation des protéines nucléaires sur l'ADN par retard sur gel 74
A. Extraction et dosage des protéines nucléaires 74
B. Marquage des sondes oligonucléotidiques 74
C. Interaction des protéines sur l'ADN et analyse du complexe 76
2. Etude de l'activité de fixation des protéines nucléaires sur l'ADN par immunoprécipitation sur chromatine (« ChIP ») 77
A. Extraction de la chromatine 77
B. Immunoprécipitation des protéines d'intérêt 78
C. Analyse par PCR 78
3. Etude de l'activité transcriptionnelle des protéines nucléaires sur l'ADN 79
A. Construction des plasmides contenant les différentes parties du promoteur du gène de la SOD Mn 79
B. Mutagenèse dirigée de la région nucléotidique O_4 80
C. Transfection transitoire et activité luciférase 80

III ETUDE DE L'EXPRESSION DE GENES AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL (RT-PCR) 81
1. Extraction des ARN totaux 81
2. Transcription inverse (RT) 81
3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) 82

IV ETUDE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES PAR IMMUNOREPLIQUE (WESTERN BLOTTING) 83
1. Extraction et dosage des protéines totales 83
2. Electrophorèse et transfert des protéines sur membrane 83
3. Détection immunologique 84

V ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES PROTEINES 86
1. Analyse de l'activité des enzymes antioxydantes 86
A. Activité des SOD sur gel 86
B. Dosage enzymatique de la catalase et de la Glutathion Peroxydase (GPX) 86
2. Analyse de l'activité gélatinase sur gel 87

VI DOSAGE DU GLUTATHION ET DU PEROXYDE D'HYDROGENE 88
1. Mesure de la quantité intracellulaire de glutathion (GSH) total et réduit 88
2. Dosage du taux d'H_2O_2 intracellulaire 88

RESULTATS 91

I ETUDE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE *SOD2* DANS LES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES HUMAINES ŒSTROGENES-DEPENDANTES 91
1. Identification de la protéine DDB2 comme un nouveau régulateur transcriptionnel de l'expression constitutive du gène SOD2 91
   A. Résultats préliminaires obtenus antérieurement 91
   B. Caractérisation de la séquence d'ADN fixant la protéine DDB2 dans la région proximale du promoteur du gène de la SOD Mn 92
   C. Rôle de la protéine DDB2 dans la régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn 93
   D. Signification biologique de la régulation de l'expression constitutive du gène *SOD2* par la DDB2 94
2. Données complémentaires : rôle de la protéine DDB2 dans la régulation de l'expression induite de la SOD Mn 114
3. Conclusions 114

II IMPLICATION DE LA SOD MN DANS LA CROISSANCE ET LES PROPRIETES INVASIVES DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES HUMAINES OESTROGENES-INDEPENDANTES 115
1. Introduction 115
2. Résultats obtenus 115
3. Conclusions 116
4. Données complémentaires : Etude de la régulation de l'expression constitutive du gène SOD2 dans les cellules tumorales mammaires humaines oestrogènes-indépendantes 118

DISCUSSION GENERALE 122

I ETUDE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION CONSTITUTIVE DE LA SOD MN DANS LES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES 122
1. Mise en évidence d'un nouveau régulateur transcriptionnel du gène SOD2: la protéine DDB2 122
   A. Structure de la séquence de fixation de la DDB2 123
   B. Conséquence de la fixation de la DDB2 sur l'expression du gène SOD2 123
   C. Relation structure et fonction de la DDB2 comme régulateur de la transcription 124
2. Importance de la DDB2 parmi les autres mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de la SOD Mn 125
3. Régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn en absence de DDB2 127

II LE ROLE DE LA SOD MN DANS LA CROISSANCE TUMORALE MAMMAIRE 128
1. Implication de la SOD Mn dans la prolifération des cellules tumorales mammaires 128
2. Implication de la SOD Mn dans la migration des cellules tumorales mammaires 130

III RELATION ENTRE LA DDB2, L'EXPRESSION DE LA SOD MN ET LA CROISSANCE TUMORALE MAMMAIRE 133

CONCLUSIONS **137**

PERSPECTIVES **139**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **142**

ABREVIATIONS

* * *

A

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AIP	1-amino-3-iminopropène
ARE	Antioxydant Response Element
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
AP-1	Activator protein-1
AP-2	Activating protein-2
ASK-1	Apoptosis signal-regulating kinase-1
ATF-1	Activating transcription factor-1
ATM	Ataxia-Telengiectasia-Mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia-Telengiectasia and Rad3-related protein

B

Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCNU	1,3 Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea
BER	Excision de bases
BET	Bromure d'éthidium
BRCA	BReast CAncer
BRAP2	BRCA1-associated protein 2
BSA	Albumine sérique bovine

C

Ca^{2+}	Calcium
$CaCl_2$	Chlorure de calcium
CAT	Catalase
CBP/p300	CREB binding protein/p300
CCND1	Cycline D1
cdc25C	Cell division cycle 25 homolog C
CDK	Cyclin-dependent kinase
Cdt	Cytolethal distending toxins
C/EBP	CAAT/enhancer binding protein
CHEK2	Check point homolog 2
ChIP	Immunoprécipitation sur chromatine
CREB	c-AMP response element binding
CSA	Cocaïne Syndrome A
Cu^{2+}	Cuivre
Cul-4A	Culline-4A
CYP 17 et 19	Cytochrome P450 17 et 19

D

- dATP — Désoxyadénosine triphosphate
- DCAF — DDB1 and Cul-4A-associated factors
- DCF — Dichlorofluorescéine
- DCFH-DA — 2',7'-dichlorofluorescin-diacétate
- dCTP — Désoxycytidine triphosphate
- DDB1 — Damaged DNA-binding 1
- DDB2 — Damaged DNA-binding 2
- DDBP — Damaged DNA-binding protein
- dGTP — Désoxyguanidine triphosphate
- DHFR — Dihydrofolate réductase
- DMSO — Diméthylsulfoxide
- dNTP — Déoxynucléotides triphosphates
- DO — Densité optique
- D-PBS — Tampon phosphate salin
- DTT — Dithiothréithiol
- dTTP — Désoxythimidine triphosphate

E

- E_2 — oestradiol
- EAO — Espèces Actives de l'Oxygène
- EDTA — Ethylène Diamine Tétracétique
- EGF — Epidermal growth factor
- EGFR — Epidermal growth factor Receptor
- ER — Récepteur aux œstrogènes
- Egr-1 — Early growth factor-1
- ERE — Estrogen Response Element
- ERK — Extracellular-regulated kinases
- Ets-1 — E twenty-six-1

F

- $FADH_2$ — Flavine adénine dinucléotide réduite
- Fe^{2+} — Fer ferreux
- Fe^{3+} — Fer ferrique
- FGF — Fibroblast growth factor
- FOXO3a — Forkhead transcription factor 3a

G

- GG-NER — Global genome repair
- GSH — Glutathion réduit
- GSSG — Glutathion oxydé
- GST — Glutathion S-transferases
- GSTM1 — Glutathion S-transferase M1
- GSTP1 — Glutathion S-transferase Pi
- cGPX — Glutathion peroxydase cytosolique
- GPX — Glutathion peroxydase
- GPX1 — Glutathion peroxydase mitochondriale

H

- H_2O — Eau
- H_2O_2 — Peroxyde d'hydrogène
- HB-EGF — Heparin-binding Epidermal growth factor
- HCl — Acide chlorhydrique

- HER — Human Epidermal growth factor Receptor
- HER2/neu — Human Epidermal growth factor Receptor 2/
- 4-HNE — 4-hydroxy-2-trans nonénal
- HIF — Hypoxia Inducible factor
- HOCl — Acide hypochloreux
- HPLC — Chromatographie liquide haute performance
- Hsp 90 — Heat shock protein 90

I , J

- IAP-1 — Inhibiting apoptosis protein-1
- ICAM-1 — Inter-cellular adhesion molecule-1
- IGF-1 — Insulin like growth factor-1
- IGF-1R — Insulin like growth factor-1 Receptor
- IκBα — Inhibitory Kappa Bα
- IL-1 — Interleukine-1
- IRE — Iron Response Element
- IRS-1 — Insulin receptor substrate-1
- JNK — c-Jun N-terminal kinase

K , L

- KCl — Chlorure de potassium
- kDa — Kilo Dalton
- Keap 1 — Kelch-like ECH-associated protein 1
- LB — Lysogeny broth
- Luc — Luciférase

M

- MAPK — Mitogen-activated protein kinase
- MDA — Malondialdéhyde
- MDM2 — Murine double minute-2
- MDR1 — MultiDrug Resistance 1
- $MgCl_2$ — Chlorure de magnésium
- MKK — MAP kinase kinase
- MMP — Métalloprotéase matricielle
- Mn — Manganèse
- MnSOD-BP — Superoxyde Dismutase à Manganèse binding protein
- MnTMPyP — Mn(III) tetrakis (1-méthyl-4-pyridyl) porphyrin pentachloride
- MST-RE — Manganese superoxide TPA Response Element
- MT — Métallothionéine
- MTT — bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol)-2,5-diphényltétrazolium

N

- NAC — N-acétyl-L-cystéine
- NaCl — Chlorure de sodium
- NaOH — Hydroxyde de sodium
- NADP — Nicotinamide adénine dinucléotide Phosphate oxydée
- NADPH — Nicotinamide adénine dinucléotide Phosphate réduite
- NAT2 — N-acétyltransférase 2
- NER — Excision de nucléotides
- NF-1 — Neurofibromatosis-1
- NF-κB — Nuclear Factor-kappa B
- NO — Monoxyde d'azote
- NPM — Nucléophosmine

- NRG — Neuréguline
- Nrf — NF-E2 related factor

O

- $^1O_2$ — Oxygène singulet
- $O_2°$- — Anion superoxyde
- OH° — Radical hydroxyle
- OKA — Acide okadaique
- 8-OHdG — 8-hydroxy-déoxyguanine
- ONOO- — Peroxynitrites

P

- PARP — Poly-ADP-ribose polymérase
- pb — Paire de bases
- PCNA — Proliferationg Cell Antigen
- PCR — Réaction de polymérisation en chaîne
- PDGF — Platelet-derivated growth factor
- PE — Plating Efficiency
- pGp — Glycoprotéine P
- PIC — Cocktail d'inhibiteurs de protéases
- PI3K — Phosphatidyl Inositol 3-kinase
- PIP2 — Phosphoinositol-4,5-bisphosphate
- PIP3 — Phosphoinositol-1,4,5-triphosphate
- PKC — Protéine kinase C
- PMA — Phorbol 12-Myristate 13 Acetate
- PMSF — Phénylméthylsulfonylfluoride
- PP2A — Protéine Phosphatase 2A
- PR — Récepteur à la progestérone
- PRX — Peroxyrédoxine
- PTEN — Phosphatase and TENsin homolog
- PTP — Protéine tyrosine phosphatase
- PVDF — Polyvinyldifluoride

R

- Ref-1 — Redox factor-1
- RPA — facteur de réplication A
- ROO° — Radical peroxyle
- ROOH — Hydroperoxyde
- RO° — Radical alkoxyle
- RT-PCR — Transcription inverse
- RTK — Récepteur Tyrosine Kinase

S

- SAPK — Stress-activated protein kinase
- SDS — Sodiumdodécylsulfate
- SEAP — Phosphatase alcaline placentaire
- siRNA — Small interfering RNA
- SOD Cu/Zn ou SOD1 — Superoxyde dismutase à cuivre et zinc intracellulaire
- SOD Mn ou SOD2 — Superoxyde dismutase à manganèse mitochondriale
- SOD EC ou SOD3 — Superoxyde dismutase à cuivre et zinc extracellulaire
- Sp1 — Specificity protein 1
- STAGA — SPT3/TAF9/GNC5/acetyltransférase
- SVF — Sérum de veau fœtal

T

- TBE — Tris Borate EDTA
- TBS — Tris Borate Sodium
- TC-NER — Transcription-coupled repair
- TGFα — Transforming growth factor α
- TNFα — Tumor Necrosis factor α
- TNF-RE — Tumor Necrosis factor α Response Element
- TP53 — Tumor Protein 53
- Trx — Thiorédoxine
- TrxR — Thiorédoxine Réductase

U , V , X

- URL — Unité Relative de Lumière
- UV — Ultraviolets
- VCAM-1 — Vascular cell adhesion molecule-1
- VEGF — Vascular endothelial growth factor
- VEGFR — Vascular endothelial growth factor Receptor
- XP — Xeroderma Pigmentosum

INTRODUCTION

* * *

A l'heure actuelle, le cancer du sein constitue une préoccupation majeure de santé publique en raison de son incidence. Cette pathologie cancéreuse reste la plus fréquente dans le monde, avec plus d'un million de nouveaux cas par an et environ 373 000 décès enregistrés par an, même si beaucoup de progrès dans le traitement et la prise en charge, ainsi que dans le diagnostic de ce cancer ont été réalisés. Cependant, les mécanismes moléculaires de la carcinogenèse mammaire ne sont pas entièrement élucidés et compris, en particulier ceux conduisant vers le pouvoir métastatique et vers l'échappement aux thérapies anticancéreuses actuelles de certaines cellules tumorales mammaires. Dans le laboratoire d'accueil du professeur Philippe Becuwe, une des thématiques de recherche consiste à identifier de nouveaux marqueurs moléculaires, qui jouent un rôle dans le développement des tumeurs mammaires. Certains de ces marqueurs, sur lesquels on note un intérêt grandissant, sont les défenses antioxydantes, car les espèces actives de l'oxygène (EAO) qu'elles éliminent, sont de plus en plus décrites dans la littérature comme étant impliquées dans les mécanismes moléculaires conduisant à la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses et au développement des tumeurs.

Depuis plusieurs années, le laboratoire s'intéresse en particulier à une de ces enzymes antioxydantes, la superoxyde dismutase mitochondriale (SOD Mn), dont la participation dans le développement des tumeurs est mal comprise et dépend en particulier de la régulation de l'expression constitutive de son gène. Actuellement, les études réalisées au laboratoire portent sur le rôle de cette enzyme antioxydante ainsi que sur la recherche et l'identification de facteurs protéiques régulant l'expression de son gène dans la croissance tumorale mammaire. Dans ce sens, la purification récente d'une protéine, identifiée comme étant la DNA-Damaged Binding 2 (DDB2) et interagissant avec une région du promoteur proximal du gène codant cette enzyme antioxydante a été mise en évidence dans notre laboratoire. Ces résultats constituent la base de travail sur laquelle s'appuie la thèse rapportée dans ce manuscrit, qui révèle l'existence d'un mécanisme moléculaire expliquant la relation entre l'expression constitutive et le rôle biologique de la SOD Mn dans la croissance tumorale mammaire.

CHAPITRE 1

* * *

ANALYSE

BIBLIOGRAPHIQUE

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

* * *

I LE CANCER DU SEIN

1. Epidémiologie

Le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer chez les femmes, mais il est aussi le plus fréquent parmi l'ensemble des cancers tout sexe confondu. Statistiquement, on estime qu'une femme sur dix vivant jusqu'à 80 ans développera un cancer du sein au cours de son existence. Le cancer du sein a une incidence de près de 34000 nouveaux cas par an estimés en 2001 en France, soit 32 % des cancers féminins, et d'environ 10800 décès par an, soit 19 % des décès féminins par cancer. En 2005, ce sont près de 50000 cancers du sein qui ont été diagnostiqués, pour une mortalité d'environ 11200 patientes. Selon la Ligue Nationale contre le cancer, en 2006, le taux de survie à cinq ans après diagnostic en France, pour des patientes suivies entre 1989 et 1997, était de 85%. En Europe, la France occupe une place médiane tant pour le nombre de nouveaux cas que pour la mortalité, entre les pays de l'Europe du nord, à risque élevé, et ceux du sud, à risque plus faible.

Durant les deux dernières décennies, le nombre de nouveaux cas de cancers du sein a augmenté régulièrement (+ 60%). L'accroissement de la mortalité a été plus modéré (+ 8%). Ces augmentations sont en partie expliquées par plusieurs facteurs dont le vieillissement de la population, car la fréquence du cancer augmente avec l'âge, ou encore une généralisation du dépistage qui permet de diagnostiquer plus de cancers et plus tôt. [sources : réseau FRANCIM, IVS, CIRC, rapport de la commission d'orientation sur le cancer janvier 2000, ministère de la santé juillet 2001].

2. Facteurs de risques liés au cancer du sein

A. Le sexe féminin

Quatre vingt dix neuf pour cent des cancers du sein apparaissent chez la femme et seul 1% des hommes sont concernés.

B. L'âge de la femme à la première grossesse

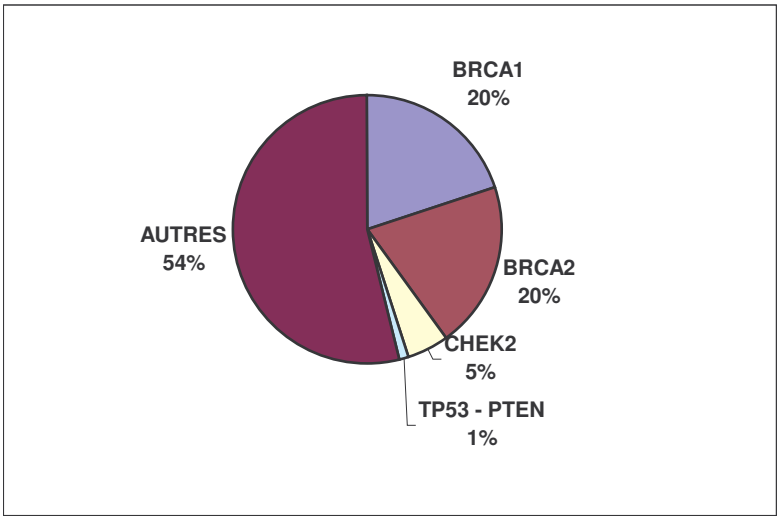
Les femmes n'ayant pas d'enfant ou âgées de plus de 30 ans au moment de leur première maternité, sont exposées à un risque de cancer du sein légèrement plus élevé que les femmes enfantant pour la première fois avant l'âge de 25 ans [MacMahon *et al*. 1970]. Ce sont en effet les cycles précédant la première grossesse menée à terme qui semblent les plus dangereux pour le sein. La grossesse protège le sein par la modification des cellules mammaires dans le sens d'une plus grande différenciation. Les cellules différenciées sont moins sensibles aux carcinogènes en particulier hormonaux.

C. Un âge avancé

La fréquence du cancer du sein augmente avec l'âge de la femme. On estime que ce cancer est rare avant l'âge de 30 ans ; par contre il est extrêmement fréquent entre 60 et 64 ans, et reste fréquent jusqu'à 74 ans [Sant *et al*. 2004].

D. La durée de vie génitale

L''apparition du cycle menstruel à un jeune âge (avant 12 ans) et son interruption à un âge plus avancé (ménopause) sont liés à un risque légèrement élevé de cancer du sein [Kvale et Heuch 1988 ; Brinton *et al*. 1988].



<u>Figure 1</u> : Les facteurs génétiques dans les cas familiaux de cancer du sein.

Parmi les cancers du sein d'origine génétique, 40% sont dus à une mutation des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*. Les mutations du gène *CHEK2* représentent à elles seules environ 5% des cancers du sein. Les syndromes héréditaires provoqués par *PTEN* et *TP53* sont extrêmement rares. Les autres cas concernent un nombre indéfini de mutations dans des gènes de susceptibilité et une exposition à divers facteurs environnementaux et/ou hormonaux [Modifiée d'après Wooster et Weber 2003].

E. Les prédispositions génétiques

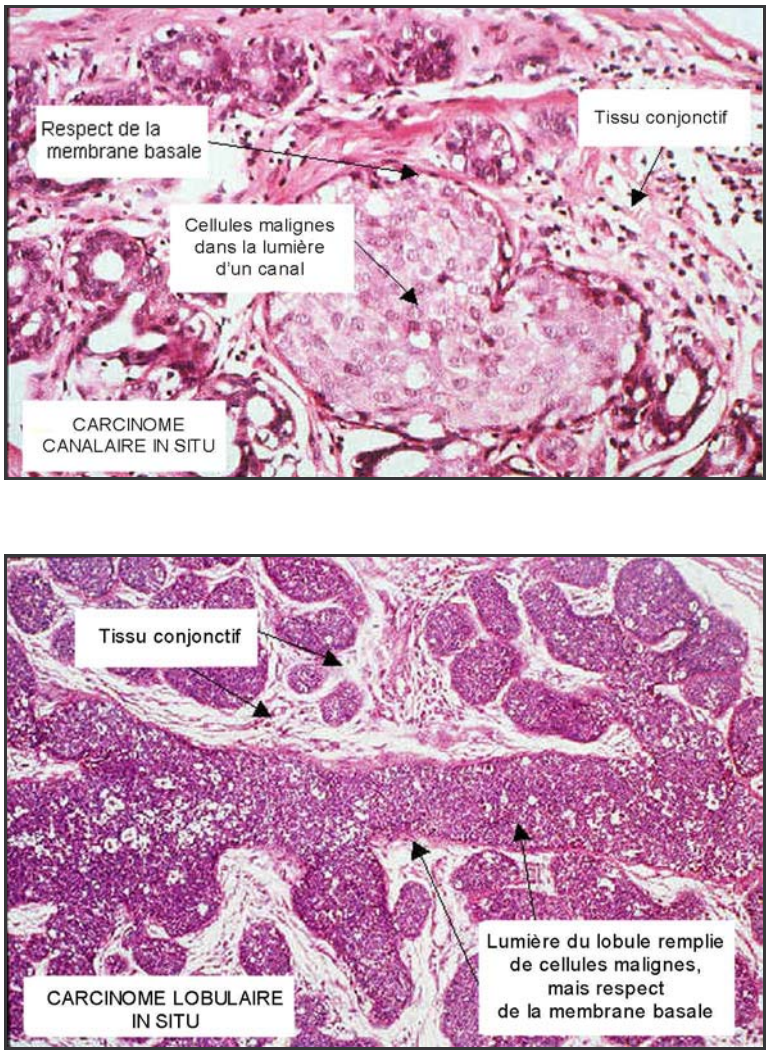
Cinq à dix pour cent des cancers du sein diagnostiqués présentent des prédispositions génétiques [Wooster et Weber 2003], c'est-à-dire avec des antécédents familiaux de cancer du sein avant l'âge de 50 ans chez au moins deux parentes du premier degré. Deux gènes suppresseurs de tumeurs sont principalement mis en cause, *BRCA1* et *BRCA2* (*BReast CAncer 1 et 2*). Plus de 600 mutations ou variations de séquences ont été décrites dans ces gènes, mais seule une partie de celles-ci accroissent le facteur de risque de cancer. Ainsi, la probabilité de développer un cancer du sein est d'environ 65% chez une porteuse d'une mutation de *BRCA1* et de 45% pour les porteuses d'une mutation sur le gène *BRCA2,* avant l'âge de 70 ans [Antoniou *et al*. 2003].

Parallèlement à ces prédispositions génétiques majeures, il en existe des mineures, qui confèrent un risque plus faible de développer un cancer. Moins de 5% des cas familiaux de cancer du sein concernent des mutations d'un gène impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (*CHEK2* ou *checkpoint homolog 2*) [Meijers-Heijboer *et al*. 2002]. Il existe aussi des mutations de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (*ATM* ou *Ataxia-telangiectasia-mutated, TP53* ou *tumor protein 53*), dans le métabolisme des hormones stéroïdes (*CYP17, CYP19* ou *cytochrome P450 17 et 19*), ou encore dans le système de détoxification des carcinogènes (*GSTM1* ou *glutathion S-transférase M1, GSTP1* ou *glutathion S-transférase pi, NAT2* ou *N-acétyltransférase 2*) [Dunning *et al*. 1999]. Les personnes porteuses de ce type de mutations ont un risque doublé de développer un cancer du sein.

Il existe aussi des syndromes héréditaires qui comportent un excès de risque de cancers du sein mais sont exceptionnels : ce sont des formes familiales de maladies dont des mutations touchent dans 1% des cas le gène *TP53* (syndrome de Li-Fraumeni) ou dans 0,1% des cas le gène *PTEN* ou *Phosphatase and TENsin homolog* (maladie de Cowden) [Srivastava *et al*. 1990 ; Liaw *et al*. 1997a] (**Figure 1**).

F. Les modifications du mode de vie des femmes

Le tabagisme, les rayons ionisants, le stress, les traitements hormonaux, l'obésité ou encore une consommation d'alcool régulière, sont des facteurs qui participeraient au développement d'un cancer du sein. Nous reviendrons plus loin sur le lien entre le facteur tel



<u>Figure 2</u> : Images microscopiques représentant des carcinomes mammaires *in situ*.
(grossissement x 250).

[Modifiée d'après le livre <u>Breast Imaging</u> de Kopans DB. Editions *Lippincott-Raven* 1998. second edition: 18-27]

que les hormones oestrogéniques données lors de traitements contraceptifs et la croissance des cellules tumorales mammaires.

3. Anatomopathologie du cancer du sein

Les tumeurs bénignes sont bien limitées et leur croissance est purement locale. Les tumeurs malignes (cancer) tendent à infiltrer et détruire les tissus adjacents. La dissémination des cellules néoplasiques malignes à distance du foyer initial (tumeur primitive), est une deuxième caractéristique des tumeurs malignes. La dissémination de ces cellules s'effectue *via* les vaisseaux lymphatiques et/ou sanguins. Ces cellules à distance du foyer initial forment des foyers distincts qui croissent en tumeurs secondaires encore appelées métastases. En principe, le développement d'une tumeur bénigne est souvent inoffensif, alors que les tumeurs malignes peuvent entraîner le décès du patient en infiltrant et en détruisant certains organes vitaux.

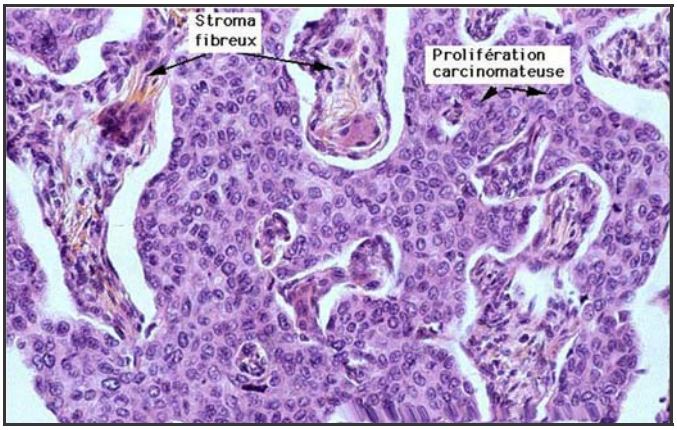
A. Les cancers du sein *in-situ*

Des tumeurs non infiltrantes peuvent présenter des cellules d'allures agressives et malignes avec un pléiomorphisme cellulaire et une augmentation de l'activité mitotique. On appelle cancer *in-situ*, une tumeur mammaire constituée de cellules d'allures malignes mais avec absence d'envahissement des tissus voisins et un respect de la lame basale. Lorsque les cellules cytologiquement malignes sont confinées aux canaux galactophores, on parle d'épithélioma canalaire *in situ* encore appelé adénocarcinome intra-canalaire. Lorsque les cellules malignes sont confinées aux lobules on parle d'épithélioma lobulaire *in situ* ou d'adénocarcinome intra-lobulaire (**Figure 2**).

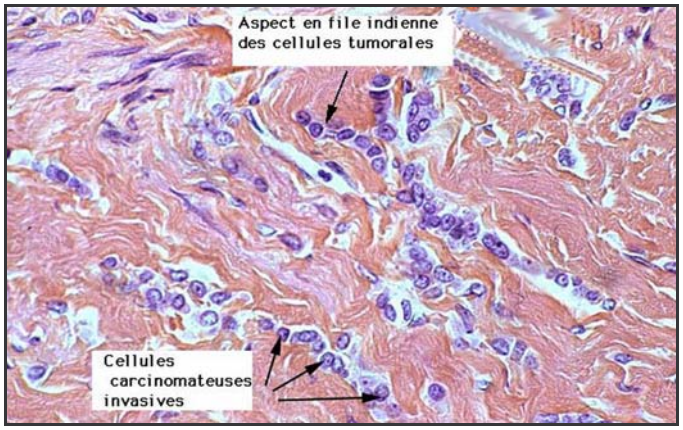
Le diagnostic des cancers *in situ* est important car ces tumeurs peuvent devenir infiltrantes, et le traitement à un stade pré-invasif permet généralement une guérison définitive.

B. Les carcinomes infiltrants

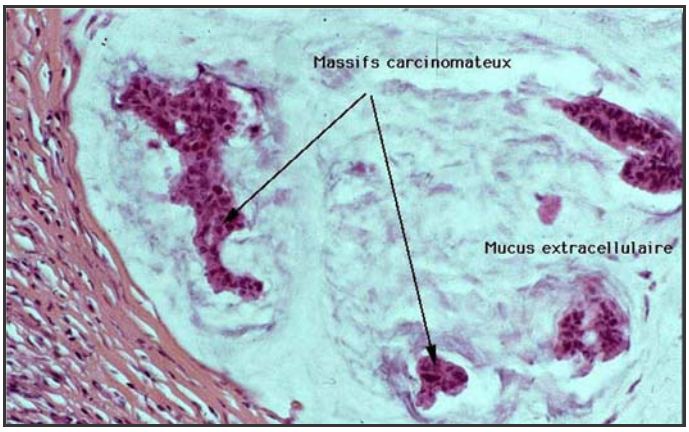
Le carcinome canalaire infiltrant de forme commune représente 80% des carcinomes infiltrants. L'aspect histologique de ces tumeurs est très varié : les cellules carcinomateuses se disposent en lobules, en travées ou forment des tubes. Le stroma, d'abondance variable, est



Carcinome canalaire infiltrant (grossissement x 250)



Carcinome lobulaire infiltrant (grossissement x 400)



Carcinome mucineux (grossissement x 250)

<u>Figure 3</u> : Images microscopiques représentant les carcinomes mammaires humains infiltrants les plus courants parmi les cancers du sein.

[Modifiée d'après le livre <u>Pathology and genetics of tumors of the breast and female genitale organs</u> de Peter Devilee. Editions *Fattaneh A. Tavassoli* 2003]

fibreux, plus ou moins hyalinisé, et peut être le siège de remaniements (infiltrat inflammatoire, microcalcifications…) (**Figure 3**).

Le carcinome lobulaire infiltrant représente 4% des carcinomes infiltrants. Ces tumeurs sont généralement mal limitées, difficilement mesurables et reconnues uniquement à la palpation. La forme typique est constituée de cellules rondes isolées, ayant un cytoplasme peu abondant et creusé d'une vacuole rejetant le noyau en périphérie. Certaines formes sont moins typiques, réalisant des cordons, des alvéoles ou même des tubes. Ces carcinomes lobulaires atypiques auraient un pronostic plus défavorable que la forme typique (**Figure 3**).

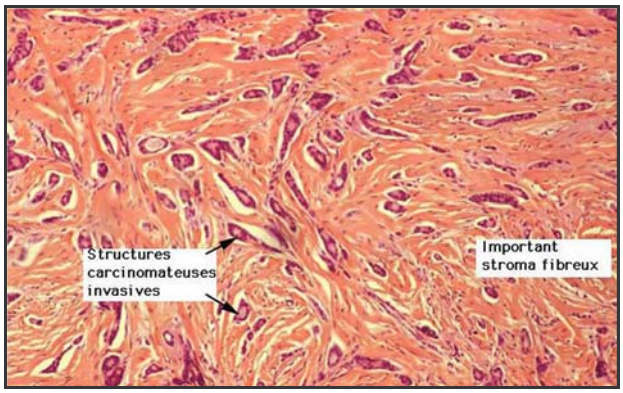
Les carcinomes mucineux ou colloïde muqueux surviennent plutôt chez la femme âgée et représentent 1% des carcinomes mammaires infiltrants. Cette tumeur bien délimitée est d'aspect translucide. Peu de figures mitotiques sont observées, et les cellules sont disposées en lobules ou réalisent des tubes au sein de plages de mucus (**Figure 3**).

C. Les autres tumeurs malignes du sein

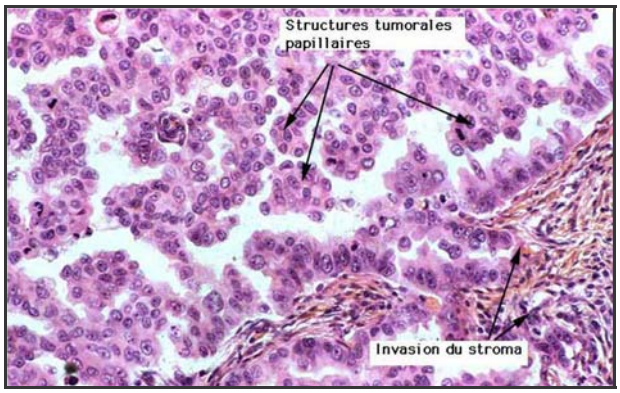
Plus les tumeurs sont indifférenciées, plus elles sont agressives. A l'inverse, plus une tumeur est différenciée, plus son évolution est favorable. C'est le cas du carcinome tubuleux qui représente 3 à 5% de tous les cancers invasifs du sein. Macroscopiquement, cette tumeur est de petite taille (inférieure à 1 cm de diamètre). Il en est de même de certaines formes histologiques particulières et rares telles que les carcinomes papillaires, métaplasiques et médullaires (**Figure 4**).

D. Les métastases

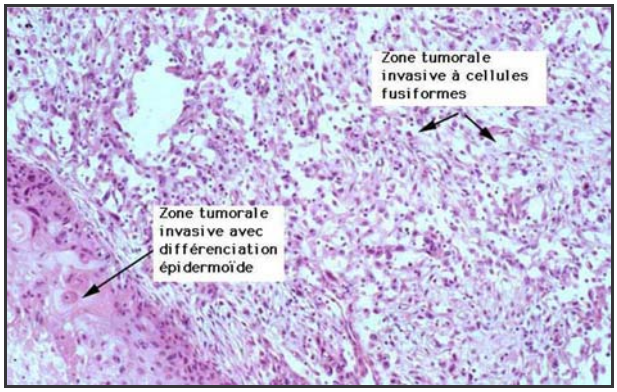
Les métastases mammaires sont rares, survenant généralement à un stade tardif de l'évolution de la maladie. Les plus souvent rencontrées sont le mélanome, ainsi que les tumeurs pulmonaires et osseuses, du tractus digestif et de l'appareil uro-génital. Les métastases se présentent souvent comme un nodule bien délimité simulant une tumeur bénigne.



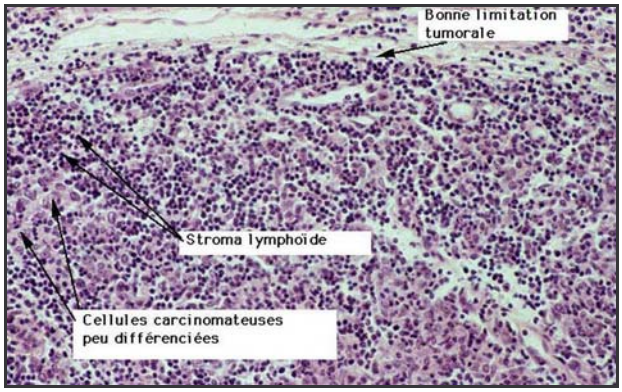
Carcinome tubuleux (grossissement x 100)



Carcinome papillaire (grossissement x 250)



Carcinome métaplasique (grossissement x 100)



Carcinome médullaire (grossissement x 250)

<u>Figure 4</u> : Images microscopiques représentant les tumeurs malignes rares rencontrées chez des patientes atteintes d'un cancer du sein.

[Modifiée d'après le livre <u>Pathology and genetics of tumors of the breast and female genitale organs</u> de Peter Devilee. Editions *Fattaneh A. Tavassoli* 2003]

4. Les altérations génétiques somatiques

La relation entre la survenue d'un cancer et l'existence d'altérations génétiques est maintenant bien établie. En dehors des prédispositions génétiques, qui sont souvent héréditaires, d'autres altérations génétiques peuvent apparaître au cours de la transformation maligne, telles que des délétions chromosomiques, translocations, amplifications et réarrangements géniques, duplications ou pertes de chromosomes entiers et mutations ponctuelles. Très schématiquement, ces altérations ont pour effet :

- d'activer des oncogènes ou proto-oncogènes : plus de 15% des tumeurs mammaires diagnostiquées présentent une amplification et une surexpression de proto-oncogènes, comme c-*erbB2* (cf paragraphe I.5.D), *CCND1* qui code pour la cycline D1 [Wang *et al*. 1994], et *c-myc* qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la croissance, la différenciation, et l'apoptose cellulaires [Nass et Dickson 1997]. D'autres gènes peuvent être amplifiés à un moindre taux (10% et moins) dans des tumeurs mammaires. C'est le cas des gènes codant pour 2 récepteurs membranaires de la famille FGF (Fibroblast growth factor) et du gène *IGFR1* codant pour le récepteur de l'IGF-1 (Insulin like growth factor 1).

- d'activer des gènes dont le produit présente une activité oncogénique constitutive: dans 25% des cancers du sein, seule la mutation de l'oncogène *PIK3CA* codant ainsi pour une Phosphatidyl Inositol 3-Kinase active constitutivement, est retrouvée, qui stimule la croissance cellulaire et les processus d'angiogenèse et d'invasion [Bachman *et al*. 2004]. Les mutations d'oncogènes de la famille *ras* sont rarement observées dans le cancer du sein.

- d'inactiver ou activer des gènes, dont les produits interviennent dans la stabilité du génome : gènes régulant les mécanismes de la mitose ou les enzymes de réparation de l'ADN, ce qui favorise la survenue d'altérations d'autres gènes de type oncogènes ou suppresseurs de tumeurs. C'est le cas de la mutation du gène *TP53* retrouvée dans 25-30% des cas sporadiques de cancers du sein [Macleod 2000 ; Kerangueven *et al*. 1997].

- de provoquer des modifications de l'expression des gènes cités précédemment, qui résultent de l'altération de gènes agissant notamment sur le « modelage » de la chromatine ou sur le degré de méthylation de l'ADN (altérations épigénétiques). C'est le cas par exemple du

gène suppresseur de tumeur *PTEN*, inactivé par une hyperméthylation de ses séquences promotrices dans 40% des cancers du sein sporadiques [Tycko 2000 ; Khan *et al*. 2004].

De nombreux travaux suggèrent également l'importance des altérations épigénétiques pour inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs dans les tumeurs du sein. C'est le cas par exemple du gène codant la Maspin, et le gène *BRCA1* dans 15 à 30% des tumeurs du sein sporadiques [Birgisdottir *et al*. 2006 ; Khalkhali-Ellis 2006].

5. Les principaux marqueurs biologiques du cancer du sein

Parmi les marqueurs biologiques, la connaissance des facteurs pronostiques est fondamentale pour la prise en charge des cancers du sein non métastatiques de façon à prédire le risque de rechute et/ou de métastases indépendamment du traitement anticancéreux. Mis à part le statut ganglionnaire, la taille tumorale, le grade histologique et l'âge, les facteurs pronostiques actuellement validés sont les récepteurs hormonaux, exprimés ou non, et la surexpression du gène *c-erbB2*.

Parmi les récepteurs hormonaux, le récepteur aux oestrogènes (ER), lorsqu'il est présent dans la tumeur, est le reflet d'une bonne différenciation tumorale et constitue un facteur prédictif de la réponse à l'hormonothérapie [Mauriac *et al*. 1986]. Il en existe deux isoformes, ERα et ERβ. Les récepteurs de la progestérone, qui existent sous deux isoformes, PRA et PRB, constituent également un facteur pronostique du cancer du sein et sont sous le contrôle des oestrogènes, reflétant ainsi la bonne fonctionnalité des récepteurs aux oestrogènes [Giangrande *et al.* 1997]. L'expression des récepteurs aux oestrogènes permet de proposer une stratégie thérapeutique appelée hormonothérapie, qui vise à proposer aux patientes un médicament inhibant soit la biosynthèse endogène d'oestrogènes, correspondant à la catégorie médicamenteuse des anti-aromatases, soit le récepteur aux hormones, comme le tamoxifène.

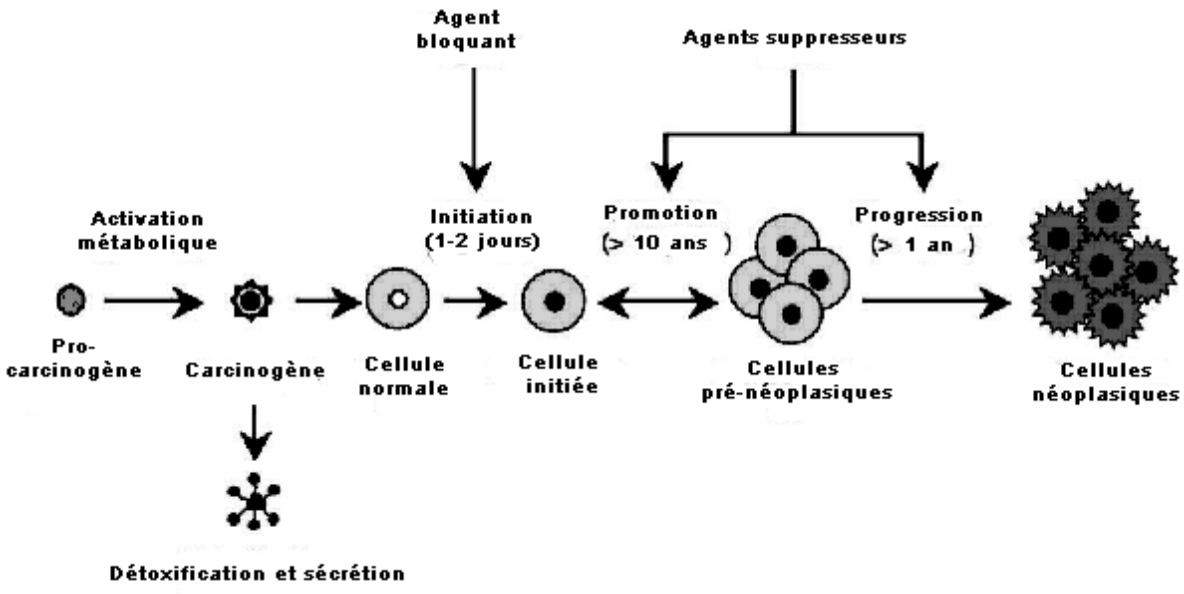
Les études de profil d'expression génique dans les tumeurs mammaires ont permis de mettre en évidence une amplification du gène *HER2/neu*, un des membres de la famille des gènes *HER* (*Human Epidermal growth factor Receptor*). Cette amplification du gène conduit à la surexpression de la protéine erbB2, dès les premiers stades de la carcinogenèse mammaire et significativement dans 20% des cancers du sein invasifs. Elle joue également un rôle important dans la progression des tumeurs mammaires dites « HER2+ » [Slamon *et al*. 1987 ;

Iglehart *et al*. 1990]. La surexpression d'HER2 est donc de mauvais pronostic pour la patiente, notamment parce qu'elle est inversement corrélée avec l'expression de ER et de PR [Cho *et al*. 2008]. L'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre HER2 représente une des stratégies thérapeutiques ciblées, proposées aux patientes dont les tumeurs surexpriment ce récepteur de facteur de croissance.

Parmi les autres marqueurs biologiques du cancer du sein, il apparaît que le récepteur du facteur de croissance IGF-1 ou IGF-1R (Insulin-like Growth factor-1 receptor) est important. En effet, l''insuline et l'IGF-1 peuvent se fixer sur l'IGF-1R, et tous deux stimuler directement le développement des tumeurs mammaires. Ces observations conduisent à l'hypothèse selon laquelle le risque de cancer du sein est augmenté chez les femmes ayant des taux plasmatiques élevés d'insuline, et/ou une augmentation des taux d'IGF-1 [Ellis *et al*. 1998 ; Kaaks 2003].

Le Vascular endothelial growth factor (VEGF) est le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. C'est une protéine dont le rôle dans l'organisme est de déclencher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse). Cinq molécules différentes ont été identifiées, VEGF-A à VEGF-E. Les VEGFs sont particulièrement intéressants car ils jouent un rôle dans la croissance tumorale et le développement des métastases en favorisant la néo-angiogenèse. Ils se lient à divers récepteurs appelés VEGFR1, VEGFR2, etc… qui sont présents à la surface des cellules endothéliales. De nombreuses études ont montré qu'un certain nombre de cellules tumorales mammaires expriment des VEGFR, qui représentent des facteurs pronostiques défavorables [Toi *et al*. 1995 ; Gasparini *et al*. 1997].

Enfin, la protéine Ki-67 constitue le dernier des marqueurs biologiques principaux en cancérologie mammaire. Cette protéine nucléaire de 36 kDa est exprimée dans les cellules en prolifération, au cours des phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire. Sa fonction précise n'est pas connue, mais sa participation au maintien du pouvoir proliferatif ou au contrôle du cycle cellulaire est suggérée [Scholzen et Geres 2000]. De nombreuses études concernant Ki-67 ont été réalisées dans des tumeurs mammaires et qui le révèlent comme un excellent marqueur proliferatif des cellules tumorales mammaires, car la fraction de cellules Ki-67 positives dans une tumeur est souvent corrélée avec le stade clinique de la maladie [Nicolini *et al*. 2006].



<u>Figure 5</u> : Représentation schématique des différentes étapes de la carcinogenèse.

[Modifiée d'après Surh 1999]

6. La cancérogenèse mammaire

La cancérogenèse correspond à un ensemble d'étapes successives, conduisant à la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Elle résulte de l'accumulation d'altérations génétiques, allant de mutations somatiques à des délétions, voire des cassures, des translocations, des duplications ou des pertes (aneuploïdie) chromosomiques, ou encore des amplifications et réarrangements géniques, qui sont difficilement réparés, car les systèmes de réparations (par excision de nucléotides ou NER, de bases ou BER, des cassures simple brin et double brin) sont déficients [Okochi *et al*. 2002 ; Karihtala *et al*. 2006 ; Agnoletto *et al*. 2007]. Ces altérations génétiques aboutissent à une instabilité génomique limitée, à l'origine des modifications de l'expression de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire (activation d'oncogènes et inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, cf. paragraphe I.4.), dans la résistance à l'apoptose et dans la réparation de l'ADN. Dans la cancérogenèse, on dissocie classiquement 2 étapes : l'initiation qui correspond à la première mutation et la progression qui est l'étape de constitution et de développement de la tumeur mammaire (**Figure 5**). Cette 2ème étape est également le résultat d'une exposition soutenue des cellules à des signaux de prolifération et à l'instabilité génomique (surexpression de cycline D1, expression de protéines mutées non fonctionnelles comme PI3K, PTEN, TP53), qui activent de façon continue le cycle cellulaire.

A. Les antécédents familiaux

Dans les formes familiales, la cancérogenèse mammaire dépend en majorité de la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs *BRCA1* et *BRCA2,* ainsi que *TP53,* dont les protéines correspondantes sont impliquées dans la réparation de l'ADN (cf **Figure 1**).

B. Rôle des œstrogènes

Dans d'autres cas, la cancérogenèse mammaire semble dépendre de l'action des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone). Il est établi depuis longtemps que l'exposition aux œstrogènes est associée au cancer du sein. Les facteurs augmentant le taux d'œstrogènes sont donc à risque. Une puberté précoce et une ménopause tardive agissent par augmentation du nombre de cycles menstruels et donc des taux d'œstrogènes d'où un risque

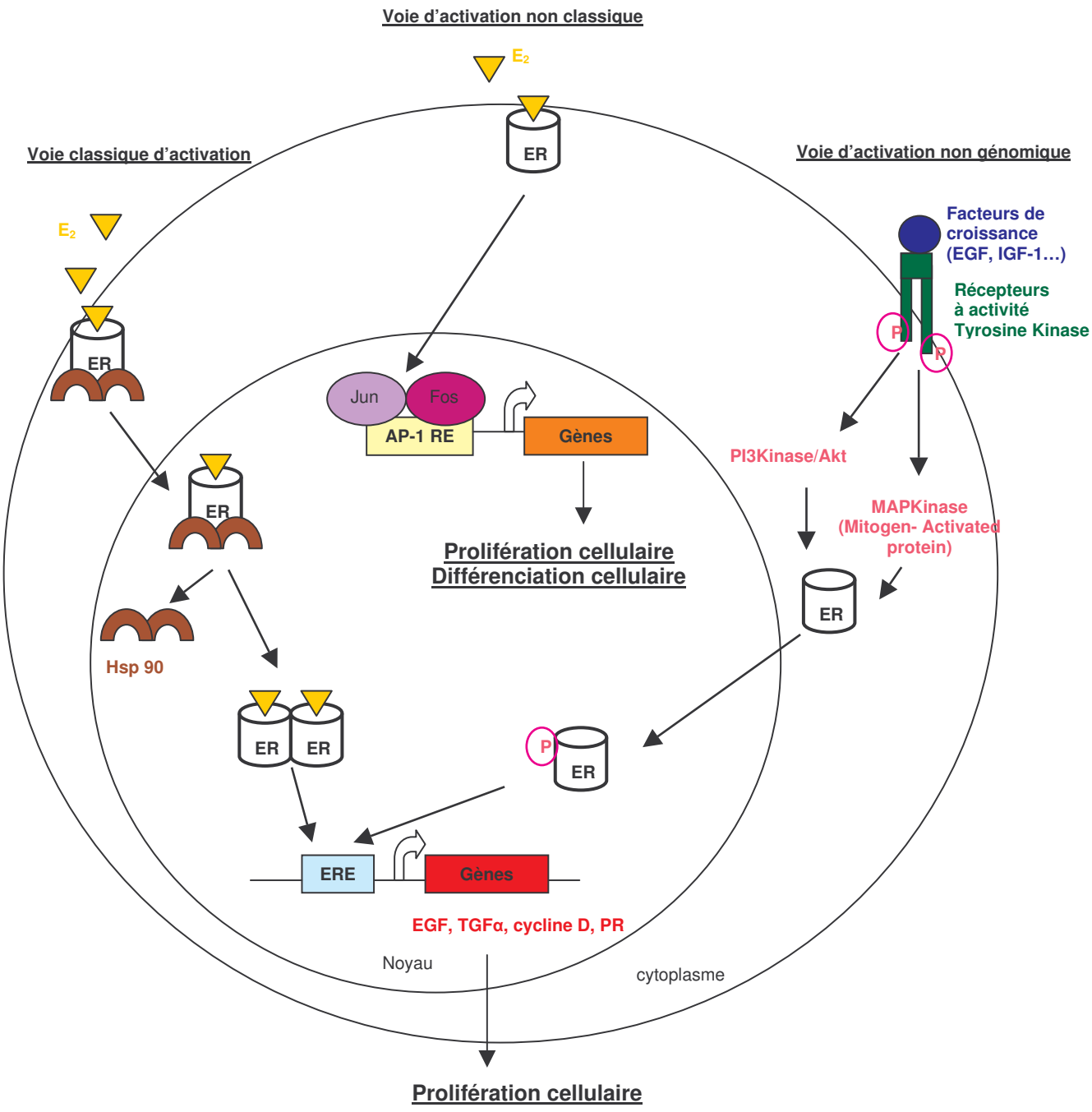


Figure 6 : Voies d'activation de la prolifération cellulaire par le récepteur aux œstrogènes ER, dépendantes ou non de l'œstradiol (E_2).

légèrement élevé de cancer du sein [Clavel-Chapelon 2002]. Le traitement substitutif hormonal de la ménopause augmente aussi sensiblement le risque de survenue d'un cancer du sein [Beral 2003]. Les modifications du mode de vie des femmes ont contribué à augmenter les facteurs de risques dans le développement d'un cancer du sein. Par exemple, l'obésité, de par l'augmentation de la quantité de tissu graisseux, augmente le taux d'œstrogène sanguin *via* l'activation d'une enzyme appelée aromatase. Celle-ci transforme les hormones de type androgène en œstrogène, ce qui explique l'augmentation du risque de cancer du sein chez les femmes ménopausées, en fonction de leur prise de poids [Ahn *et al*. 2007].

Les récepteurs aux œstrogènes existent sous deux formes : ERα et ERβ. Seul ERα serait clairement impliqué dans la prolifération cellulaire induite par les œstrogènes, tandis qu'ERβ exercerait au contraire des effets anti-prolifératifs [Paech *et al*. 1997]. Les tumeurs mammaires ER-positives ont une croissance rapide et sont souvent moins invasives que les tumeurs ER-négatives, ce qui explique que leur pronostic soit de ce fait généralement meilleur [Speirs *et al*. 2004].

Les œstrogènes agissent comme des stimulateurs de la prolifération des cellules tumorales mammaires ER-positives *in vitro*. *In vivo*, cette action est démontrée par le fait que la croissance des tumeurs ER-positives est fortement inhibée par les traitements hormonaux, qui utilisent soit des inhibiteurs compétitifs de la liaison des œstrogènes sur leur récepteur, comme le tamoxifène, ou encore des anti-aromatases, enzyme à l'origine de la synthèse endogène d'œstrogènes [Kijima *et al*. 2005 ; Cepa *et al*. 2008]. Il existe trois voies distinctes d'activation des récepteurs aux œstrogènes : la voie classique, la voie non classique et la voie d'activation non génomique [Nicolini *et al*. 2006] (**Figure 6**).

La voie classique d'activation des ER passe par la fixation de l'œstradiol (E_2) sur l'ER, ce qui entraîne un changement de conformation du récepteur, le libérant ainsi des protéines chaperonnes (Hsp90). Cette dissociation des protéines Hsp90 va permettre la dimérisation de l'ER, puis sa liaison à l'élément de réponse aux œstrogènes sur l'ADN (ERE) et l'induction de la transcription de gènes cibles comme :

- celui codant le récepteur à la progestérone (PR)
- ceux codant les facteurs de croissance impliqués dans la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose tels que l'EGF, le TGFα (Transforming Growth Factor α) [Gabelman et Emerman 1992] et l'IGF-1 et son récepteur IGF-1R [Surmacz et Bartucci 2004]

- celui codant la cycline D nécessaire à la progression du cycle cellulaire [Jarvinen *et al*. 2000]
- ou encore le gène *Bcl-2*, dont la protéine est impliquée dans la résistance à l'apoptose [Mintz *et al*. 2008]

La voie d'activation non classique des ER fait toujours intervenir la fixation de l'E_2 sur l'ER, mais l'information est cette fois transmise par la transactivation du complexe AP-1 pour « Activator protein-1 ». Ce facteur de transcription nucléaire est constitué d'un hétérodimère de protéines issues de la famille des proto-oncogènes *fos* et *jun*, qui se fixe sur son élément de réponse et active des gènes cibles impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaires [Paech *et al*. 1997 ; DeNardo *et al*. 2005].

D'autres études ont montré que ER pouvait être activé en absence de ligands, correspondant à la voie d'activation non génomique. Cette voie permet à des facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal growth factor) ou l'IGF-1, de conférer des propriétés de croissance aux cellules ER+ indépendamment des œstrogènes en se fixant sur des récepteurs à activité tyrosine kinase [Campbell *et al*. 2001]. Ces facteurs de croissance induisent la phosphorylation de ERα *via* l'activation des voies communes telle que celle de survie cellulaire (la PI3K) et celle des MAPK (mitogen-activated protein kinases).

C. Rôle de la progestérone

Les récepteurs de la progestérone (PRA et PRB) sont des gènes cibles des oestrogènes. Quelques études ont montré qu'une augmentation de l'expression de PRA diminue l'adhésion et augmente la migration des cellules tumorales mammaires [McGowan et Clarke 1999 ; McGowan *et al*. 2004], à l'origine d'un phénotype plus agressif des tumeurs [Jacobsen *et al*. 2002].

D. Les facteurs de croissance de la famille des EGF et de l'insuline

Les facteurs de croissance épidermiques (EGF) agissent *via* leur fixation sur des récepteurs membranaires, qui sont codés par la famille des gènes *HER* (*Human Epidermal growth factor Receptor*). Cette famille comprend 4 gènes assez proches : *erbB1/EGFR/HER1*, *erbB2/HER2/neu*, *erbB3/HER3* et *erbB4/HER4* [Lupu *et al*. 1995]. Excepté *HER3,* tous ces

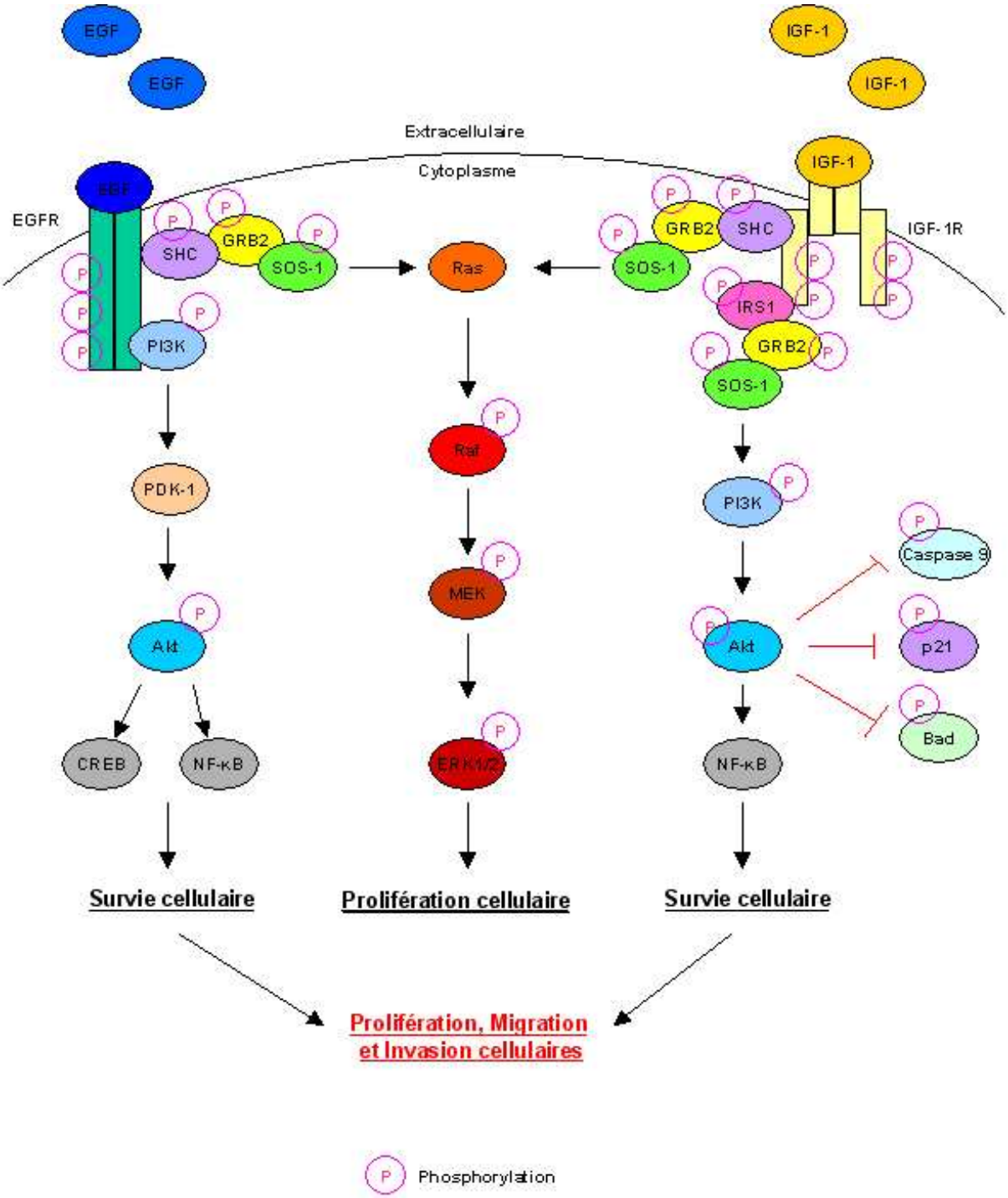


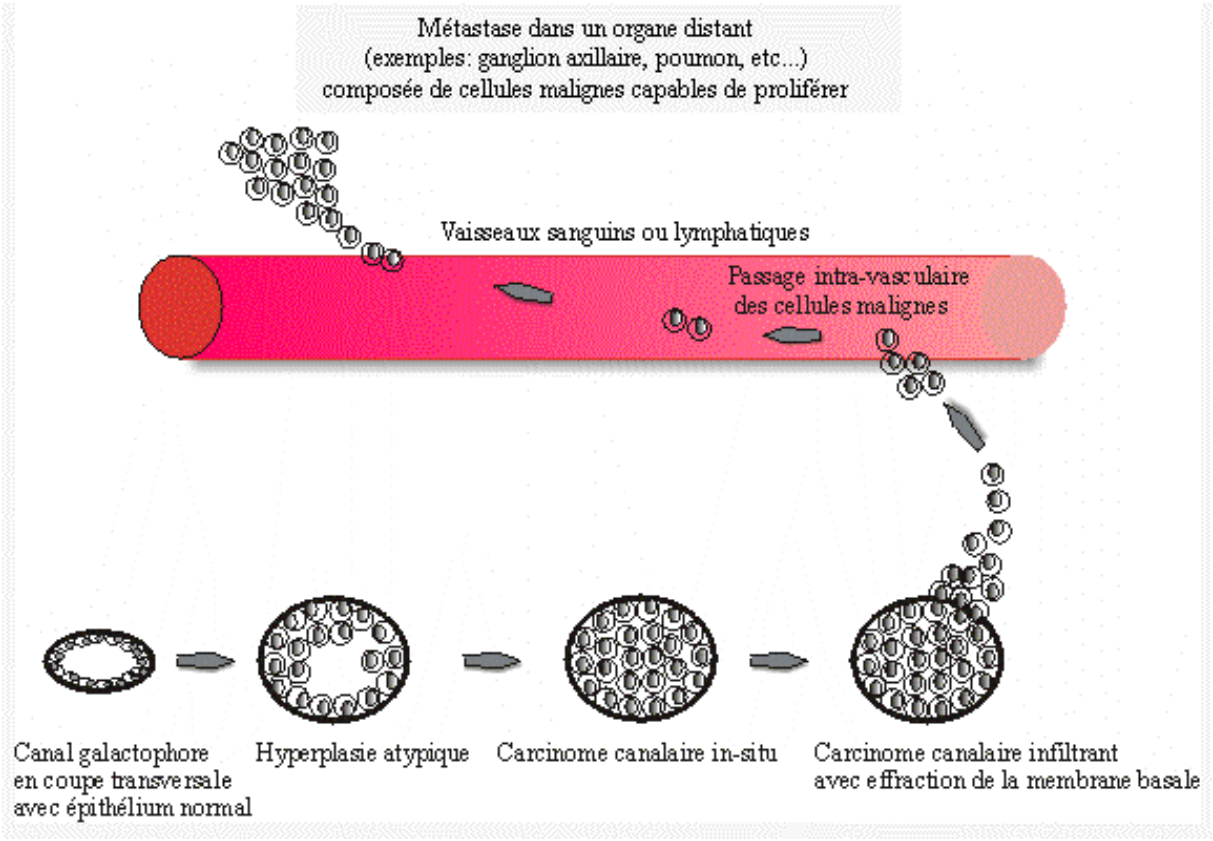
Figure 7 : Voies de signalisation cellulaire activées par l'EGF (Epidermal growth factor) et par l'IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) conduisant à la survie cellulaire.

récepteurs possèdent une activité tyrosine kinase. La dimérisation de ces récepteurs entraîne l'activité tyrosine kinase, qui est essentielle à la régulation de la croissance, de la survie, et des phénomènes de différenciation, d'adhésion et de migration cellulaires. Chaque récepteur HER existe sous forme de monomère en équilibre avec des dimères qui sont stabilisés par un ligand. Les ligands de HER1 sont l'EGF, le TGFα, l'amphiréguline, l'EGF lié à l'héparine (HB-EGF), la betacelluline et l'épiréguline. Les ligands connus de HER3 et HER4 sont, parmi les facteurs de croissance, de la famille des neurégulines (NRG1 ou NRG2). Même en l'absence de ligand connu, HER2 est le partenaire préférentiel dans les hétérodimères et HER2 peut être transactivé par un ligand reconnu par l'autre partenaire. HER2 participe ainsi à la transmission du signal même en l'absence de ligand spécifique.

Bien que les 4 gènes de la famille *erbB* semblent tous intervenir dans la tumorigenèse mammaire, seul le proto-oncogène *erbB2* est amplifié et surexprimé, suite à certaines mutations touchant la région transmembranaire du récepteur ou ayant pour conséquence la délétion correspondant au domaine extracellulaire d'interaction avec le ligand [Hynes et Stern 1994 ; Stern 2000]. Ces mutations entraînent une dimérisation du récepteur même en absence de ligand et provoquent ainsi une activation constitutive de l'activité tyrosine kinase de la protéine.

La surexpression de la protéine erbB2 est présente dès les premiers stades de la cancérogenèse mammaire et augmente ainsi le nombre de récepteurs dimérisés HER-1/HER-2 à la surface de la cellule, qui s'accompagne d'une prolifération soutenue, d'une activation constitutive de la voie de survie (voie de résistance à l'apoptose) et des mécanismes de migration et d'invasion des cellules cancéreuses mammaires [Badache et Gonçalves 2006 ; Moasser 2007], selon une cascade de phosphorylations initiée au niveau du récepteur conduisant à l'activation de facteurs de transcription, comme par exemple le NF-κB pour Nuclear Factor-kappa B (**Figure 7**). Il a d'ailleurs été montré qu'une activation soutenue de ce facteur de transcription joue un rôle important dans la pathogenèse du cancer du sein [Sovak *et al*. 1997 ; Kim *et al*. 2001]. Cliniquement, les tumeurs HER2 positives croissent plus rapidement, sont plus agressives et beaucoup moins sensibles aux traitements anticancéreux. Enfin, la voie de survie et de migration/invasion des cellules tumorales peut être fortement activée lorsque le gène *PIK3CA*, codant la sous-unité catalytique de PI3K, est muté dans un nombre significatif de cancers du sein [She *et al*. 2008].

L'IGF-1 est un facteur de croissance dont la structure chimique ressemble à celle de l'insuline. Il se fixe avec une grande affinité, à la surface des cellules, sur des récepteurs à



<u>Figure 8</u> : Physiopathologie d'un carcinome canalaire infiltrant vers une évolution métastatique dans le cancer du sein.

activité tyrosine kinase appelés IGF-1R. En dehors de quelques différences au niveau moléculaire, telle que la présence d'une protéine adaptatrice distincte appelé IRS-1 correspondant au 1er substrat du récepteur IGF-1R, la voie de signalisation *via* le récepteur IGF-1R (**Figure 7**) est très similaire à celle déclenchée par l'EGF sur son récepteur, et conduit également à la prolifération, à l'activation constitutive de la voie de survie et des mécanismes de migration et d'invasion des cellules cancéreuses mammaires [Surmacz 2000].

L''insuline, comme l'IGF-1 peut stimuler directement le développement des tumeurs mammaires, *via* le même récepteur membranaire, ce qui conduit à l'hypothèse selon laquelle le risque de cancer du sein est augmenté chez les femmes ayant des taux plasmatiques élevés d'insuline [Ellis *et al*. 1998 ; Kaaks 2003]. Très récemment, il a été montré que les oestrogènes, *via* la forme alpha de leur récepteur nucléaire, rendent les cellules tumorales ER-positives, sensibles à l'IGF-1, en stimulant l'expression de l'IGF-R et de l'IRS-1 [Surmacz et Bartucci 2004].

E. La progression tumorale dans le cancer du sein

Le développement d'une tumeur dans la glande mammaire ne se limite pas à une prolifération anarchique et incontrôlée de cellules néoplasiques exposées à des signaux de prolifération tels que ceux décrits ci-dessus. Au cours de leur prolifération, les cellules cancéreuses peuvent ainsi subir une dédifférenciation plus importante, qui leur permet d'acquérir des propriétés migratrices et invasives des tissus environnants de la glande mammaire. Ces nouvelles propriétés se définissent sous le terme de transition épithélio-mésenchymateuse que subissent les cellules tumorales mammaires et qui reflètent les modifications dans les interactions entre cellules au sein du tissu mammaire et un changement important dans l'expression des gènes. La modification de la matrice extracellulaire est ainsi une étape importante au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse, non seulement nécessaire à l'invasion par les cellules tumorales mais aussi à leur prolifération. Elle permet aussi la formation de néo-vaisseaux, qui favorise la croissance tumorale, et par la suite, représente le point de départ des cellules cancéreuses migrant à travers leur paroi pour donner naissance à des sites métastatiques (**Figure 8**).

L'acquisition d'un pouvoir migrant, invasif et métastatique, s'accompagne donc de la capacité des cellules tumorales mammaires à sécréter des substances telles que des métalloprotéases matricielles (MMP), qui constituent une famille de protéases impliquées dans la dégradation protéolytique de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire dont

la lame basale, mais également le VEGF, qui stimule la néo-angiogenèse. Les MMP sont d'ailleurs devenues des cibles potentielles dans le traitement anticancéreux [Egeblad et Werb 2002]. Les MMPs sont classées en quatre catégories : les collagénases interstitielles (MMP1, MMP8 et MMP13), les gélatinases (MMP2 et MMP9), les stromélysines (MMP3 et MMP10) et les métalloprotéases transmembranaires (MMP14, -15, -16, -17, -24, -25). Les collagénases et les gélatinases, qui dégradent le collagène de la matrice extracellulaire, sont particulièrement sécrétées par les cellules tumorales mammaires malignes et peuvent ainsi promouvoir des métastases osseuses [Wyatt *et al*. 2005 ; Rose et Siegel 2006]. La transition épithélio-mésenchymateuse conduit également à l'expression de gènes modifiant le cytosquelette et la perte d'adhésion des cellules tumorales, ce qui favorise leur migration. C'est le cas des cellules de carcinomes mammaires canalaires, représentant 80% des cancers du sein, qui, après une prolifération importante envahissant le canal galactophore, acquièrent des propriétés invasives, débutant par la digestion de la lame basale après sécrétion de MMP, puis par l'envahissement du stroma qui s'accompagne d'une expression de la vimentine et de la perte d'expression de protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, telles que des cytokératines et la cadhérine E [McSherry *et al*. 2007]. Il est à noter qu'au cours de leur migration dans les tissus environnants, les cellules tumorales mammaires reçoivent également des stimuli provenant soit des fibroblastes activés, qui remanient la matrice extracellulaire propice à la migration et l'invasion tumorales, soit des macrophages infiltrant la tumeur qui sécrètent l'EGF [McSherry *et al*. 2007].

Les facteurs responsables de la cancérogenèse mammaire sont multiples. Les facteurs de risque du cancer du sein, ainsi que des agents environnementaux chimiques (toxiques, médicaments) ou encore physiques (les radiations ionisantes) auxquels peuvent être exposées les cellules épithéliales mammaires, peuvent conduire à leur transformation en cellules cancéreuses, en induisant la libération d'espèces actives de l'oxygène (EAO). Ces dernières sont à l'origine de dommages oxydatifs, qui en s'accumulant, participent activement à la transformation des cellules [Valko et al. 2006]. De plus, ces EAO agissent sur la croissance des tumeurs, en activant de façon constitutive certaines voies de signalisation impliquées à la fois dans la prolifération et l'invasion des cellules tumorales.

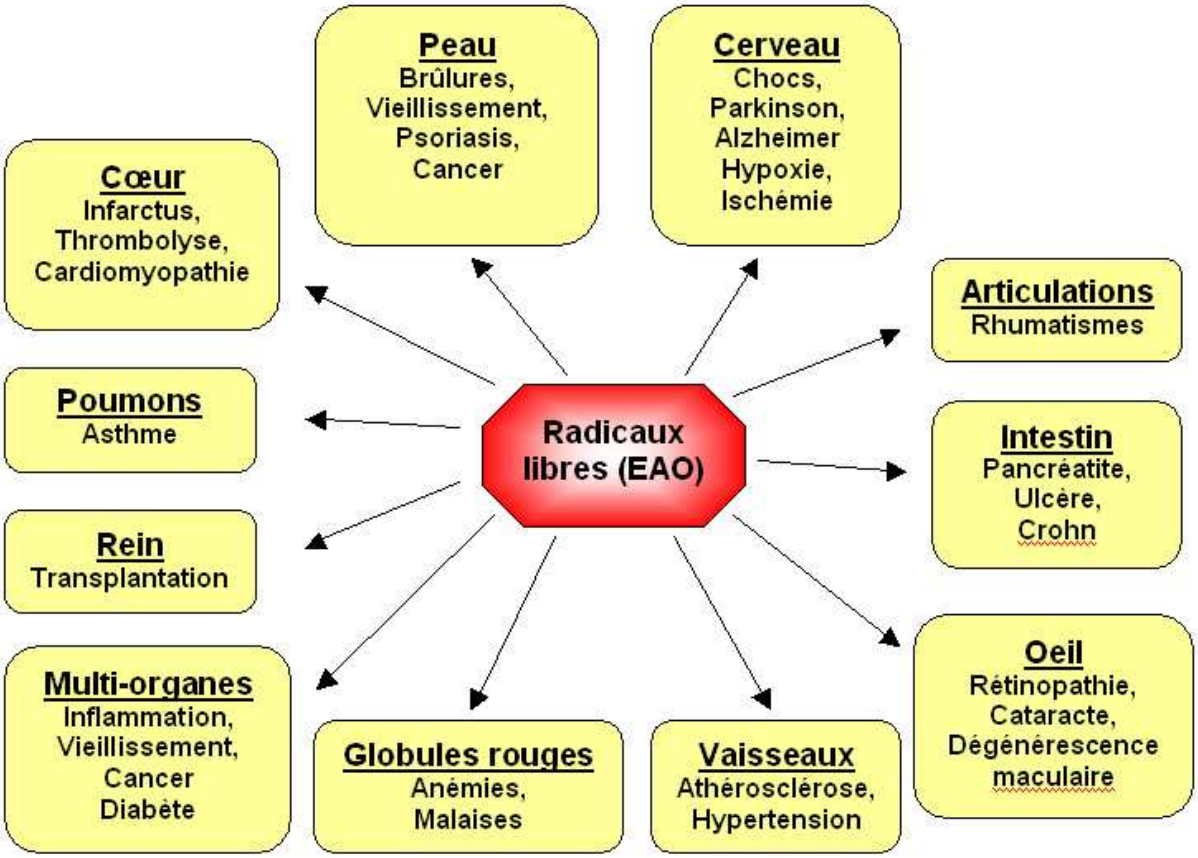


Figure 9 : Principales physiopathologies s'accompagnant d'un stress oxydant.

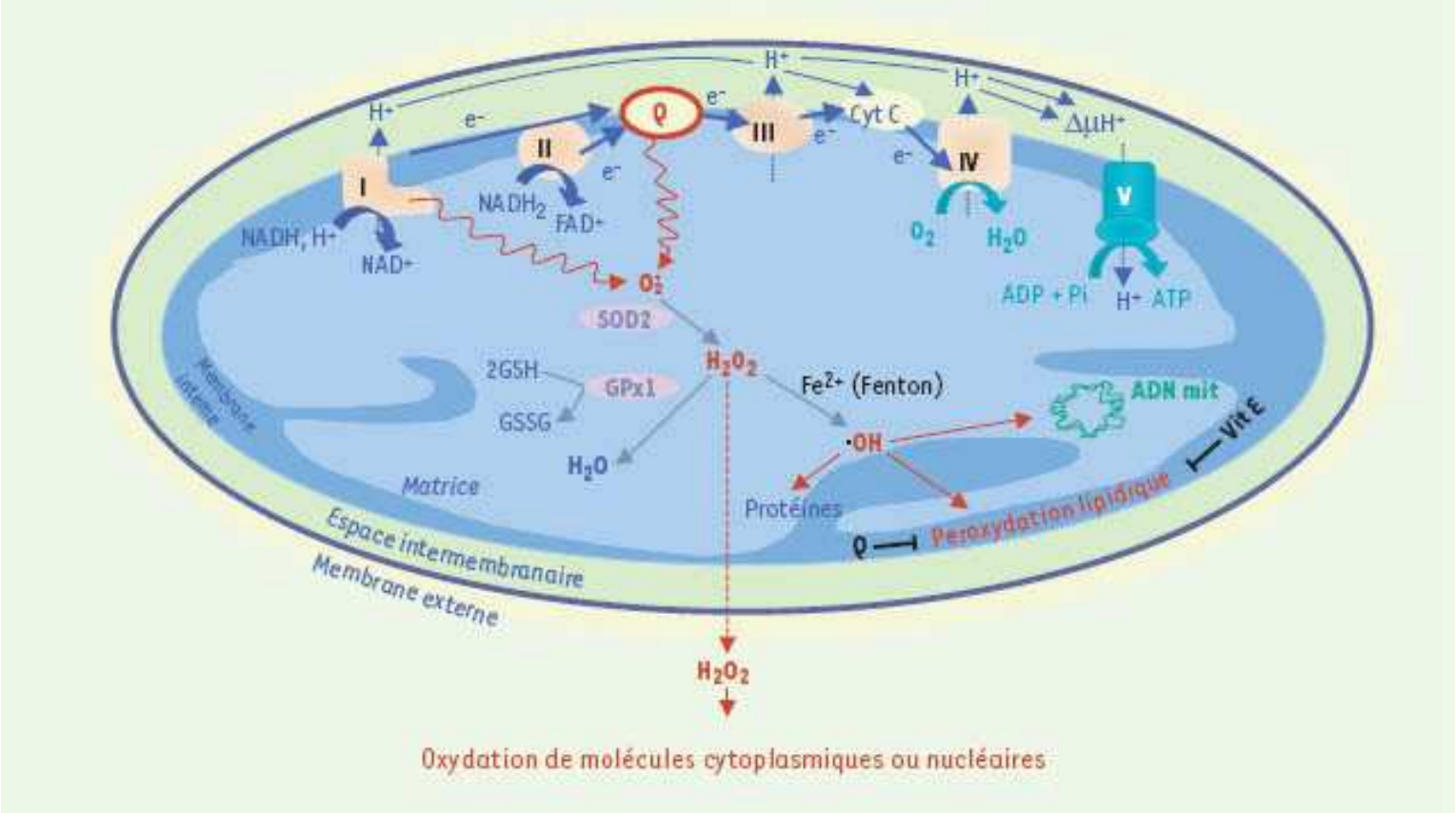
II LES ESPECES ACTIVES DE L'OXYGENE ET LES DEFENSES ANTIOXYDANTES DANS LE CANCER

La transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse se déroule en plusieurs étapes successives, au cours desquelles les espèces actives de l'oxygène ou EAO jouent un rôle important par les effets délétères qu'elles engendrent. Les défenses antioxydantes intracellulaires et un certain nombre de protéines de réparation, en éliminant les EAO et les dégâts oxydatifs qu'elles induisent dans la cellule, constituent donc une barrière potentielle importante à la transformation cellulaire. La croissance des cellules tumorales peut également dépendre des EAO libérées, par leur capacité à activer certaines voies de signalisation intracellulaire et l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires. Dans ces cellules tumorales, un déséquilibre dans l'expression des défenses antioxydantes contribue fortement à l'action des EAO sur la signalisation cellulaire.

1. Les différentes espèces actives de l'oxygène (EAO)

La molécule d'oxygène, peu réactive, est réduite en eau au cours des différentes étapes de la respiration cellulaire et est utilisée comme substrat dans de nombreuses oxydations cellulaires. Au cours de ces réactions, des EAO apparaissent, comme l'anion superoxyde ($O_2°$-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH°). Dans les conditions normales, la production basale d'EAO est rapidement éliminée par les défenses antioxydantes de la cellule. Lorsque cette production augmente ou lorsque les défenses antioxydantes sont diminuées, leur accumulation dans la cellule est à l'origine de dommages irréversibles définissant l'état de stress oxydant. Les conséquences sont la mort ou la transformation cellulaire. De nombreuses pathologies telles que le cancer, les maladies inflammatoires et neurodégénératives, s'accompagnent d'un stress oxydant induit au niveau tissulaire (**Figure 9**).

L'$O_2°$- résulte de la réduction monovalente de la molécule d'oxygène. C'est un radical libre relativement stable, à la fois oxydant et réducteur vis-à-vis de molécules organiques



<u>Figure 10</u> : Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde.

Les voies métaboliques associées aux différents nutriments libèrent de l'énergie sous forme d'équivalents réduits, $NADH,H^+$ et $FADH_2$, donneurs d'électrons à la chaîne respiratoire. Les électrons sont transférés le long de la chaîne respiratoire au cours de réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final (complexe IV), l'oxygène, qui est réduit complètement en H_2O. Au cours du transfert des électrons, dans des conditions physiologiques, il peut y avoir des fuites d'électrons et production d'anion superoxyde ($O_2^{\circ -}$) par le complexe I et le coenzyme Q. L'$O_2^{\circ -}$ est transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci peut être décomposé en H_2O ou se transformer en radical hydroxyle (OH°) par la réaction de Fenton, en présence de Fe^{2+}, ou encore diffuser dans le cytoplasme et modifier l'activité de protéines cytoplasmiques ou nucléaires en les oxydant. Le radical hydroxyle peut également oxyder l'ADN mitochondrial et nucléaire, et induire la peroxydation lipidique. [d'après Carrière *et al*. 2006].

comme les quinones et le noyau héminique des hémoprotéines. Sa charge négative lui permet de traverser les membranes cellulaires en empruntant les canaux ioniques [Suzuki *et al*. 1997].

Le peroxyde d'hydrogène, formé secondairement par dismutation de l'O_2°-, est à l'origine d'une autre EAO, le radical hydroxyle (OH°) en réagissant avec certains métaux comme le fer ferreux ou l'ion cuivreux, selon la réaction de Fenton [Gutteridge *et al*. 1998].

Ce radical OH° est le plus réactif des EAO vis-à-vis de toutes les molécules biologiques, à l'endroit même où le métal catalyse sa formation, en produisant d'autres radicaux [Suzuki *et al*. 1997].

Il existe aussi le NO ou monoxyde d'azote, qui est formé à partir de l'arginine en présence d'oxygène, par l'action des NO synthétases (NOS) et qui peut réagir avec l'anion superoxyde pour donner des peroxynitrites (ONOO-), composés fortement oxydants à l'origine des radicaux OH° [Matés et Sanchez-Jimenez 2000].

Enfin, l'oxygène singulet ($^1O_2$) est une molécule d'oxygène en état d'excitation, apparaissant surtout dans les processus de photosensibilisation par les ultraviolets (UV) lorsqu'une molécule photosensible excitée transfère son énergie à l'O_2.

Dans des conditions normales, les EAO sont libérées au cours de certaines réactions enzymatiques ou non, au sein de différents organites comme les mitochondries, les microsomes et les peroxysomes ou encore dans le cytoplasme. Tous les facteurs environnementaux comme certains xénobiotiques ou des polluants, les rayonnements UV, les radiations ionisantes, ou encore les cytokines, susceptibles d'augmenter le métabolisme cellulaire, induisent une production importante d'EAO. Dans le cas du cancer du sein, la consommation d'alcool fortement corrélée avec le risque de développer des tumeurs mammaires, est une source de production d'EAO [Ambrosone 2000].

Dans la mitochondrie, 2 à 5 % de l'O_2 sont libérés sous forme d'O_2°- au niveau de la chaîne respiratoire en conditions normales [Sohal et Brunk 1992; Valko *et al*. 2006]. Les 4 étapes qui consistent à réduire l'O_2 pour former de l'H_2O, sont catalysées par la NAD(P)H oxydase, la quinone réductase, la cytochrome réductase et la cytochrome oxydase (**Figure 10**). Lors d'une anoxie ou d'une hypoxie des tissus d'un organisme, le transport des électrons est arrêté au niveau du coenzyme Q (ubiquinone) de la chaîne respiratoire des mitochondries. Lors de la ré-oxygénation des tissus, l'O_2 est alors réduit électron par électron au niveau de ce coenzyme Q, produisant ainsi une quantité importante d'O_2°-. Ainsi toute substance capable d'augmenter ou de bloquer l'activité de la chaîne respiratoire, induit la production d'EAO dans la cellule.

Dans les microsomes et les peroxysomes, l'activité des flavoenzymes ou oxydases, impliquées dans l'oxydation des acides aminés, du glucose ou des acides gras à longue chaîne, libère de l'H_2O_2 en utilisant l'O_2 comme accepteur d'électrons. D'autres oxydases comme l'aldéhyde oxydase ou la xanthine oxydase libèrent de l'$O_2°$-. Enfin les mono-oxygénases dépendantes du cytochrome P450, localisées dans la membrane des microsomes et des peroxysomes qui sont impliquées dans le métabolisme de nombreuses molécules biologiques ou de xénobiotiques, libèrent également des $O_2°$- en leur incorporant un ou deux atomes d'oxygène [Yeldandi *et al*. 2000].

D'autres voies métaboliques importantes sont également source d'EAO, particulièrement celle de la biosynthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique, par les activités de la lipoxygénase ou de la cyclooxygénase [Marnett 1994]. De même, l'auto-oxydation de nombreuses molécules comme les protéines possédant un groupement hème ou thiol et les catécholamines, entraîne la libération d'$O_2°$- dans le cytoplasme. Dans le cas de la carcinogenèse mammaire, la voie métabolique impliquée dans la transformation des œstrogènes est une source importante d'EAO. Une exposition prolongée des cellules épithéliales mammaires aux œstrogènes libère des métabolites de ces hormones, qui peuvent induire des dégâts oxydatifs sur l'ADN [Cavalieri et Rogan 2006]. Ces actions dépendent du niveau d'expression de la catéchol-O-méthyltransférase, qui est responsable de la transformation des œstrogènes en un métabolite inerte. Une expression faible de cette enzyme favorise la transformation des œstrogènes en dérivés quinoniques, sous l'action d'enzymes à cytochrome P450 [Mitrunen et Hirvonen 2003]. Ces dérivés quinoniques sont très réactifs avec l'ADN et sont eux-mêmes générateurs d'EAO sous l'action de réductases à cytochrome P450 [Sipe *et al*. 1994].

Les phagocytes, lorsqu'ils sont activés par un antigène ou par des cytokines pro-inflammatoires (« flambée respiratoire »), produisent une grande quantité d'$O_2°$- grâce à la présence d'une enzyme membranaire, la NADPH oxydase. Cet $O_2°$- libéré est transformé en H_2O_2, qui sert à son tour de substrat à l'activité de la myéloperoxydase pour produire des hypochlorites très efficaces contre les bactéries, levures ou parasites [Matés et Sanchez-Jimenez 2000].

2. Les défenses antioxydantes

Afin d'éviter l'accumulation des EAO à l'origine d'effets délétères, chaque cellule de l'organisme possède des protéines enzymatiques et non enzymatiques, ainsi que des molécules d'origine alimentaire et métabolique qui les éliminent.

A. Les protéines enzymatiques éliminant les EAO

Les protéines enzymatiques antioxydantes constituent la 1ère barrière de cette défense antioxydante, qui est constituée de 4 métalloenzymes essentielles : les superoxydes dismutases (SOD), les glutathions peroxydases (GPX), la catalase et les peroxyrédoxines (PRX). Leur activité et leur localisation dans la cellule sont complémentaires et assurent l'élimination des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène dans tous les compartiments intracellulaires.

A.1. Les superoxydes dismutases (SOD)

Les SOD catalysent la dismutation de l'$O_2^{\circ-}$ en H_2O_2 selon la réaction suivante :

$$2O_2^{\circ-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \text{ [Fridovich 1997].}$$

Elles existent sous deux formes différant par leur métal cofacteur et par leur localisation : la SOD Cu/Zn cytosolique (SOD1), nucléaire et peroxysomique, et la SOD Mn strictement mitochondriale (SOD2), dont nous reparlerons plus en détail dans la partie III de cette analyse bibliographique. Il existe une 3ème forme localisée dans le milieu extracellulaire, dont l'activité dépend du cuivre et du zinc (SOD3) [Matés et Sanchez-Jimenez 2000]. Dans la classification internationale, les SOD appartiennent au groupe des oxydoréductases (EC1.15.1.1). Elles sont présentes dans toutes les cellules de mammifères.

L'activité de la SOD Cu/Zn intracellulaire (SOD1) représente 80% de l'activité SOD totale d'une cellule. C'est une protéine dimérique d'environ 36 kDa, dont chaque unité possède un site catalytique actif contenant un atome de cuivre et un atome de zinc [Banci *et al*. 1998]. Seul le cuivre sous forme Cu^{2+} participe à l'activité catalytique de l'enzyme, le zinc assurant la stabilité de l'enzyme [Getzoff *et al*. 1983]. L'expression de la SOD Cu/Zn

intracellulaire est plutôt constitutive dans les cellules humaines. Son gène, situé sur le chromosome 21 (région 21q22) chez l'homme, possède dans sa région promotrice une boite TATA et CCAAT et des éléments de réponse de différents facteurs de transcription, qui explique qu'il peut être inductible par divers facteurs [Kim *et al.* 1994 ; Minc *et al.* 1999 ; Yoo *et al.* 1999 ; Cho *et al.* 2001 ; Zelko *et al.* 2002].

La SOD Cu/Zn extracellulaire (SOD3) est glycosylée et sécrétée dans l'espace extracellulaire [Marklund 1982]. Cette enzyme, tétramérique (135 kDa), possède des sous-unités liées de façon non covalente, possédant chacune un atome de cuivre et un atome de zinc. Le gène de la SOD 3 est situé sur le chromosome 4 (4p-q21) chez l'homme ; sa région promotrice possède des séquences régulatrices dont celles correspondant à la réponse antioxydante ou ARE pour « Antioxidant Response Element » [Zelko *et al.* 2002].

A.2. La catalase (CAT)

Dans les cellules eucaryotes, la catalase (EC1.11.1.6) est localisée principalement dans les peroxysomes, dans lesquels résident de nombreuses oxydases productrices d'H_2O_2. Elle est formée de quatre sous-unités, chacune ayant un groupement héminique au sein duquel le fer est sous forme ferrique (Fe^{3+}). Cette enzyme de 240 kDa est active sous forme tétramérique et possède une double activité, dépendante de la concentration en H_2O_2 [Nordberg et Arner 2001]. A faible concentration, elle réduit l'H_2O_2 en oxydant des substrats donneurs d'hydrogène (phénols et alcools) selon la réaction suivante :

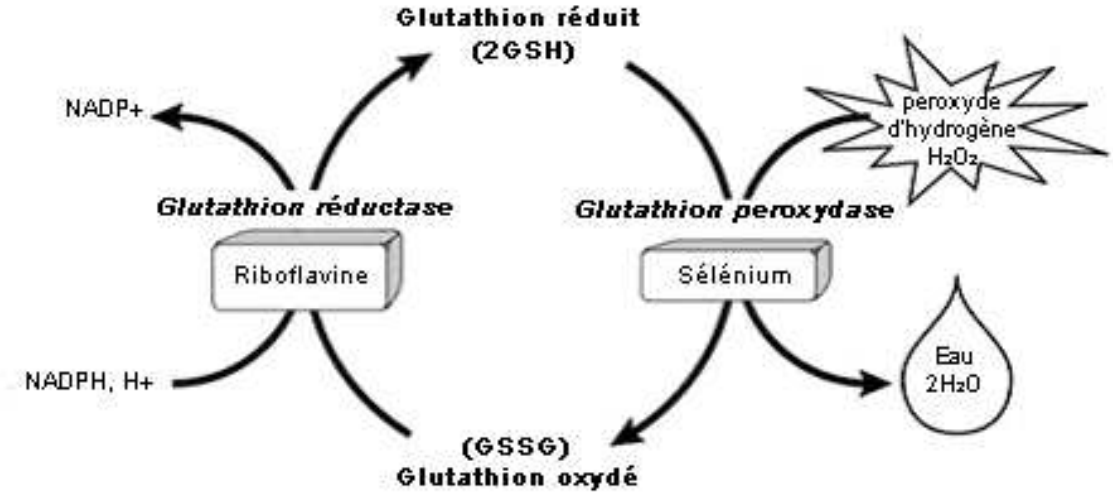
$$RH + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O + O{=}Fe^{4+}$$

$$H_2O_2 + O{=}Fe^{4+} \rightarrow O_2 + Fe^{3+} + H_2O$$

Pour des fortes concentrations en H_2O_2, elle catalyse sa transformation en eau et en dioxygène [Nordberg et Arner 2001], selon la réaction suivante :

$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

Le mécanisme de régulation de la catalase est encore peu connu chez les eucaryotes. Il est seulement décrit lorsque la concentration en H_2O_2 est faible, qu'il existe une régulation post-transcriptionnelle, qui correspond à la fixation d'une protéine dans la partie 3' non traduite de l'ARNm de la catalase, protéine qui se détache pour permettre la traduction de cet ARNm lorsque la concentration en EAO est forte [Sato *et al.* 1992].



<u>Figure 11</u> : Cycle oxydo-réducteur du glutathion.

Une molécule de peroxyde d'hydrogène est réduite en en deux molécules d'eau, alors que deux molécules de glutathion sont oxydées dans une réaction catalysée par une enzyme utilisant le sélénium, la glutathion peroxydase. Ce glutathion oxydé est ensuite réduit par une enzyme dépendante de l'activité de la Riboflavine, la glutathion réductase.

A.3. Les glutathions peroxydases (GPX)

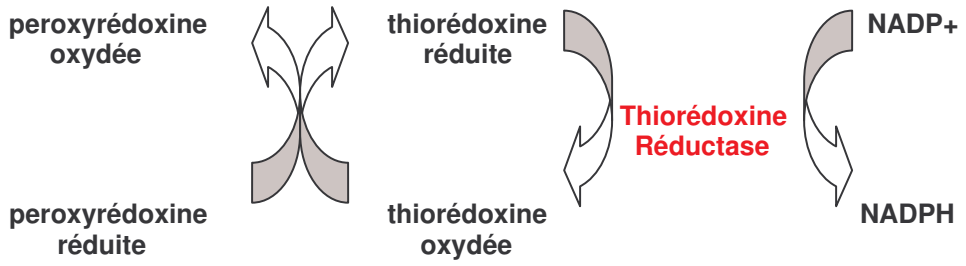
La glutathion peroxydase ou GPX est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine (dans laquelle l'oxygène du groupement OH de la sérine est remplacé par le sélénium). Chez les Mammifères, elle existe sous 5 isoformes qui sont présentes dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries. Bien que leur expression soit ubiquitaire, les niveaux de chaque isoforme varient selon le type cellulaire. Les GPX cytosoliques et mitochondriales (cGPX et GPX1) assurent l'élimination du peroxyde d'hydrogène et des hydroxyperoxydes lipidiques en utilisant le glutathion (GSH) comme donneur d'électrons [Matés et Sanchez-Jimenez 2000], selon la réaction suivante :

$$ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GS\text{-}SG \text{ (disulfide de glutathion ou GSH oxydé)} + H_2O$$

La glutathion peroxydase la mieux connue, la GPX1 est un tétramère de 80 kDa contenant un atome de sélénium dans chacune de ses 4 sous-unités de 20 kDa [Brown et Arthur 2001]. Quelque soit le type cellulaire, elle est localisée dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale.

La GPX d'Ursini ou GPX cellulaire élimine les lipides peroxydés [Ursini *et al*. 1985]. La GPX2 cytosolique et la GPX3 extracellulaire sont faiblement détectées dans la plupart des tissus, excepté dans les reins et le tractus gastro-intestinal. Quant à la GPX5, séléno-indépendante, elle est exprimée spécifiquement dans les cellules de l'épididyme de souris et présente une activité glutathion-S-transférase [de Haan *et al*. 1998].

L'activité des GPX intervient lors de faibles concentrations en H_2O_2, et dépend de la présence de glutathion réduit (GSH). Ce dernier est un tripeptide antioxydant aussi appelé L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine, car il est utilisé comme réducteur d'H_2O_2 par la GPX ou à l'état libre dans la cellule. Son oxydation nécessite ainsi sa régénération par la glutathion réductase selon le cycle oxydo-réducteur présenté en **figure 11** [Matés et Sanchez-Jimenez 2000] :



<u>Figure 12</u> : Le système de régénération des peroxyrédoxines par les thiorédoxines.

A.4. Les peroxyrédoxines

Les peroxyrédoxines (PRX) ou thiorédoxines peroxydases, découvertes en 1988, sont de petites protéines de 22 à 27 kDa, capables de réduire directement l'H_2O_2 ou les peroxydes d'acides gras [Chae *et al*. 1994]. Elles sont divisées en 3 sous-classes majeures : les PRX I à IV ayant 2 cystéines typiques, la PRX V ayant 2 cystéines atypiques et la PRX VI ayant 1 cystéine atypique. Ce sont des protéines présentes dans toutes les cellules de Mammifères et qui se localisent dans tous les compartiments cellulaires comme suit : les sous-classes I, II et VI sont cytosoliques, la III est exclusivement mitochondriale, la IV est dans le réticulum endoplasmique et est sécrétée, la V est mitochondriale et peroxysomique [Rhee *et al*. 2005]. Lorsque ces enzymes réagissent avec l'H_2O_2, elles se retrouvent sous une forme oxydée, qui nécessite leur régénération selon un mécanisme qui fait intervenir des molécules antioxydantes, appelées thiorédoxines (Trx).

Ces dernières sont des protéines ubiquitaires de 12 kDa qui existent sous différentes isoformes, codées par des gènes différents. Les formes majoritaires, Trx-1 cytosolique et nucléaire et Trx 2 mitochondriale sont présentes dans toutes les cellules de mammifères et sont inductibles lors d'un stress oxydant. Les thiorédoxines par leur groupement thiol, sont donc nécessaires pour la réduction des peroxyrédoxines oxydées après réaction avec un peroxyde. Une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par une oxydoréductase, la thiorédoxine réductase (TrxR) de 55 à 65 kDa, qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif et une activité dépendante du NADPH (**Figure 12**).

Les Trx et TrxR sont également impliquées dans la régénération des protéines oxydées et des vitamines antioxydantes (C et E), et dans la régulation de l'activité de certains facteurs de transcription comme AP-1 et NF-κB [Watson *et al*. 2004].

B. Les autres protéines et molécules antioxydantes

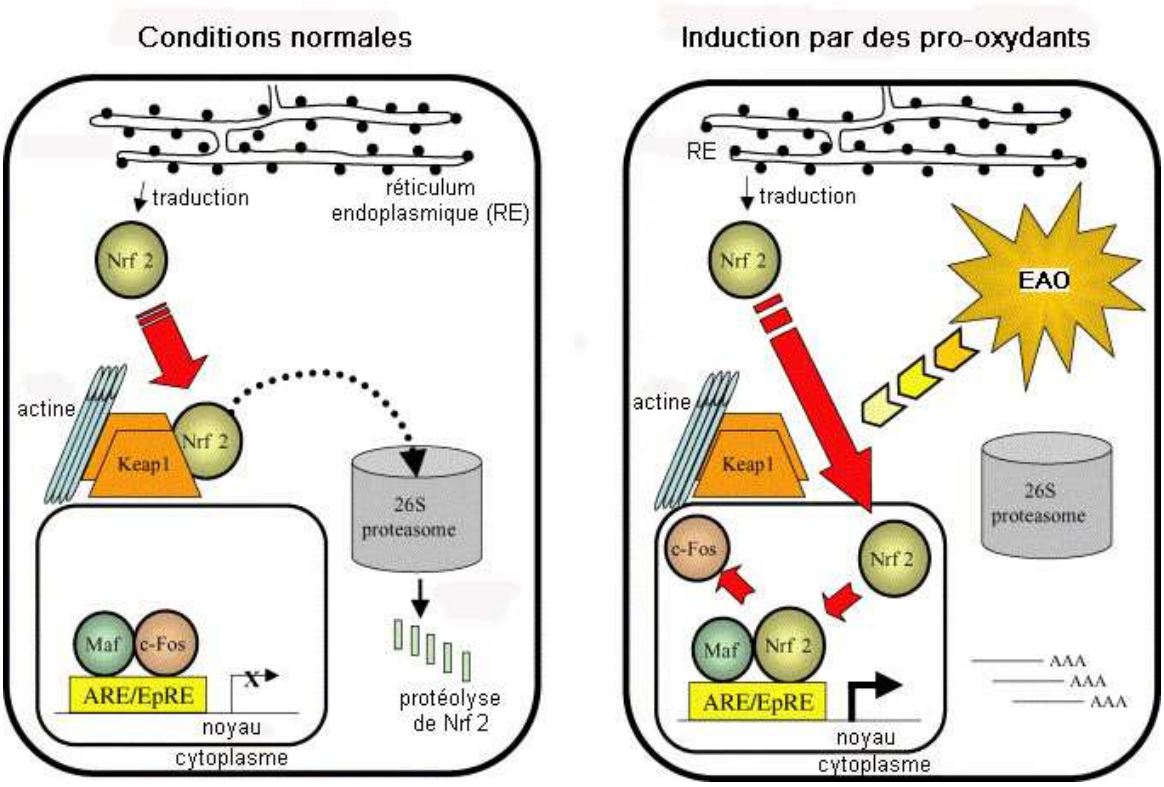
La 2ème barrière de la défense antioxydante dans la cellule est constituée des enzymes dégradant les produits issus de la peroxydation lipidique ou de celles métabolisant les xénobiotiques pro-oxydants. Cette barrière de défense comprend également les protéines intra- et extracellulaires chélatant les métaux comme le fer et le cuivre, qui s'opposent ainsi à la production d'OH° *via* la réaction de Fenton. L'expression des protéines chélatrices est régulée par la concentration en métaux dans la cellule grâce à la présence d'éléments de réponse sensibles au fer ou IRE pour « Iron Response Element », situés dans la région 5' non

codante de l'ARNm codant la ferritine, ou encore en étroite relation avec l'activité enzymatique de l'hème oxygénase-1 et -2, qui intervient dans la dégradation de l'hème des protéines héminiques (hémoglobine, cytochromes…) libérant le fer actif [Eisenstein et Blemings 1998]. Parmi les protéines chélatrices des métaux, les métallothionéines (MT), forment une famille de petites protéines codées par des gènes différents, et jouent un rôle important dans la défense antioxydante de la cellule par leur capacité à chélater les métaux et à piéger les radicaux OH° [Moffatt et Denizeau 1997]. En plus du GSH et de la Trx, des molécules aux propriétés antioxydantes d'origine alimentaire, comme les vitamines A, E et C, ou métaboliques, comme l'ubiquinone et l'acide urique participent également à la défense cellulaire [Matés et Sanchez-Jimenez 2000].

Enfin, la NADPH-quinone oxydoréductase ou DT diaphorase, peut être considérée comme une protéine antioxydante, car elle catalyse la réduction par deux électrons des composés quinoniques, ne libérant ainsi pas d'anion superoxyde. Cette enzyme essentiellement hépatique, est localisée en grande partie dans le cytosol et plus faiblement dans les microsomes et les mitochondries. Elle peut être à l'origine de résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis de molécules anti-cancéreuses composées d'un noyau quinonique telles que les anthracyclines [Gutierrez 2000].

C. Les protéines de réparation des dommages oxydatifs

Les enzymes de réparation représentent la dernière barrière de défense antioxydante dans la cellule, et leur expression est indispensable afin d'éviter l'accumulation des dégâts provenant de l'oxydation des molécules biologiques, responsables de la mort ou de la transformation cellulaires. Les méthionines oxydées en sulfoxydes sont réparées par une enzyme spécifique appelée la méthionine sulfoxyde réductase, qui utilise la thiorédoxine comme co-facteur [Nordberg et Arner 2001]. De même, les protéines oxydées par les EAO sont éliminées spécifiquement dans la cellule par le protéasome 20S, encore appelé macroxyprotéinase**,** indépendamment de l'ATP et de l'ubiquitine [Shringarpure *et al*. 2001]. En ce qui concerne les bases nucléiques oxydées, leur élimination est assurée par l'activité d'un groupe d'enzymes, comprenant les glycosylases qui coupent la liaison entre elles et leur sucre, et une polymérase et une ligase qui les remplacent par les nucléotides corrects. L'activité de ces enzymes est associée avec celle de la poly ADP-ribose polymérase (PARP), qui en greffant des ADP-riboses sur les topoisomérases et les histones, entraîne un blocage de la réplication et de la transcription. Ces enzymes jouent donc un rôle prépondérant dans le



<u>Figure 13</u> : Facteurs de transcription recrutés sur l'Antioxydant Response Element ou ARE dans des conditions normales ou lors d'un stress oxydant.

Dans des conditions homéostatiques, la protéine Maf se fixe sur l'ARE soit avec la protéine c-Fos, soit avec d'autres protéines Maf ou Nrf 1. Bien que la protéine Nrf 2 soit capable de s'associer avec l'ARE, dans des conditions normales, elle est séquestrée par Keap1 dans le cytoplasme et va être dégradée par le protéasome. Cependant, lors d'une induction par les EAO, Nrf 2 est stabilisée, transloquée dans le noyau et déplace les complexes répresseurs de la transcription des gènes cibles de l'ARE pour s'associer avec la protéine Maf [Modifiée d'après Nioi et Hayes 2004].

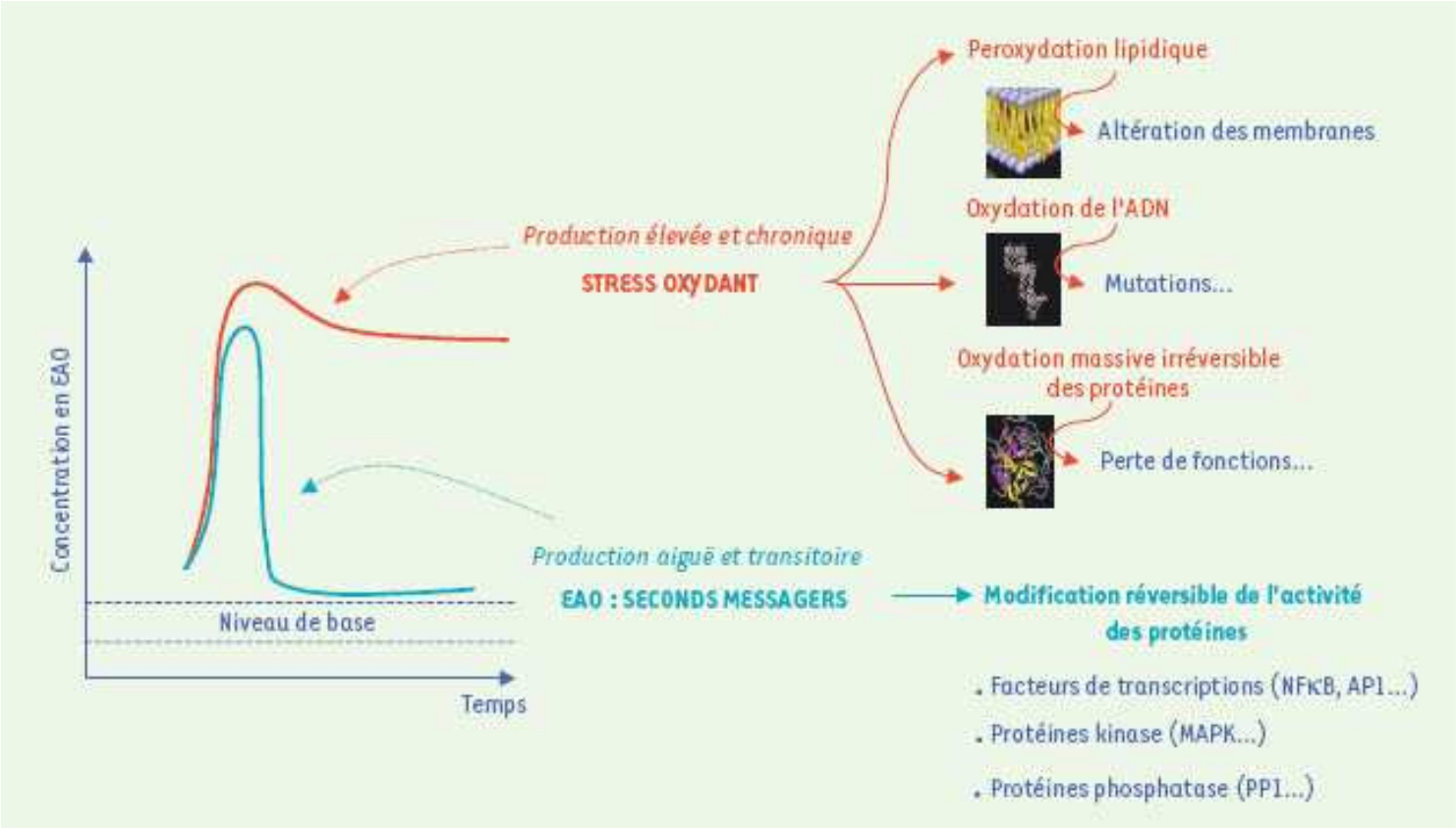
maintien de l'intégrité du génome, en empêchant la transmission des mutations ponctuelles engendrées par les EAO [Bohr et Dianov 1999].

Enfin, certaines enzymes sont considérées antioxydantes, car elles sont impliquées dans l'élimination des aldéhydes cytotoxiques issus de la peroxydation lipidique, telles que l'aldéhyde déshydrogénase, qui transforme l'aldéhyde en son acide carboxylique correspondant, et l'alcool déshydrogénase qui transforme l'aldéhyde en alcool. Ces deux enzymes cytosoliques sont localisées majoritairement dans les hépatocytes. Les glutathion-S-transférases (GST), qui sont présentes dans toutes les cellules de Mammifères, au niveau du cytosol et de la matrice mitochondriale et qui sont impliquées dans l'élimination des xénobiotiques, peuvent également conjuguer le glutathion à un aldéhyde cytotoxique pour favoriser son élimination de la cellule.

D. La régulation des défenses antioxydantes

En plus des éléments de réponse sensibles au fer ou « Iron Response Element » régulant l'expression des protéines chélatrices du fer et des sites correspondant à AP-1 et à NF-κB qui interviennent également dans la régulation des gènes codant des enzymes antioxydantes [Okuda *et al*. 1988 ; Moscow *et al*. 1992 ; Van Remmen *et al*. 1998 ; St Clair *et al*. 2002], il existe d'autres séquences nucléotidiques appelées ARE pour « Antioxidant Response Element » en amont de gènes cibles codant les glutathion S-transférases (GST), les métallothionéines, la DT diaphorase ou l'hème oxygénase. Ces éléments de réponse sont constitués de deux sites de fixation AP-1, l'un parfait, l'autre imparfait, suivis d'une boîte GC, sur lesquels se fixent un hétérodimère formé de la protéine c-Jun ou Maf et d'un membre de la famille des protéines Nrf 1 et Nrf 2 (pour NF-E2 related factor 1 et 2) pour activer la transcription des gènes cibles [Jaiswal 2000].

Dans l'exemple présenté en **Figure 13**, la protéine Nrf 2 retenue dans le cytoplasme par une protéine inhibitrice appelée Keap1 (pour Kelch-like ECH-associated protein 1), se libère de cette dernière lors d'une augmentation d'EAO ou après activation de la voie des MAPK, puis migre dans le noyau pour former un complexe avec Maf qui active la transcription des gènes cibles. Cette réponse antioxydante constitue un mécanisme central à la fois dans la protection des cellules normales en présence d'inducteurs de la production d'EAO et responsables de la transformation cellulaire, mais également dans l'adaptation des cellules tumorales vis-à-vis de certains agents anticancéreux générant un stress oxydant [Wolf 2001 ; Nioi et Hayes 2004].



<u>Figure 14</u> : Conséquences cellulaires des EAO.

Si la production d'EAO est modérée et relativement courte dans le temps, un déséquilibre temporaire dans la balance entre production d'EAO et défenses anti-oxydantes est observé : les EAO activent de manière spécifique et réversible des voies de signalisation qui permettront notamment de déclencher des systèmes d'adaptation de la cellule. En cas de production d'EAO trop intense et maintenue dans le temps, les systèmes anti-oxydants sont dépassés, et un dérèglement chronique de l'équilibre provoque l'établissement d'un stress oxydant aboutissant à la survenue de situations physiopathologiques [d'après Carrière *et al.* 2006].

3. Le rôle des EAO dans la transformation cellulaire

Une production chronique et importante d'EAO, associée à une diminution des défenses antioxydantes se traduit par la mise en place d'un stress oxydant, qui s'observe par l'apparition d'effets délétères correspondant à des dégâts oxydants (**Figure 14**). Ces effets délétères irréversibles sont le résultat de l'oxydation des molécules biologiques par les EAO, qui lorsqu'ils s'accumulent, entraînent les cellules vers la mort par apoptose ou vers la transformation.

L'oxydation par le radical OH° des acides gras essentiellement polyinsaturés au sein des phospholipides membranaires, initie une réaction en chaîne à l'origine d'autres radicaux libres oxygénés (ROO° ou radical peroxyle , ROOH ou hydroperoxyde et RO° ou alkoxyle). Cet ensemble d'oxydations est appelé peroxydation lipidique. La peroxydation des lipides entraîne ainsi une désorganisation des membranes plasmiques et intra-cytoplasmiques, qui perdent leur intégrité par une diminution de la fluidité et du potentiel de membrane. Les acides gras peroxydés, libérés par l'activité de la phospholipase A_2, subissent une hydrolyse spontanée dans la cellule engendrant des aldéhydes cytotoxiques comme le malondialdéhyde (MDA) issu de l'acide linoléique [Frankel *et al*. 1987] ou encore le 4-hydroxy-2-trans nonénal (4-HNE) dérivé de l'oxydation disruptive des acides gras ω-6 (acide arachidonique) [Benedetti *et al*. 1980]. Très réactifs, ces aldéhydes réagissent à leur tour avec les fonctions amines libres des protéines [Kikugawa et Beppu 1987], des acides nucléiques [Reiss et Tappel 1973] ou encore des phospholipides [Bidlack et Tappel 1973] en donnant naissance à des pontages 1-amino-3-iminopropène ou AIP [Chio et Tappel 1969] inter- et intra-moléculaires, à l'origine de structures fluorescentes appelées lipofuschines et céroïdes [Esterbauer *et al*. 1986]. Lors d'un stress oxydant survenant au cours du vieillissement, lors de cancers ou de maladies inflammatoires, ces structures s'accumulent dans les lysosomes des cellules, qui meurent ensuite [Matés et Sanchez-Jimenez 2000]. La réaction des aldéhydes cytotoxiques avec certaines bases nucléiques, conduit à la formation de mutagènes à l'origine de la transformation cellulaire [Marnett 1999].

Les protéines sont oxydées par le radical OH° et les hydroperoxydes lipidiques, préférentiellement au niveau des acides aminés soufrés et aromatiques, où elles se retrouvent agrégées sous forme de lipofuschine, suite à la réaction des MDA ou 4-HNE avec leurs fonctions NH_2 libres. Ces réactions entraînent des changements dans leur structure et/ou dans leur activité, à l'origine de la perte de fonctions biologiques pour la cellule et mènent à une

désorganisation du cytosquelette à l'origine de leur mort ou de leur transformation [Stadtman et Levine 2003; Valko *et al*. 2006].

L'oxydation des bases nucléiques par les EAO, comme la guanine et la thymine, respectivement en 8-hydroxy-déoxyguanine (8-OHdG) et en thymine glycol, conduit à des mutations ponctuelles transmises aux générations cellulaires suivantes, ou à des cassures simple brin de l'ADN ou des ARN [Marnett 2000 ; Cooke *et al*. 2003]. Ces altérations au niveau des acides nucléiques activent la plupart du temps des signaux déclenchant l'apoptose, ou entraînent une instabilité génétique à l'origine de l'émergence de cellules initiées, puis néoplasiques et tumorales [Goetz et Luch 2008].

Dans le cas du cancer du sein, l'accumulation de mutations et de délétions induites par les EAO est également associée à une déficience de certaines protéines de réparations de l'ADN [Karihtala *et al*. 2006], dont les plus connues sont la p53 et BRCA1 ou 2 [Ambrosone 2000].

Enfin, le radical OH° oxyde également les sucres simples des acides nucléiques ou les glycanes des constituants de la matrice extracellulaire, comme l'acide hyaluronique ou les héparanes sulfates, ce qui entraîne des modifications dans l'adhérence et les interactions des cellules avec leur environnement, susceptibles d'induire leur transformation [Matés et Sanchez-Jimenez 2000].

4. Le rôle des EAO et des défenses antioxydantes dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales

A. La production des EAO dans les cellules tumorales

Les altérations génétiques présentes dans les cellules tumorales sont à l'origine d'altérations métaboliques qui touchent en particulier la chaîne respiratoire et qui conduisent à une production limitée ou transitoire d'EAO. La mitochondrie, principale source d'EAO, est très sensible à l'oxydation car l'ADN de cet organite est dépourvu d'histones. L'accumulation de délétions ou de mutations ponctuelles en son sein entraîne la synthèse de protéines mutées et donc des dysfonctionnements dans un grand nombre de cellules tumorales, notamment d'origine mammaire [Golden et Melov 2001 ; Carew et Huang 2002]. Une étude récente a en effet montré que le transfert d'un ADN mitochondrial muté d'une cellule tumorale mammaire hautement métastatique (MDA-MB231) provoque une

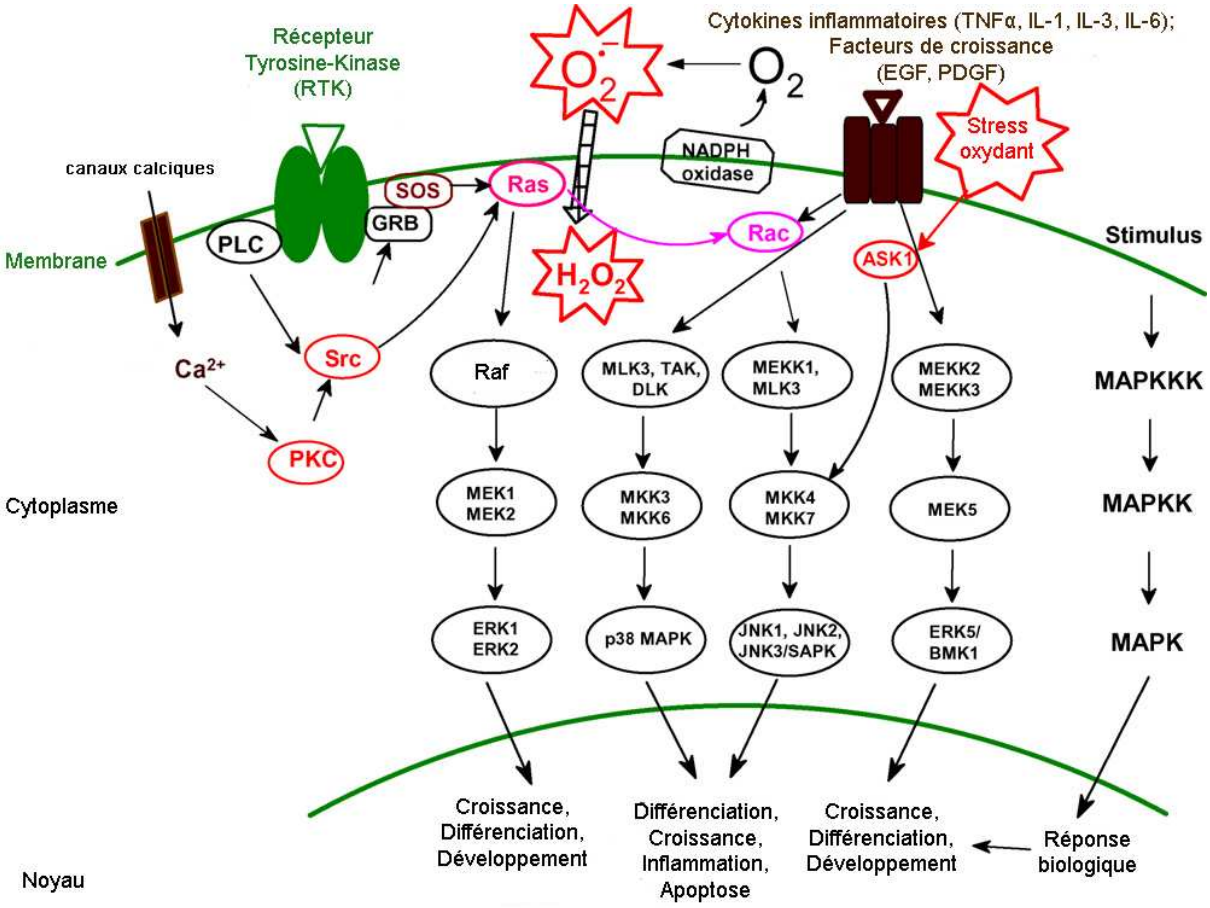
augmentation du pouvoir invasif de cellules qui ne l'étaient pas initialement (HeLa). Ces mutations touchent des protéines du complexe I de la chaîne respiratoire de la mitochondrie, entraînant une surproduction d'EAO dans les cellules HeLa [Ishikawa *et al*. 2008]. De même, la surexpression dans les cellules tumorales mammaires d'une enzyme comme la thymidine phosphorylase, qui catabolise la thymidine, est également une source importante d'EAO [Brown *et al*. 2000]. *In vivo*, les cellules tumorales sont également exposées à des EAO libérées par les macrophages activés qui infiltrent les tumeurs, par l'intermédiaire de leur NADPH oxydase membranaire libérant de grandes quantités d'O_2°- [Storz 2005]. Des études récentes indiquent que les cellules tumorales sont capables de surexprimer la NADPH oxydase membranaire [Fukuyama *et al*. 2005].

A côté des effets délétères provoqués sur les molécules biologiques, ces EAO jouent le rôle de second messager intracellulaire en activant ou en interférant avec certaines voies de signalisation qui conduisent à la prolifération, la migration et à l'invasion des cellules tumorales [Storz 2005].

Selon les cas, les EAO oxydent des acides aminés sensibles de la protéine cible, en particulier des cystéines, situées dans le site catalytique ou à proximité. Cette oxydation de cystéines sensibles conduit à la formation de ponts disulfures intra- ou inter-chaînes, responsables d'un changement de conformation de la protéine qui active certaines protéines kinases et quelques facteurs de transcription, ou inactive certaines protéines phosphatases [Thannickal et Fanburg 2000].

B. Rôle des EAO dans la prolifération et la survie des cellules tumorales

Les EAO issues de l'activité constitutive et augmentée d'enzymes dans les cellules tumorales participent ainsi à la transduction du signal conduisant ces cellules à proliférer, en inactivant des protéines phosphatases ou en activant certaines protéines kinases comme les sérine/thréonine kinases [Thannickal et Fanburg 2000], en particulier la famille des protéines kinases C (PKC) [Gopalakrishna et Jaken 2000], ou encore les protéines Ras, Raf et les mitogen-activated protein kinases ou MAPK (les extracellular-regulated kinases ou ERK), les stress activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases ou SAPK/JNK et les p38 MAPK [Allen et Tresini 2000], ou encore les tyrosines kinases comme c-Abl et c-Src, qui sont souvent surexprimées et constitutivement activées dans de nombreuses cellules tumorales, et dont l'implication biologique dans la prolifération et la migration cellulaires est clairement



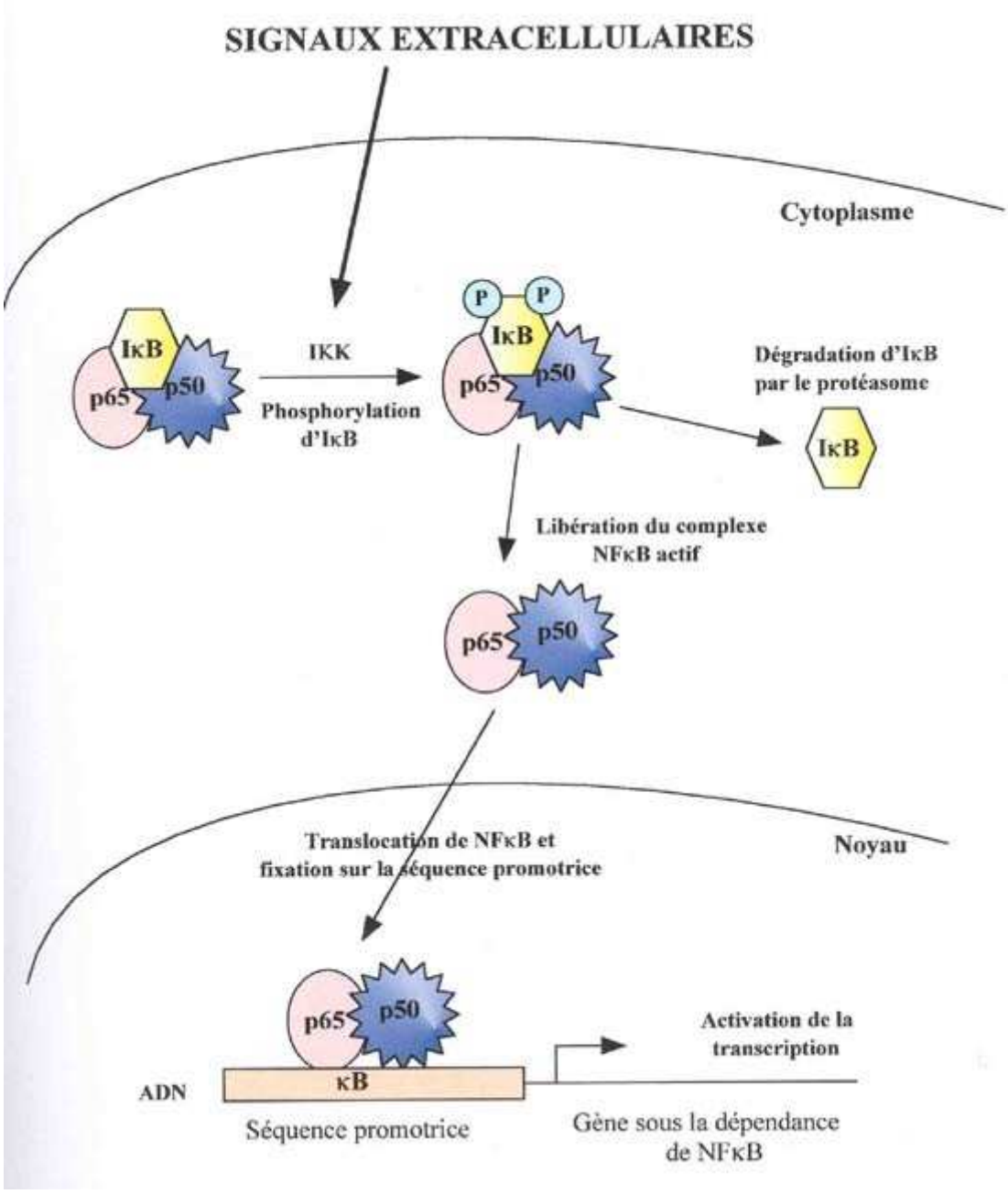
<u>Figure 15</u> : Voie de signalisation des MAPK induite par les EAO.

Une production modérée ou transitoire d'EAO module l'expression des gènes impliqués dans le développement, la différenciation, la croissance, l'inflammation ou la transformation cellulaire. En effet, ces EAO interfèrent avec la voie de signalisation des MAPK en jouant le rôle de second messager et activent certaines protéines kinases (ASK1 pour apoptosis signal-regulating kinase-1, PKC, Ras, Raf, MEK, MKK…) suite à une stimulation de certains facteurs de croissance (EGF, PDGF) ou de certaines cytokines inflammatoires (TNFα, IL-1, IL-3, IL-6) [Modifiée d'après Valko *et al*. 2007].

établie (**Figure 15**) [Buettner *et al*. 2002 ; Srinivasan *et al*. 2008]. Dans ces voies de signalisation, les EAO stimulent également la libération de Ca^{2+}, lequel est à l'origine de seconds messagers en activant les phospholipases A2 et D [Suzuki *et al*. 2000]. Il a d'ailleurs été montré qu'une stimulation d'un récepteur de facteur de croissance tel que celui de l'EGF engendre également la production d'EAO dans les cellules [Peus *et al*. 1998 et 1999].

Un exemple de protéine phosphatase qui est la cible en particulier d'H_2O_2 et la rend inactive, est la lipide phosphatase PTEN ou Phosphatase and tensin homolog [Leslie *et al*. 2003 ; Kwon *et al*. 2004]. Cette phosphatase déphosphoryle le second messager, le PIP3 en PIP2 et inhibe ainsi la voie de signalisation PI3K/AKT qui conduit à la survie des cellules tumorales (cf paragraphe I.6.B). D'autres phosphatases sont aussi la cible des EAO et se retrouvent ainsi inactivées, telles que la protéine phosphatase 2A (PP2A), qui régule la transition G2/M du cycle cellulaire en contrôlant l'activité de la phosphatase cdc25C pour cell division cycle 25 homolog C [Sommer *et al*. 2002].

Les EAO sont également impliquées dans la modulation de l'expression de gènes impliqués à la fois dans la prolifération et la voie de survie des cellules tumorales, en activant certains facteurs de transcription. C'est le cas de l'« Activator-protein-1 » (AP-1) et du « Nuclear Factor-kappa B » (NF-κB), qui sont activés lorsque l'équilibre oxydo-réducteur intracellulaire est plus oxydant. Le complexe AP-1, constitué d'un dimère de protéines oncogéniques de la famille Fos et Jun, se lie à un élément de réponse spécifique situé dans la région promotrice de gènes cibles impliqués dans le contrôle de la prolifération, tel que la cycline D [Ozanne *et al*. 2007]. L'activité de ce complexe dépend de la phosphorylation de c-Jun et de c-Fos par les MAPK et les PKC, mais aussi de l'oxydation par les EAO de cystéines localisées dans le domaine de liaison à l'ADN des oncoprotéines [Xanthoudakis et Curran 1996; Dalton *et al*. 1999]. Cependant, l'activation d'AP-1 par les EAO est régulée par la protéine Ref-1 ou Redox factor-1 [Hsu *et al*. 2000]. NF-κB est composé de protéines qui possèdent un domaine Rel (p50, p65 ou Rel A, c-Rel ou p75, p52 et Rel B), permettant des interactions homo- ou hétéro-dimériques ainsi que des interactions avec des protéines inhibitrices de la famille IκB ou avec l'ADN. En absence de stimulus, les dimères Rel/NF-κB associés à une protéine inhibitrice IκB, sont maintenus sous une forme inactive dans le cytoplasme de nombreux types cellulaires. Lors d'une stimulation par l'EGF par exemple, mais aussi par des stimuli dont la nature peut être très diverse (cytokines pro-inflammatoires,



<u>Figure 16</u> : Représentation du mode d'action du complexe NF-κB dans la transactivation de la transcription de gènes sous sa dépendance, suite à des signaux extracellulaires.

[Illustration de Collot-Texeira 2003]

ultraviolets ou U.V., xénobiotiques), l'activation d'une cascade de kinases aboutit à la phosphorylation de la protéine IκB, qui se détache du complexe Rel/NF-κB, avant d'être dégradée par le protéasome (**Figure 16**). Le complexe Rel/NF-κB est transporté dans le noyau, se fixe à une séquence spécifique de l'ADN et active la transcription de ses gènes cibles impliqués dans la réponse immunitaire ou inflammatoire, mais également dans la survie ou voie de résistance à l'apoptose (ex : IAP-1 pour Inhibiting Apoptosis Protein-1, Bcl-2) [LaCasse *et al*. 1998 ; Kucharczak *et al*. 2003].

Au contraire de AP-1 et de NF-κB, certains facteurs de transcription impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose sont inactivés par les EAO. Le meilleur exemple est le facteur de transcription p53 [Sun et Oberley 1996].

C. Rôle des EAO dans la migration et l'invasion des cellules tumorales

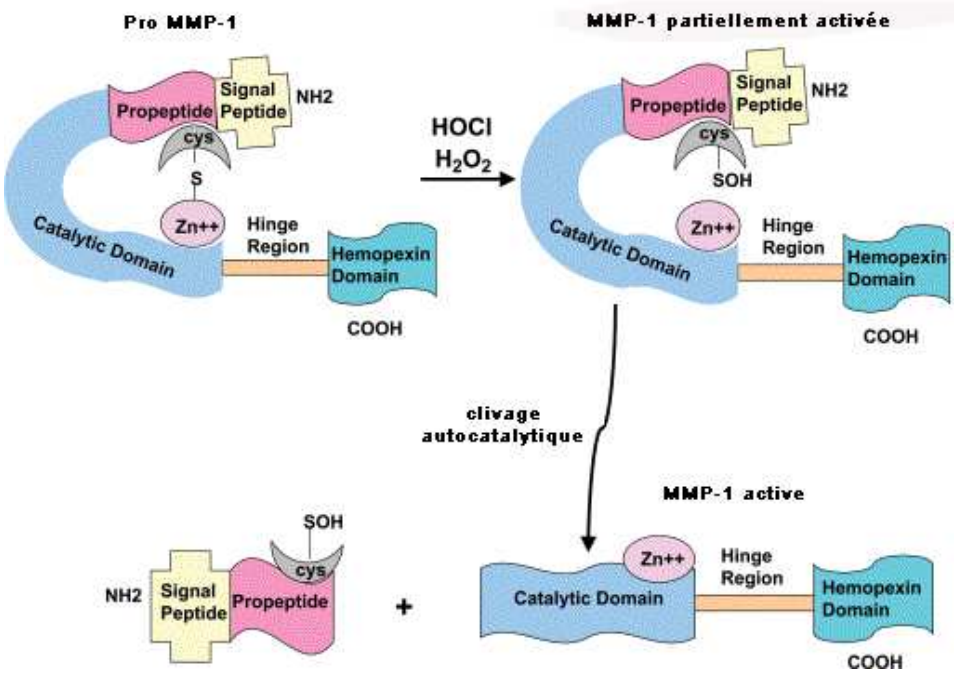
De nombreuses études ont montré que les cellules tumorales métastatiques produisent plus d'EAO que les cellules tumorales non métastatiques, suite à de plus grandes altérations métaboliques. Ceci explique que les enzymes antioxydantes ou toute molécule antioxydante réduit considérablement l'activité métastatique de ces cellules tumorales [Nishikawa *et al*. 2005].

En dehors des protéines kinases, les EAO, en particulier l'H_2O_2, ont également pour cible des enzymes comme les métalloprotéases (MMP), qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire et favorisent la migration des cellules tumorales. C'est le cas des MMP-1 et 2, qui peuvent être directement activées après oxydation par l'H_2O_2 [Nelson et Melendez 2004] (**Figure 17**), ou indirectement *via* la transactivation dépendante de l'EAO et du facteur de transcription AP-1 [Wenk *et al*. 1999 ; Zhang *et al*. 2002].

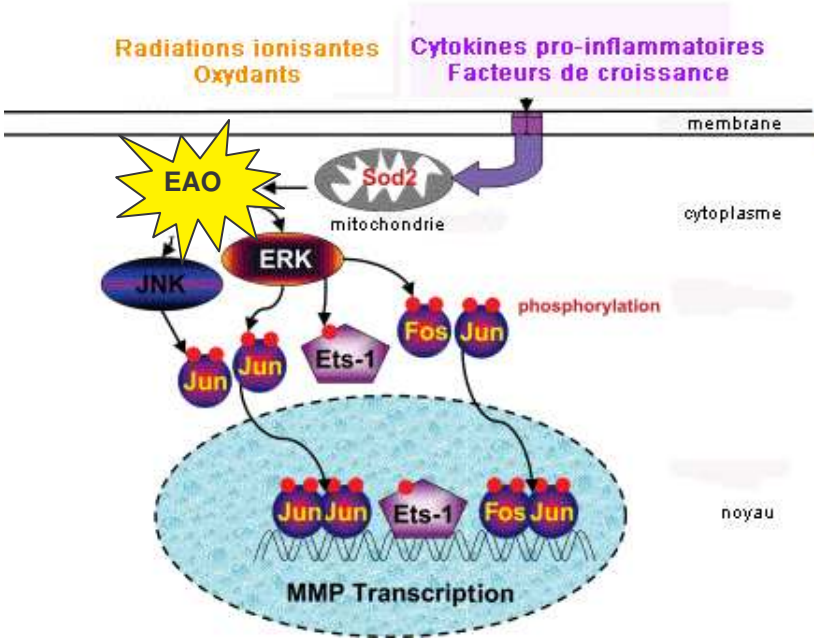
L'activation de NF-κB par les EAO peut conduire à l'induction de l'expression de gènes dont les produits jouent un rôle dans la migration et l'invasion des cellules tumorales (ex : ICAM-1 pour Inter-Cellular Adhesion Molecule-1, VCAM-1 pour Vascular Cell Adhesion Molecular-1 et certaines MMP) [Collins *et al*. 1995 ; Bours *et al*. 2000 ; Baldwin 2001]. La migration et l'adhésion cellulaires sont aussi dépendantes de la fixation des intégrines à la matrice extracellulaire. Récemment, une étude a montré que l'activation des intégrines est liée à une surproduction d'EAO provenant de la NADPH-oxydase, de la 5-lipooxygénase des mitochondries des cellules tumorales [Svineng *et al*. 2008].

De même, il existe un autre facteur de transcription, qui joue un rôle important dans la

A



B



<u>Figure 17</u> : Activation oxydative de la Métalloprotéase-1 (MMP-1) et contrôle redox de la signalisation cellulaire menant à l'activation des MMP.

A : Des oxydants comme l'HOCl ou l'H_2O_2 peuvent oxyder spécifiquement le résidu thiol de la cystéine de la pro MMP-1, rendant celle ci plus sensible aux processus de clivage autocatalytique de son domaine propeptidique. **B** : La transcription des MMP peut être activée par un complexe AP-1 parfait ou imparfait (respectivement constitué du complexe Jun-Jun ou Fos-Jun), d'une façon dépendante des EAO [Modifiée d'après Nelson et Melendez 2004].

migration et l'invasion des cellules tumorales, et qui favorise la formation de métastases. Il s'agit de HIF, ou facteur induit lors d'un épisode hypoxique, qui est également activé dans les cellules tumorales en présence d'H_2O_2 ou par l'activation dépendante des EAO des protéines Src et Ras [Zhong *et al*. 1999 ; Gao *et al*. 2002]. Ce facteur de transcription constitue une famille de facteurs de transcription, HIF-2α, HIF-3α, ARNT2, ARNT3. HIF-1 est prépondérant et existe sous forme d'un hétérodimère HIF-1α et HIF-1β [Semenza 2001]. Ce dernier complexe est transporté dans le noyau et se lie à son élément de réponse spécifique situé dans le promoteur des gènes cibles tel que le VEGF, qui joue un rôle important dans l'angiogenèse tumorale et la dissémination des cellules tumorales métastatiques, mais également des gènes cibles impliqués dans l'adaptation des cellules à une faible teneur en O_2 [Semenza 2001].

D. Rôle des EAO dans l'angiogenèse tumorale

Les cellules tumorales, en produisant des EAO intracellulaires, activent le facteur de transcription HIF, qui active à son tour l'expression du facteur angiogénique, le VEGF. L'addition d'antioxydants dans le milieu de culture de ces cellules tumorales bloque ainsi la synthèse et la sécrétion du VEGF [Grzenkowicz-Wydra *et al*. 2004]. C'est une des voies impliquant les EAO dans l'angiogenèse tumorale. Cependant, il existe également une relation importante entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales à l'origine des néo-vaisseaux tumoraux, qui est dépendante en particulier de l'$O_2°$- [Ushio-Fukai et Nakamura 2008]. Cette relation a particulièrement été mise en évidence dans les carcinomes mammaires [Desouki *et al*. 2005]. Brièvement, le VEGF libéré par les cellules tumorales, qui sont stimulées par des facteurs de croissance comme l'EGF d'origine tumoral, ou encore des cytokines ou des EAO provenant des macrophages infiltrant les tumeurs, agit sur les cellules endothéliales proches par l'intermédiaire de son récepteur de type 2. Cette fixation entraîne une transduction du signal qui est à l'origine de l'induction de l'expression de la NADPH oxydase à la surface des cellules endothéliales. Les EAO libérées par l'activité de cette enzyme membranaire d'origine endothéliale activent les voies de transduction intracellulaire, qui conduisent à la prolifération, la migration et la formation de tubes précurseurs des néo-vaisseaux [Ushio-Fukai et Nakamura 2008]. Souvent, la néo-vascularisation induite par les tumeurs augmente généralement le niveau d'EAO dans les cellules tumorales, suite à la réoxygénation brutale, qui peut conduire à l'activation de NF-kB par les EAO. Ce facteur de transcription conduit les cellules tumorales à exprimer des protéines d'adhésion aux cellules

endothéliales, telles que ICAM-1 et VCAM-1 et à favoriser leur dissémination [Brown et Bicknell 2001].

E. Rôle des défenses antioxydantes dans l'action des EAO sur les voies de signalisation

Selon les types de cancers, les altérations génétiques, accumulées au cours de la transformation des cellules et de la croissance tumorale, conduisent à des polymorphismes génétiques dans la région promotrice ou dans la partie codante des gènes, ainsi qu'à des mécanismes épigénétiques activés dans les cellules tumorales, qui sont à l'origine de déficiences dans l'expression des enzymes antioxydantes, en particulier celles qui éliminent directement les EAO [Hu *et al*. 2005 ; Ravn-Haren *et al*. 2006 ; Cox *et al*. 2006 ; Ahn *et al*. 2006]. Ces déficiences dans les défenses antioxydantes sont également responsables de l'augmentation du niveau des EAO dans les cellules tumorales. Contrairement aux cellules normales qui possèdent une défense équilibrée entre toutes les enzymes antioxydantes, le déséquilibre qui existe dans les cellules tumorales est en partie à l'origine de l'implication des EAO dans l'activation des voies de signalisation conduisant à la prolifération, à la survie ou encore à la migration et l'invasion de ces cellules tumorales. Ce déséquilibre dépend du niveau d'expression entre les superoxydes dismutases et les enzymes éliminant l'H_2O_2. Une accumulation d'$O_2°$- est souvent associée à une déficience dans l'expression des SOD, conduisant préférentiellement à l'activation de protéines kinases impliquées plutôt dans la prolifération, telles que Ras, Raf et les MAPK [Oberley 2005]. Ceci expliquerait que la surexpression de la SOD Cu/Zn dans des gliomes humains entraîne une inhibition de la croissance cellulaire d'environ 42% [Zhang *et al*. 2002c].

Par contre, l'accumulation d'H_2O_2 est souvent associée à une surexpression des SOD et à une déficience dans les enzymes éliminant cette EAO, ce qui entraîne plutôt une activation de la migration et l'invasion des cellules tumorales. En effet l'H_2O_2 active des protéines kinases telles que c-Src et c-Abl et des facteurs de transcription (AP-1 et NF-κB), tandis qu'il inactive des phosphatases comme PTEN [Ridnour *et al*. 2004]. Ainsi, lorsque la GPX est expérimentalement surexprimée, la prolifération des cellules tumorales du pancréas est diminuée d'environ 40% [Liu *et al*. 2004].

Le déséquilibre entre les enzymes antioxydantes varie selon le type de cellules tumorales, comme le rapporte le **Tableau 1**. Des modèles de souris invalidées pour le gène codant Nrf 2 présentent des déficiences dans l'expression d'enzymes antioxydantes et de

Enzymes antioxydantes	Type de cancers	Expression	Références
SOD Cu/Zn	sein	**Elevée**	Punnonen *et al*. 1994
	foie	**Faible**	Liaw *et al*. 1997b
	poumon	**Faible**	Jaruga *et al*. 1994
	Leucémie myéloïde aiguë	**Faible**	Er *et al*. 2007
GPX	sein	**Elevée**	Punnonen *et al*. 1994
	poumon	**Faible**	Coursin et Cihla 1996
	pancréas	**Faible**	Cullen et Kelly 1993
CAT	sein	**Faible**	Punnonen *et al*. 1994
	leucémie	**Elevée**	Marklund *et al*. 1982b
	cellule néoplasique	**Faible**	Marklund *et al*. 1982b
	foie	**Faible**	Sato *et al*. 1992
PRX	thyroïde	**Elevée**	Yanagawa *et al*. 1999
	poumon	**Elevée**	Chang *et al*. 2001
	sein	**Elevée**	Noh *et al*. 2001 Karihtala *et al*. 2003
	poumon	**Elevée**	Park *et al*. 2006
MT	sein	**Elevée**	Fresno *et al*. 1993
GST	cancer en général	**Elevée**	Tew 1994

<u>Tableau 1</u> : Résumé des études sur l'expression des enzymes antioxydantes (SOD Cu/Zn, GPX, CAT, PRX, MT et GST) dans des tumeurs humaines comparées aux cellules normales. Les études ayant porté sur moins de 5 échantillons tumoraux sont exclues.

phase II, et sont ainsi plus sensibles aux carcinogènes, développant plus rapidement des tumeurs que les souris normales [Ramos-Gomez *et al*. 2001 ; Giudice et Montella 2006].

Dans le cas du cancer du sein, la plupart des enzymes antioxydantes sont surexprimées dans les tumeurs mammaires, à l'exception de la catalase (**Tableau 1**). Dans le cas de la catalase, des souris invalidées pour son gène développent de nombreuses tumeurs mammaires spontanées [Ishii *et al*. 1996], soulignant ainsi l'importance de cette enzyme antioxydante contre le développement du cancer. C'est pourquoi, une étude récente révèle qu'une alimentation riche en polyphénols, des antioxydants naturels, contenus principalement dans le vin rouge et dans le thé vert, permet d'inhiber à la fois la croissance et l'invasivité de tumeurs mammaires métastatiques [Thangapazham *et al*. 2007].

De même, l'étude SUVIMAX (SUpplementation en VItamines et Minéraux AntioXydants) [Hercberg *et al*. 2006] conclut que les antioxydants d'origine alimentaire (provenant des fruits et légumes, les polyphénols du thé vert et du vin rouge, le sélénium, etc…) sont importants dans la prévention des cancers [Conklin 2004].

Parmi toutes les enzymes antioxydantes, notre intérêt s'est porté essentiellement sur la superoxyde dismutase à manganèse (SOD Mn), dont l'implication biologique dans le développement du cancer est mal définie et semble dépendre de son niveau d'expression.

III LA SUPEROXYDE DISMUTASE DEPENDANTE DU MANGANESE (SOD Mn OU SOD2)

1. Structure de la SOD Mn

A l'inverse de la SOD Mn des procaryotes qui est dimérique, celle des Mammifères est homotétramérique avec une masse moléculaire de 80 kDa [Hassan 1989]. L'activité de la SOD Mn représente 20% de l'activité totale cellulaire, et peut être inhibée par H_2O_2 et par les peroxynitrites [Grzelak *et al*. 2000]. Dans l'enzyme native, les sous-unités ne sont pas reliées entre elles par un pont disulfure, mais seulement par des liaisons ioniques. Chaque sous-unité d'environ 21 à 23 kDa, contient dans son site catalytique un atome de Mn sous la forme Mn^{3+}. Les ligands du manganèse sont trois chaînes latérales d'histidine, une chaîne latérale d'aspartate et une molécule d'eau ou un ion OH^- suivant l'état d'oxydation du manganèse (respectivement II et III). La SOD Mn est localisée strictement dans la mitochondrie. La structure primaire de chaque sous-unité possède une séquence d'adressage du côté NH_2-terminal, qui assure le transport de la protéine nouvellement synthétisée dans la matrice mitochondriale. Une fois transportée dans la mitochondrie, le peptide signal est finalement clivé par une peptidase de la matrice mitochondriale et les 4 sous-unités s'associent alors pour donner naissance à l'enzyme active [Ryan et Jensen 1995].

2. Structure et régulation du gène de la SOD Mn

A. Structure du gène

La SOD Mn mitochondriale est codée par un gène nucléaire sur le bras court du chromosome 6 (6q25), qui est constitué de 5 exons interrompus par 4 introns. La région proximale du promoteur de ce gène possède une région riche en éléments GC (de –189 à –86 pb du site d'initiation de la transcription), mais pas de boîtes TATA et CAAT [Wan *et al*. 1994]. En dehors de cette région proximale, le promoteur comporte des éléments de réponse

pour différents facteurs de transcription, dont certains sont caractérisés et d'autres restent potentiels [St Clair *et al*. 2002].

B. Régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn

L'expression constitutive ou basale du gène de la SOD Mn dépend essentiellement de sa région proximale. Cette dernière contient une région riche en GC qui renferme essentiellement des sites de fixation 5'-GGGCGG-3' et 5'-GGGCGCGG-3', respectivement pour les facteurs de transcription « Specificity protein 1 » ou Sp1, « Activating protein-2α » ou AP-2α [St Clair *et al*. 2002].

Dans une lignée de cellules d'hépatocarcinomes ou dans des fibroblastes pulmonaires de fœtus humains, il a été montré que le facteur Sp1 agit positivement sur l'expression constitutive de la SOD Mn [Yeh *et al*. 1998 ; Xu *et al*. 2002], alors qu'AP-2α la réprime [Zhu *et al*. 2001]. Cette expression constitutive est également fortement diminuée par le facteur de transcription Egr-1 ou Early growth factor-1, qui interagit avec 4 éléments de réponse spécifiques, chevauchant ceux du facteur de transcription Sp1 (-169 à –96 pb) [Porntadavity *et al*. 2001]. Enfin, des données récentes ont également démontré que la protéine p53 interagit avec Sp1 pour inhiber à la fois l'expression constitutive et induite de la SOD Mn dans des cellules d'hépatocarcinomes [Dhar *et al*. 2006]. Cependant, l'implication exacte de p53 dans ce mécanisme n'est pas encore clairement établie, car ces résultats viennent en contradiction avec la précédente étude, qui révèle la présence d'un élément de réponse (-2032 à -2009 pb) fixant la p53 dans la région promotrice et responsable de l'augmentation de l'expression constitutive du gène de la SOD Mn dans des lignées lymphoblastiques et dans des fibroblastes humains [Hussain *et al*. 2004].

Enfin, il existe des mécanismes épigénétiques qui ont été mis en évidence dans des gliomes de rat et dans des myoblastes de souris, qui sont responsables du maintien d'une expression constitutive faible de la SOD Mn dans les cellules. Une importante méthylation de la région riche en G et C a été mise en évidence, ainsi que la présence d'histones (H3 et H4) dans la partie proximale du promoteur du gène de la SOD [Huang *et al*. 1997 ; Maehara *et al*. 2002].

C. Régulation de l'expression induite de la SOD Mn

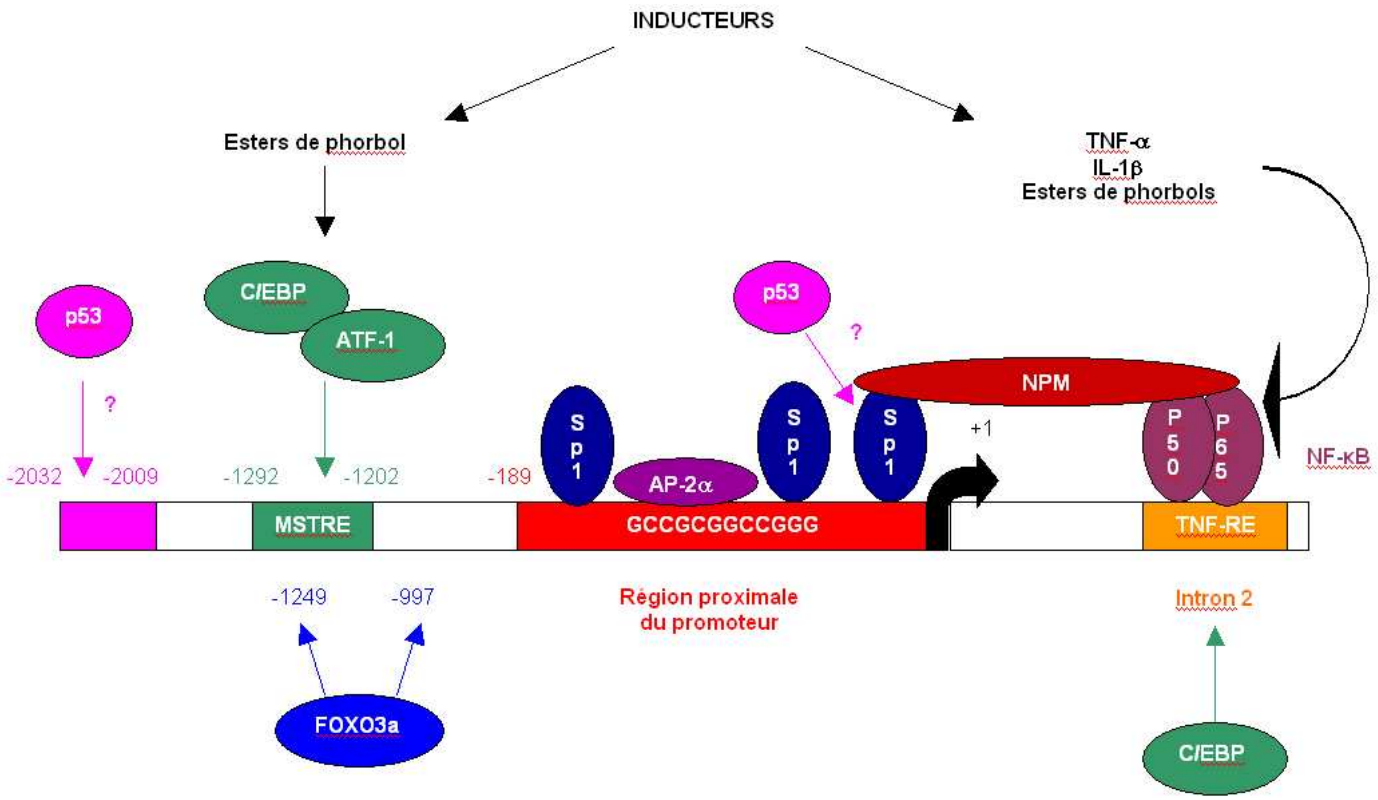
La présence de plusieurs éléments de réponse dans le promoteur, au-delà de sa région proximale, ainsi que dans l'intron 2 du gène de la SOD Mn, fixant différents facteurs de transcription, révèle que le gène de la SOD Mn est inductible par de nombreux agents chimiques ou physiques, quelque soit le type cellulaire [Wan *et al.* 1994 ; St Clair *et al.* 2002], tels que :

- des cytokines (interféron γ, TNFα ou IL-1β) [Masuda *et al*. 1988 ; Harris *et al.* 1991 ; Tsan *et al*. 1991 ; Tsan *et al*. 1992],
- les radiations ionisantes et les ultraviolets A [St Clair *et al*. 1992 ; Suresh *et al*. 1994 ; Poswig *et al*. 1999],
- les esters de phorbol [Kim *et al*. 1999 ; Porntadavity *et al*. 2001 ; Tanaka *et al*. 2000],
- les générateurs d'EAO intracellulaires, comme le paraquat, les épisodes d'hypoxie/hyperoxie ou les molécules anticancéreuses [St Clair *et al*. 1991 ; Negoro *et al*. 2001 ; Gogun *et al*. 1990 ; Doroshow *et al*. 1991 ; Mäntymaa *et al*. 2000],
- l'acide arachidonique [Bianchi *et al*. 2002].

Parmi les éléments de réponse bien caractérisés, le « Manganese Superoxide TPA Response Element » (MSTRE), situé entre -1292 et -1202 pb du site d'initiation de la transcription, et sur lequel se fixent les protéines CREB/ATF-1, est responsable de l'induction du gène de la SOD Mn par les esters de phorbol dans des cellules d'adénocarcinomes pulmonaires humains [Kim *et al*. 1999].

Deux autres régions situées vers –1249 et –997 pb interagissent avec le « Forkhead transcription factor 3a » ou FOXO3a dans la région promotrice du gène de la SOD Mn. Ce facteur de transcription participe à la protection des cellules quiescentes humaines contre le stress oxydant en régulant l'expression de la SOD Mn [Kops *et al*. 2002]. De plus, des travaux réalisés dans des cellules musculaires lisses de rat, ont démontré que la phosphorylation de FOXO3a engendrée par Akt, est capable de moduler l'expression du gène de la SOD Mn, en fonction de l'âge du rat [Li *et al*. 2006b].

En dehors de la région promotrice, il existe une région située dans le deuxième intron du gène *SOD2,* mise en évidence chez la souris et chez l'humain, appelée TNF-RE ou « Tumor Necrosis Factor Response Element », contenant un élément de réponse -κB sur



<u>Figure 18</u> : Localisation sur le promoteur du gène de la SOD Mn des sites de fixation des facteurs de transcription régulant l'expression constitutive (Sp1, AP-2α) ou induite par diverses substances (TNFα, IL-1β, esters de phorbols) de la SOD Mn.

(Voir texte détaillé paragraphe III.2.C)

laquelle se fixe le facteur de transcription NF-κB, sous la forme d'un hétérodimère p50/p65 et p50/RelB [Josson *et al*. 2006], et qui est responsable de l'induction du gène de la SOD Mn par l'IL-1β, le TNFα ou encore les esters de phorbol [Xu *et al*. 1999a; Darville *et al*. 2000; Bernard *et al*. 2001; Guo *et al*. 2003b] (**Figure 18**). Une étude menée dans des fibroblastes modifiés a permis de préciser que l'activation de NF-κB par ces esters de phorbol est possible grâce à une inhibition de la synthèse de IκBα (Inhibitory κBα). Les esters de phorbol sont capables d'activer la protéine kinase C (PKC), qui elle phosphoryle IκBα, entrainant ainsi sa dégradation [Kiningham *et al*. 2004].

L'activation du facteur de transcription NF-κB est essentielle mais insuffisante dans l'induction du gène *SOD2* par les cytokines, car le TNF-RE contient également un site de fixation pour C/EBP ou CAAT-enhancer binding protein [Maehara *et al*. 1999 ; Ranjan et Boss 2006]. Cependant, l'intervention d'une protéine co-activatrice, appelée Nucléophosmine (NPM) de NF-κB a été mise en évidence dans des fibroblastes transformés [Dhar *et al.* 2004]. Cette protéine assure le lien entre NF-κB fixé sur le TNF-RE et Sp1 présent sur un de ses sites de fixation dans la partie proximale du promoteur du gène de la SOD Mn, en interagissant avec une séquence répétée de 11 guanines dans la région riche en GC de la partie proximale du promoteur du gène de la SOD Mn [Xu *et al*. 2007]. La même équipe rapporte également que la p53, qui est présente dans le complexe Sp1/NPM/NF-kB, est susceptible de s'opposer à l'induction du gène de la SOD Mn dans des cellules d'hépatocarcinomes humains exposées à des cytokines, en interagissant physiquement avec Sp1 [Dhar *et al*. 2006].

D. Régulation post-transcriptionnelle de la SOD Mn

Il existe également une régulation post-transcriptionnelle de la SOD Mn mise en évidence chez le rat, qui se caractérise par la fixation dans la région 3' non codante, d'une protéine cytosolique de 90 kDa appelée MnSOD-BP pour SOD Mn Binding Protein, et qui augmente ainsi la traduction de l'ARNm codant l'enzyme antioxydante [Knirsch et Clerch 2000]. Cette protéine est produite lors d'un stress oxydant et est activée à la suite d'une déphosphorylation d'une tyrosine [Knirsch et Clerch 2001].

Dans toutes les cellules, deux ARNm codant la SOD Mn sont produits avec des tailles respectives de 1 et 4 kb, car il existe deux sites de polyadénylation dans la région 3' non traduite [Hurt *et al*. 1992]. Chez le rat, la demi-vie de ces ARNm est de 4,2 heures et dépend de la présence d'une séquence d'environ 280 nucléotides située dans la région codante, dont

le rôle serait d'accélérer la synthèse *de novo* de l'enzyme [Davis *et al*. 2001]. Cette régulation post-transcriptionnelle expliquerait ainsi l'augmentation rapide du taux d'ARNm sous l'influence des divers stimuli cités précédemment, et un retour au taux basal en quelques heures.

E. Les voies de transduction responsables de la régulation de l'expression de la SOD Mn

Les voies de transduction activées par les inducteurs de l'expression du gène *SOD2* ne sont pas toutes élucidées. En présence d'esters de phorbol ou de molécules anti-cancéreuses, l'induction dépend dans les cellules tumorales de l'activation de la protéine Kinase C (PKC) [Das *et al*. 1998]. Au laboratoire, il a été montré qu'en présence d'acide arachidonique, l'induction de la SOD Mn observée dans des hépatocarcinomes, implique également l'activation de la PKC, mais aussi de la p38 MAPK, et ceci *via* la génération d'EAO intracellulaires provenant du métabolisme de l'acide gras [Bianchi *et al*. 2002]. En effet, les EAO jouent le rôle de seconds messagers dans la régulation de l'expression de la SOD Mn [Warner *et al*. 1996], notamment lors de l'induction du gène *SOD2* par le TNFα dans des cellules humaines de carcinomes oraux [Liu *et al*. 2000a]. Par contre, selon la cytokine induisant le gène de la SOD Mn, le mode d'action peut être différent. Ainsi, l'induction de l'expression de la SOD Mn par l'IL-1β est dépendante de NF-κB, qui n'est pas activé d'une façon dépendante des EAO [Rogers *et al*. 2001]. De même, dans les cellules mésengiales et les astrocytes de rat, le céramide est le second messager qui est impliqué dans la transduction du signal des cytokines pro-inflammatoires, conduisant à l'induction de l'expression de la SOD Mn [Pahan *et al*. 1999]. En conséquence, les voies de transduction du signal conduisant à l'induction du gène de la SOD Mn semblent donc dépendre de la nature de l'inducteur mais aussi du type cellulaire.

3. Rôles biologiques de la SOD Mn dans les cellules

Depuis la découverte de la SOD Mn [Keele *et al*. 1970], un très grand nombre d'articles ont été publiés sur l'implication biologique à la fois de l'$O_2^{\circ-}$ et de cette enzyme antioxydante, dans un large spectre de pathologies. La SOD Mn est indispensable dans les cellules eucaryotes. En effet, des souris invalidées pour le gène *SOD2* meurent rapidement à

la naissance soit de cardiomyopathies, soit de troubles neurodégénératifs, selon les antécédents génétiques de l'animal [Lebovitz *et al*. 1996].

Elle représente la première ligne de défense de la cellule, car elle élimine l'$O_2°$-, principalement formé dans le compartiment mitochondrial, en catalysant sa dismutation en H_2O et H_2O_2, selon la réaction suivante :

$$2O_2°- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

L'enzyme joue ainsi un rôle anti-apoptotique car l'élimination de l'$O_2°$- de la mitochondrie est associée à la transformation de l'H_2O_2 en eau par la GPX et/ou la PRX III mitochondriale, diminuant la libération du cytochrome c dans le cytosol et empêchant ainsi l'activation de la caspase 9 et le clivage de la PARP par la caspase 3. De plus, la surexpression *in vitro* de la SOD Mn protège les cellules de l'apoptose induite par les cytokines pro-inflammatoires [Kiningham *et al*. 1999 ; Noshita *et al*. 2001]. Ainsi, la SOD Mn joue un rôle protecteur contre les maladies inflammatoires, notamment en protégeant les cellules exposées aux cytokines pro-inflammatoires [Salin et McCord 1975 ; Babior *et al*. 1973]. Elle protège également contre les effets d'un épisode d'hypoxie ou d'hyperoxie [McCord 1985], à l'origine d'une surproduction d'$O_2^{°-}$ au sein de la chaîne mitochondriale des cellules du poumon [Wispe *et al*. 1992] ou du cerveau [Keller *et al*. 1998]. La SOD Mn, associée à d'autres enzymes éliminant l'H_2O_2, intervient aussi dans la survie des neurones, en éliminant les EAO qui sont impliquées en partie dans certaines maladies neurodégénératives comme Alzheimer, Parkinson et Huntington [Galeotti *et al*. 2005] ou même dans le diabète [Maritim *et al*. 2003]. Enfin, l'un des derniers rôles biologiques de la SOD Mn largement étudié, est son implication dans le développement des tumeurs [St Clair *et al*. 1994].

4. Rôle de la SOD Mn dans le cancer

Plusieurs observations dans la littérature révèlent l'existence d'une relation étroite entre l'expression constitutive du gène de la SOD Mn et le développement du cancer [Oberley 2001]. La SOD Mn est l'une des enzymes antioxydantes, dont la régulation de l'expression du gène est fortement modifiée au cours de la transformation d'une cellule normale, de la croissance tumorale, ou encore de l'acquisition de la résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis des substances anticancéreuses.

A. Expression de la SOD Mn dans les cellules tumorales

L'expression constitutive de la SOD Mn augmente au cours du développement embryonnaire, et dans les cellules qui se différencient [St Clair *et al*. 1994]. Cependant, cette expression diminue au cours de la transformation des cellules normales en cellules tumorales [Borrello *et al*. 1993 ; Oberley 2001]. Cette expression évolue ensuite selon l'origine et le grade de la tumeur.

Il a été observé, à la fois *in vitro* et *in vivo*, que la SOD Mn est faiblement exprimée dans les cellules tumorales de mélanomes, de fibrosarcomes, de gliomes, de la prostate, du pancréas et du foie [Church *et al*. 1993; Aida *et al*. 1994; Safford *et al*. 1994; St Clair *et al*. 1992; Zhong *et al*. 1997; Li *et al*. 1998; Weydert *et al*. 2003], ainsi que dans les leucémies [Kato *et al*. 2003].

Cependant, d'autres études rapportent que l'expression de la SOD Mn est augmentée dans d'autres types de cellules tumorales *in vitro*, et en fonction du grade de la tumeur *in vivo*. Cette expression élevée de l'enzyme antioxydante est associée avec les capacités invasives *in vitro* et *in vivo*, et donc la malignité des cellules cancéreuses, et correspondrait à un mécanisme protecteur développé par les cellules tumorales diminuant l'efficacité des traitements anticancéreux. C'est généralement le cas pour les carcinomes oesophagiens, gastriques, colorectaux et pulmonaires [Izutani *et al*. 1996 et 1998 ; Janssen *et al*. 1998 ; Toh *et al*. 2000 ; Chung-man Ho *et al*. 2001 ; Korenaga *et al*. 2003], pour les cancers de l'ovaire, de la thyroïde, pour des mésothéliomes, ou encore des tumeurs d'origine neuroépithéliale [Nakata *et al*. 1992; Nishida *et al*. 1993; Cobbs *et al*. 1996 ; Kinnula *et al*. 1996 ; Landriscina *et al*. 1996 ; Kahlos *et al*. 1998 et 2000; Ria *et al*. 2001], ainsi que dans les cellules métastatiques du foie [Skrzycki *et al*. 2008].

B. Régulation de l'expression de la SOD Mn dans les cellules tumorales

Dans les cas où l'activité de la SOD Mn est plus faible dans les cellules tumorales que dans les cellules normales, il s'agit plutôt d'un défaut de transport de la pro-protéine dans la mitochondrie ou encore de l'expression de son gène que d'une modification de la structure primaire de la protéine, ou d'une diminution de la stabilité de l'ARNm de la SOD Mn [St Clair et Holland 1991]. Le mécanisme apparaît différent selon le type de cellules tumorales.

Il a été montré qu'une perte d'hétérozygotie sur le bras long du chromosome 6, touchant le locus du gène *SOD2* est responsable de l'expression très faible de la SOD Mn dans les mélanomes malins humains [Millikin *et al*. 1991].

Un polymorphisme génétique peut également être à l'origine d'une activité faible de la SOD Mn dans certaines cellules tumorales. Ce polymorphisme du gène *SOD2* est une substitution d'une thymine à la place d'une cytosine dans la partie codante du gène, qui fait apparaître au codon 16 une valine à la place d'une alanine (C1183T, exon 2) dans le peptide signal. Cette mutation transforme la conformation en hélice α native de la séquence signal de localisation mitochondriale de la protéine, en feuillet β [Shimoda-Matsubayashi *et al*. 1996]. La conséquence observée est une concentration intra-mitochondriale diminuée de l'enzyme antioxydante et donc une diminution de son activité dans la cellule tumorale, mais pas de son expression [Lemire *et al*. 1989 ; Sutton *et al*. 2003] Ce polymorphisme Ala-16Val a été révélé au sein de populations à risque vis-à-vis du cancer du sein, du poumon, du colon ou de la prostate [Ambrosone *et al*. 1999; Mitrunen *et al*. 2001; Wang *et al*. 2001; Stoehlmacher *et al*. 2002 ; Arsova-Sarafinovska *et al*. 2008].

D'autres auteurs montrent que le niveau faible d'expression de la SOD Mn observé dans certaines cellules tumorales dépend de la régulation négative de l'expression constitutive de son gène par le facteur de transcription AP-2α. Ce dernier est essentiellement exprimé dans les cellules transformées ou cancéreuses, et se fixe dans la région proximale riche en GC du promoteur, en interagissant avec et en inhibant l'activité de Sp1, qui est un facteur de transcription régulant plutôt positivement l'expression de ce gène [Yeh *et al*. 1998 ; St. Clair *et al*. 2002; Xu *et al*. 2002]. De plus, des mutations mises en évidence dans la région proximale du promoteur font apparaître de nouveau sites de fixation au facteur de transcription AP-2α dans plusieurs lignées de cellules tumorales d'adénocarcinomes coliques, de glioblastomes et de fibrosarcomes [Xu *et al*. 1999b].

Le dernier mécanisme connu et responsable d'une expression faible de la SOD Mn dans certaines cellules tumorales serait d'origine épigénétique. Il a été montré récemment qu'une hyperméthylation dans la région riche en GC du promoteur proximal du gène de la SOD Mn est responsable d'une faible expression de la SOD Mn dans des cellules humaines transformées [Huang *et al*. 1999] ou tumorales de myélomes ou pancréatiques [Hodge *et al*. 2005 ; Hurt *et al*. 2007].

Si plusieurs mécanismes moléculaires expliquent l'expression constitutive faible dans certaines cellules tumorales, il n'en existe aucun réellement décrit pour l'expression élevée. Aucune amplification du gène n'a été révélée à ce jour dans les cellules tumorales. Il est

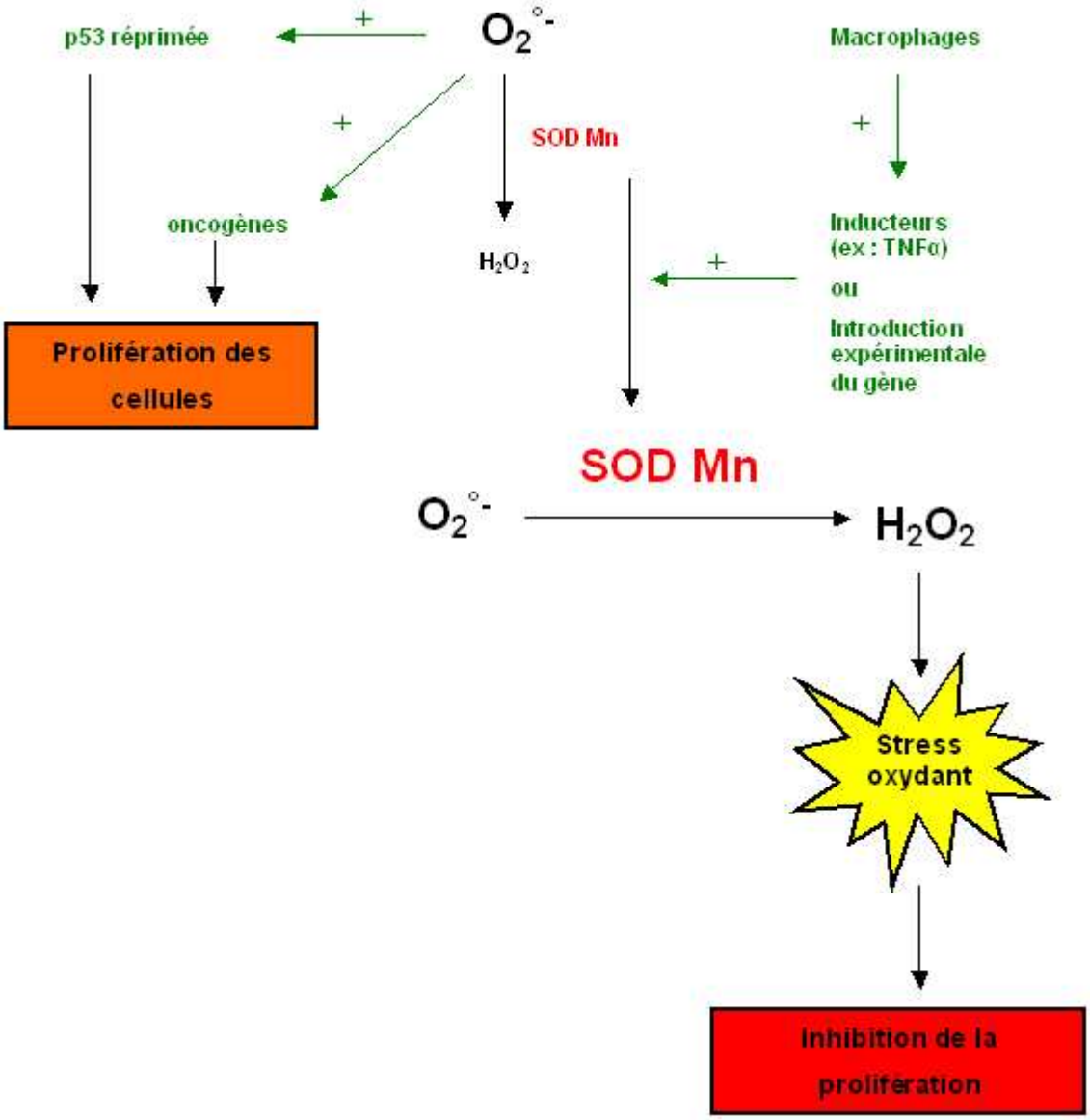
seulement observé une corrélation entre le niveau d'infiltration des tumeurs par des macrophages et le niveau d'expression de la SOD Mn dans les cellules cancéreuses. Dans le cas des adénocarcinomes pulmonaires, l'exposition des cellules tumorales à des cytokines, comme l'IL1α et le TNFα, sécrétées par les macrophages infiltrant spécifiquement les tumeurs, induirait l'expression de leur gène codant la SOD Mn *via* l'activation de NF-κB [Chung-man Ho *et al*. 2001].

C. Rôle de la SOD Mn dans la prolifération des cellules tumorales

Le rôle de la SOD Mn dans la carcinogenèse et dans la croissance tumorale dépend essentiellement de l'action décrite précédemment de l'$O_2°$- et de l'H_2O_2, dont elle contrôle le niveau intracellulaire, mais également d'un déséquilibre entre son expression et celle des autres enzymes antioxydantes principales telles que catalase, GPX et PRX [Ridnour *et al*. 2004].

Une expression constitutive faible a pour conséquence une accumulation d'$O_2°$-, une EAO qui agit comme un second messager dans les cellules tumorales, en activant l'oncoprotéine Ras et en inhibant l'activité de la protéine p53 [Yang *et al*. 1999 ; Oberley 2005], comme il a été montré dans les fibroblastes transformés [Irani *et al*. 1997], dans les cellules tumorales mammaires [Li *et al*. 1995] et ovariennes [Hu *et al*. 2005]. L'élimination de l'$O_2°$- en surexprimant la SOD Mn par introduction expérimentale de son gène, entraîne ainsi une inhibition de croissance de ces cellules tumorales, conduisant ainsi certains auteurs à considérer l'enzyme antioxydante comme suppresseur de tumeur [Bravard *et al*. 1992]. Plusieurs études montrent que la surexpression de la SOD Mn entraîne une inhibition de la croissance de fibroblastes immortalisés [Yan *et al*. 1996] et de diverses cellules tumorales [Church *et al*. 1993; Safford *et al*. 1994; Zhong *et al*. 1997; Li *et al*. 1998; Cullen *et al*. 2003; Weydert *et al*. 2003; Ough *et al*. 2004].

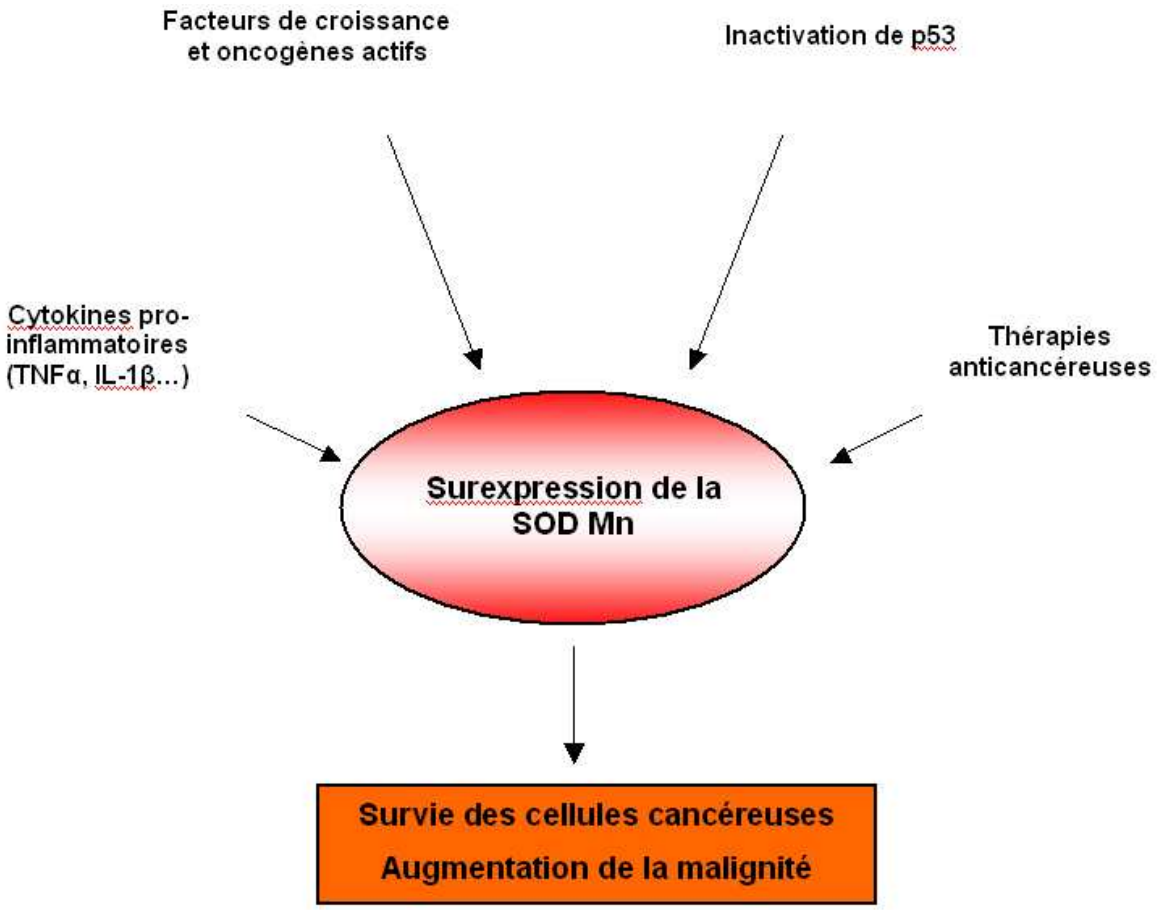
Cependant, l'accumulation d'H_2O_2 engendrée par la surexpression de la SOD Mn dans ces lignées tumorales est également responsable de l'inhibition de leur croissance. Cette accumulation est accentuée par le fait que les enzymes antioxydantes l'éliminant ne sont pas induites dans ces conditions [Ridnour *et al*. 2004]. Ceci a particulièrement été montré dans les cellules d'adénocarcinomes de la prostate [Li *et al*. 1999 ; Venkataraman *et al*. 2005]. L'importance de l'H_2O_2 dans l'action inhibitrice de la SOD Mn sur la tumorigenèse est démontrée par le travail de l'équipe d'Oberley, qui a observé que l'introduction conjointe du gène codant la SOD mitochondriale et celui de la GPX n'a aucun effet sur la croissance de



<u>Figure 19 :</u> Mécanismes moléculaires mis en jeu dans les cellules tumorales ayant une faible expression de la SOD Mn.

cellules de gliomes humains [Li *et al*. 2000]. L'H_2O_2 peut affecter le fonctionnement des mitochondries [Kim *et al*. 2001], mais également moduler à la fois l'activité des facteurs de transcription sensibles aux EAO et la transduction de signaux spécifiques [Kiningham et St Clair 1997 ; Manna *et al*. 1998]. Certains auteurs ont montré que l'H_2O_2 libéré par l'activité de la SOD Mn surexprimée peut induire l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs, comme la Maspin dans les cellules tumorales de la prostate [Duan *et al*. 2003], mais également inactiver la protéine c-Jun dans les cellules de fibrosarcomes [Kiningham et St Clair 1997] ou la protéine kinase de la partie N-terminale de c-Jun (JNK) dans un modèle de carcinogenèse de la peau [Zhao *et al*. 2001 ; St Clair *et al*. 2005], conduisant à l'absence d'activation du complexe AP-1, dont on connaît le rôle dans la prolifération cellulaire. Il semble également que l'H_2O_2 soit capable de diminuer le pouvoir invasif et métastatique de certaines cellules tumorales, comme les cellules de fibrosarcomes, qui lorsqu'elles surexpriment la SOD Mn, expriment significativement une protéine d'adhésion comme la fibronectine [Kiningham et St Clair *et al*. 1997].

Certaines cellules tumorales ont une expression naturelle de la SOD Mn plus élevée que les cellules normales de la même origine tissulaire, et qui est associée avec leur degré de malignité (cf paragraphe III.4.A). Cette expression constitutive forte a pour conséquence une accumulation d'H_2O_2, une EAO qui agit également comme second messager dans les cellules tumorales, en activant directement les protéines kinases activées par les mitogènes, comme ERK 1 et 2, ainsi que des facteurs de transcription comme AP-1 et NF-κB [Nelson et Melendez 2004]. Cependant, l'activation par H_2O_2 n'est pas aussi efficace sur la prolifération que celle activée par l'$O_2°$-, ce qui expliquerait que les cellules tumorales surexprimant la SOD Mn prolifèrent moins rapidement que celles ayant une expression constitutive faible de l'enzyme antioxydante. Cette observation a été rapportée dans les cellules de mésothéliomes [Kahlos *et al*. 1999] et dans les cellules tumorales ovariennes *in vitro* et *in vivo* [Hu *et al*. 2005]. Dans cette dernière étude, les auteurs démontrent qu'une lignée de cellules tumorales de l'ovaire, ayant une expression constitutive élevée de la SOD Mn, inhibée par ARN interférence, acquiert une croissance accélérée à la fois *in vitro* et *in vivo* chez la souris. Enfin, il semble également que les macrophages infiltrant les tumeurs, qui comme nous l'avons vu dans le paragraphe III.4.B, induisent l'expression de la SOD Mn, sont donc susceptibles de contribuer à la croissance tumorale [Pani *et al*. 2004 ; Kinnula et Crapo 2004]. Ces données récentes suggèrent que la SOD Mn ne serait pas un suppresseur de tumeur dans toutes les cellules.



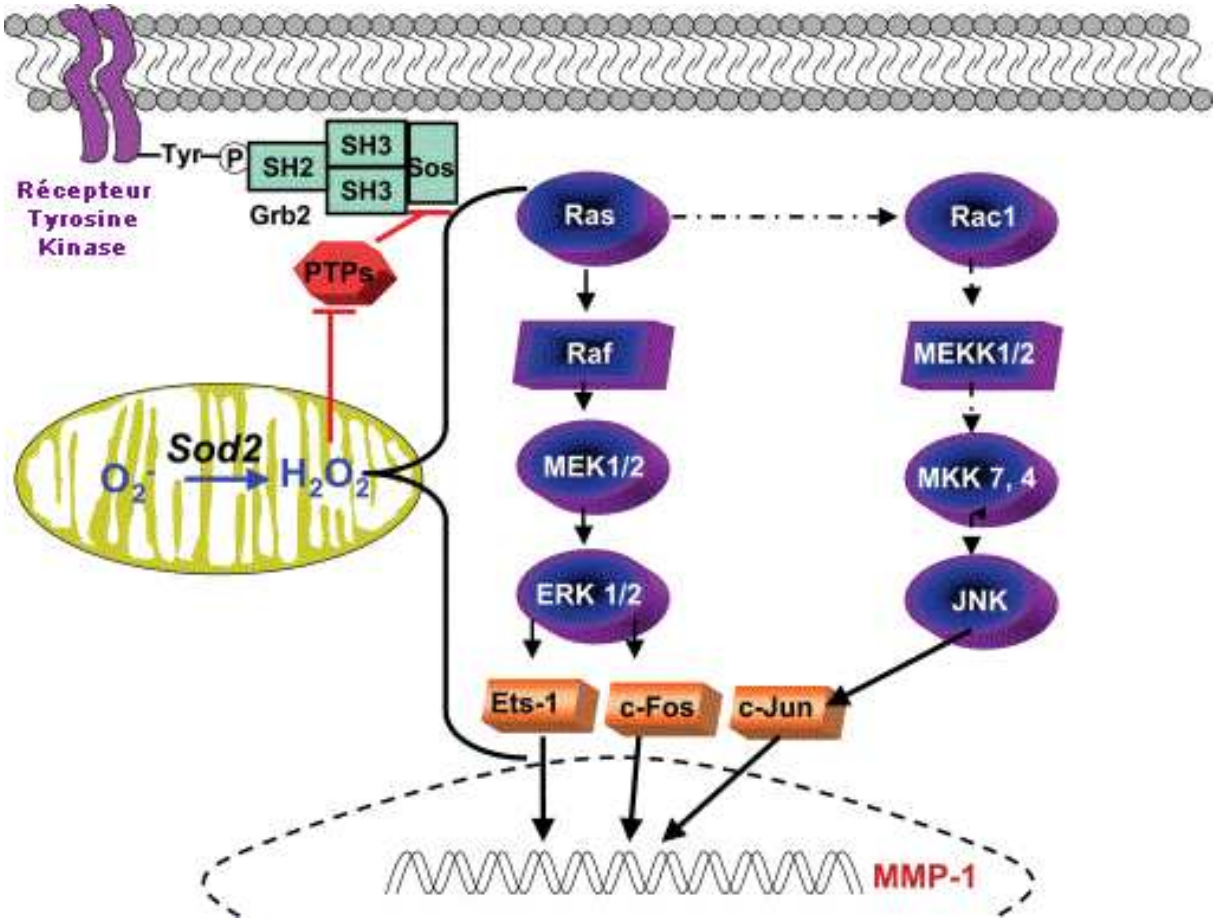
<u>Figure 20</u> : Mécanismes possibles conduisant à une expression basale élevée de la SOD Mn dans certaines cellules cancéreuses.

[Modifiée d'après Pani *et al*. 2004]

Cette différence observée suggère l'existence de voies de transduction et de régulation distinctes selon la nature des lignées de cellules tumorales. Lorsque la SOD Mn est surexprimée par transfection dans les cellules tumorales, la croissance cellulaire est inhibée du fait d'une production excessive d'H_2O_2, qui affecte le fonctionnement des mitochondries [Kim *et al*. 2001]. L'expression basale faible du gène de la SOD Mn dans les cellules tumorales suggère donc que l'$O_2°$- participerait aux signaux favorisant leur prolifération (**Figure 19**). Les mécanismes mis en évidence dans les cellules tumorales présentant une expression basale élevée de la SOD Mn sont, soit un contrôle mutuel entre le taux de cette enzyme et celui de la protéine pro-apoptotique p53, soit la stimulation du gène de l'enzyme par des cytokines inflammatoires sécrétées par les phagocytes infiltrant les tumeurs [Pani *et al*. 2004] (**Figure 20**).

D. Rôle de la SOD Mn dans l'invasion tumorale

Quelques études rapportent que l'expression de la SOD Mn est augmentée dans certains cancers en fonction du grade de la tumeur, ce qui correspondrait à un mécanisme protecteur développé par les cellules tumorales diminuant l'efficacité des traitements anticancéreux. C'est le cas pour certains carcinomes oesophagiens et gastriques [Izutani *et al*. 1998 ; Korenaga *et al*. 2003], pour les cancers de l'ovaire, de la thyroïde, du colon, pour des mésothéliomes, ou encore des tumeurs d'origine neuroépithéliale [Nakata *et al*. 1992; Nishida *et al*. 1993; Janssen *et al*. 1998; Kahlos *et al*. 1998; Toh *et al*. 2000b ; Ria *et al*. 2001], dont la capacité invasive des cellules cancéreuses est ainsi augmentée lors d'une expression élevée de la SOD Mn. Ces résultats sont associés à ceux obtenus *in vitro*, qui montrent qu'une surexpression de la SOD Mn, après transfection de son gène, entraîne une production accrue d'H_2O_2. Ce dernier est responsable, *via* l'activation de voies de signalisation et/ou de facteurs de transcription comme AP-1, d'une induction de l'expression des enzymes de dégradation (MMP 1 et 2) ou de protéines constitutives de la matrice extracellulaire dans des lignées cancéreuses, dont le pouvoir invasif est ainsi augmenté (**Figure 21**) [Wenk *et al*. 1999; Ranganathan *et al*. 2001 ; Zhang *et al*. 2002b ; Nelson *et al*. 2003]. Cette action est atténuée lorsque le gène de la SOD Mn est co-transfecté avec celui codant la catalase [Nelson *et al*. 2003 ; Connor *et al*. 2007].



<u>Figure 21</u> : Rôle possible de la SOD Mn dans l'invasion tumorale.

La SOD Mn (sod2) est impliquée dans le contrôle de la transcription de la MMP-1, et intervient ainsi dans le contrôle du pouvoir invasif de certaines cellules tumorales. L'H_2O_2 intracellulaire produit lors d'une surexpression de la SOD Mn, est capable à la fois d'activer la voie de signalisation des MAP Kinases, *via* l'activation de la protéine Ras, et d'inactiver les protéines tyrosine phosphatases (PTPs). Cette voie de signalisation conduit à l'activation d'AP-1 (représenté ici par c-Jun et c-Fos) et d'Ets-1 (E twenty-six), d'importants facteurs de transcription qui régulent l'expression des MMP. L'augmentation de la transcription de la MMP-1 favorise l'invasion de la matrice extracellulaire par les cellules tumorales [Modifiée d'après Nelson et Melendez 2004].

E. Rôle de la SOD Mn dans l'angiogenèse tumorale

Le mécanisme par lequel la SOD Mn joue un rôle dans l'angiogenèse tumorale, dépend des EAO intracellulaires produites. Le développement des tumeurs nécessite un apport important en O_2 et en nutriments, qui est possible par une stimulation d'une néo-angiogenèse. Une expression faible de la SOD Mn favorise une accumulation d'$O_2°$-, qui entraîne une activation du facteur de transcription HIF dans les cellules tumorales. Ce dernier active en particulier l'expression du facteur angiogénique VEGF, qui stimule la formation de néo-vaisseaux tumoraux à partir des cellules endothéliales [Ushio-Fukai et Nakamura 2008]. Lorsque l'expression de la SOD Mn est augmentée, la diminution d'$O_2°$- intracellulaire empêche l'activation de HIF-1α et donc l'expression du VEGF, comme cela a été démontré dans les cellules tumorales mammaires MCF-7 [Wang *et al*. 2005 ; Kaewpila *et al*. 2008]. Cependant, une étude révèle qu'une accumulation d'H_2O_2 intramitochondrial, suite à une expression forte de la SOD Mn dans les cellules tumorales, stimule la néo-vascularisation à partir des cellules endothéliales [Connor *et al*. 2005].

F. Rôle de la SOD Mn dans la résistance aux traitements anticancéreux

Beaucoup de molécules utilisées en chimiothérapie anti-cancéreuse telles que les anthracyclines, les sels de platine, la mitomycine C, la bléomycine, l'étoposide et les agents alkylants, sont à l'origine d'EAO cytotoxiques pour les cellules tumorales [Masuda *et al*. 1994]. Cependant, selon les types de cellules tumorales, ces molécules ainsi que celles ayant pour cible le fuseau mitotique ou la topoisomérase II induisent fortement l'expression de la SOD Mn [Gogun *et al*. 1990; Doroshow *et al*. 1991; Kinnula *et al*. 1998; Mäntymaa *et al*. 2000], et ce de manière souvent dépendante de l'activation de la protéine kinase C [Das *et al.* 1998]. Cette surexpression du gène de la SOD Mn est à l'origine de l'apparition d'un phénotype résistant dans ces cellules tumorales. C'est le cas des cellules de carcinomes oesophagiens et gastriques, de mélanomes ou de lymphomes, qui surexpriment naturellement la SOD Mn et qui présentent ainsi une moins grande sensibilité aux molécules anticancéreuses que d'autres types de cellules tumorales [Izutani *et al*. 2002 ; Murley *et al*. 2002; Suresh *et al*. 2003 ; Martin *et al*. 2007]. De plus, l'introduction expérimentale du gène de l'enzyme antioxydante confère une résistance aux cellules vis-à-vis de molécules anticancéreuses, telles que la doxorubicine et la mitomycine C [Hirose *et al*. 1993 ; Suresh *et al*. 2003]. Enfin, le

polymorphisme génétique Ala/Val, responsable d'une variation dans l'activité totale de la SOD Mn dans les cellules tumorales peut conduire à des réponses aux traitements anticancéreux différentes selon les populations de patients [Koistinen *et al*. 2006].

Les radiations ionisantes utilisées couramment en radiothérapie anticancéreuse agissent également en présence d'O_2 en produisant des $O_2°$-, qui peuvent induire de surcroît le gène de la SOD Mn, comme dans les cellules d'ostéosarcome [Lee *et al*. 2004 ; Ogawa *et al*. 2004], d'une manière pouvant dépendre de la phosphorylation de la protéine ERK1/2 [Yeung *et al*. 2008]. De même, l'expression élevée de la SOD Mn par transfection de son ADNc protège différentes lignées de cellules tumorales vis-à-vis de la cytotoxicité des radiations ionisantes [St Clair *et al*. 1992; Hirose *et al*. 1993; Suresh *et al*. 1994; Urano *et al*. 1995; Motoori *et al*. 2001; Takada *et al*. 2002].

Le mécanisme d'induction de la SOD Mn par les substances anticancéreuses est mal défini. Il semble que l'$O_2°$- soit en partie responsable de cette induction. Une étude rapporte également que l'exposition des cellules tumorales au TNFα leur confère une résistance acquise vis-à-vis des anthracyclines ou des radiations ionisantes [Maeda *et al*. 1994 ; Wong 1995 ; Kobayashi *et al*. 1998 ; Benlloch *et al*. 2006]. Dans ce sens, une étude clinique révèle qu'il existe une relation inverse entre la réponse clinique à la doxorubicine et l'expression de la SOD Mn dans les cellules tumorales ainsi que la présence de TNFα chez des patients atteints de leucémies [Kobayashi *et al*. 1997]. Ces résultats laissent à penser que les macrophages infiltrant les tumeurs, participeraient en partie à la chimiorésistance et à la radiorésistance des cellules tumorales, en provoquant l'induction de la SOD Mn par la libération de TNFα. Ce dernier est un activateur du complexe NF-kB, qui, comme nous l'avons déjà mentionné dans le paragraphe III.2.C, est un facteur de transcription activant l'expression du gène de la SOD Mn. Dans ce sens, l'équipe de St Clair et d'Oberley a montré très récemment que la sous-unité RelB du facteur de transcription NF-κB, est impliquée dans la réponse adaptative des cellules de carcinome de la prostate aux radiations ionisantes, en induisant l'expression de la SOD Mn [Murley *et al*. 2004 ; Guo *et al*. 2003b ; Josson *et al*. 2006].

L'ensemble de ces données de la littérature laisse à penser que la SOD Mn représente un facteur clinique important dans la prédiction de la résistance aux traitements anticancéreux et une cible anticancéreuse potentielle [Hur *et al*. 2003 ; Pani *et al*. 2004].

5. La SOD Mn dans le cancer du sein

A. Expression de la SOD Mn dans les cancers du sein

Chez les souris, la SOD Mn est impliquée dans le développement de la glande mammaire, en particulier dans la protection de l'épithélium mammaire contre les agressions induisant un stress oxydant et pouvant être à l'origine d'évènements précoces de la malignité mammaire [Parmar *et al*. 2005].

L'équipe d'Oberley a montré que l'expression basale de la SOD Mn est faible dans la lignée tumorale mammaire de type MCF-7. Dans cette lignée, la surexpression de la SOD Mn, après introduction de son ADNc, entraîne une diminution de la croissance des cellules tumorales mammaires [Li *et al*. 1995], résultant de l'élimination de l'$O_2°$- qui est connu pour activer les signaux favorisant la prolifération cellulaire [Oberley 2005]. Suite à ces travaux, le gène codant l'enzyme antioxydante a ainsi été considéré comme suppresseur de tumeurs [Bravard *et al*. 1992]. Cette hypothèse a ensuite été confortée par la démonstration que la surexpression de l'enzyme antioxydante entraîne une modulation de l'expression de nombreux gènes qui semble dépendante de l'activation de facteurs de transcription comme NF-κB et AP-1 [Manna *et al*. 1998]. Parmi les gènes activés, certains codent des protéines contrôlant la croissance, tels que la p53 et la Maspin [Manna *et al*. 1998 ; Duan *et al*. 2003], ou des protéines impliquées dans la réparation des cassures de l'ADN [Li *et al*. 2001]. Parmi les gènes réprimés, il a été mis en évidence ceux codant le *VEGF1*, *IL1β*, celui de l'enzyme convertissant le TNFα [Li *et al*. 2001] ou encore l'oncogène *HER2/neu* [Chuang *et al*. 2007]. Des résultats plus récents, obtenus *in vivo* et *in vitro* avec les lignées de cellules tumorales mammaires MCF-7 et MDA-MB231, révèlent que la surexpression de la SOD Mn réduit plus significativement la croissance et la survie cellulaires, lorsqu'elle est couplée à l'action du 1,3 Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea ou BCNU, un inhibiteur de la glutathion réductase qui provoque une réduction importante du GSH et donc une augmentation du stress oxydant [Weydert *et al*. 2006 ; Weydert *et al*. 2008].

Cependant, la même équipe a montré que la surexpression expérimentale de la SOD Mn entraîne un excès d'H_2O_2 dans la cellule, qui est responsable de l'induction de l'expression de la MMP-2, impliquée dans l'invasion tumorale [Zhang *et al*. 2002b].

Même si l'expression constitutive de la SOD Mn est faible dans la lignée de cellules tumorales mammaires MCF-7, des études cliniques ont cependant montré que le niveau d'expression de l'enzyme antioxydante est corrélé avec la malignité et le pouvoir métastatique des tumeurs mammaires, comparativement aux cellules épithéliales mammaires normales [Mukhopadhyay *et al*. 2004 ; Tsanou *et al*. 2004]. Ces données cliniques suggèrent donc que l'expression de la SOD Mn est distincte selon le degré de différenciation et de malignité des tumeurs mammaires et qu'elle doit dépendre de l'existence de mécanismes distincts de régulation du gène.

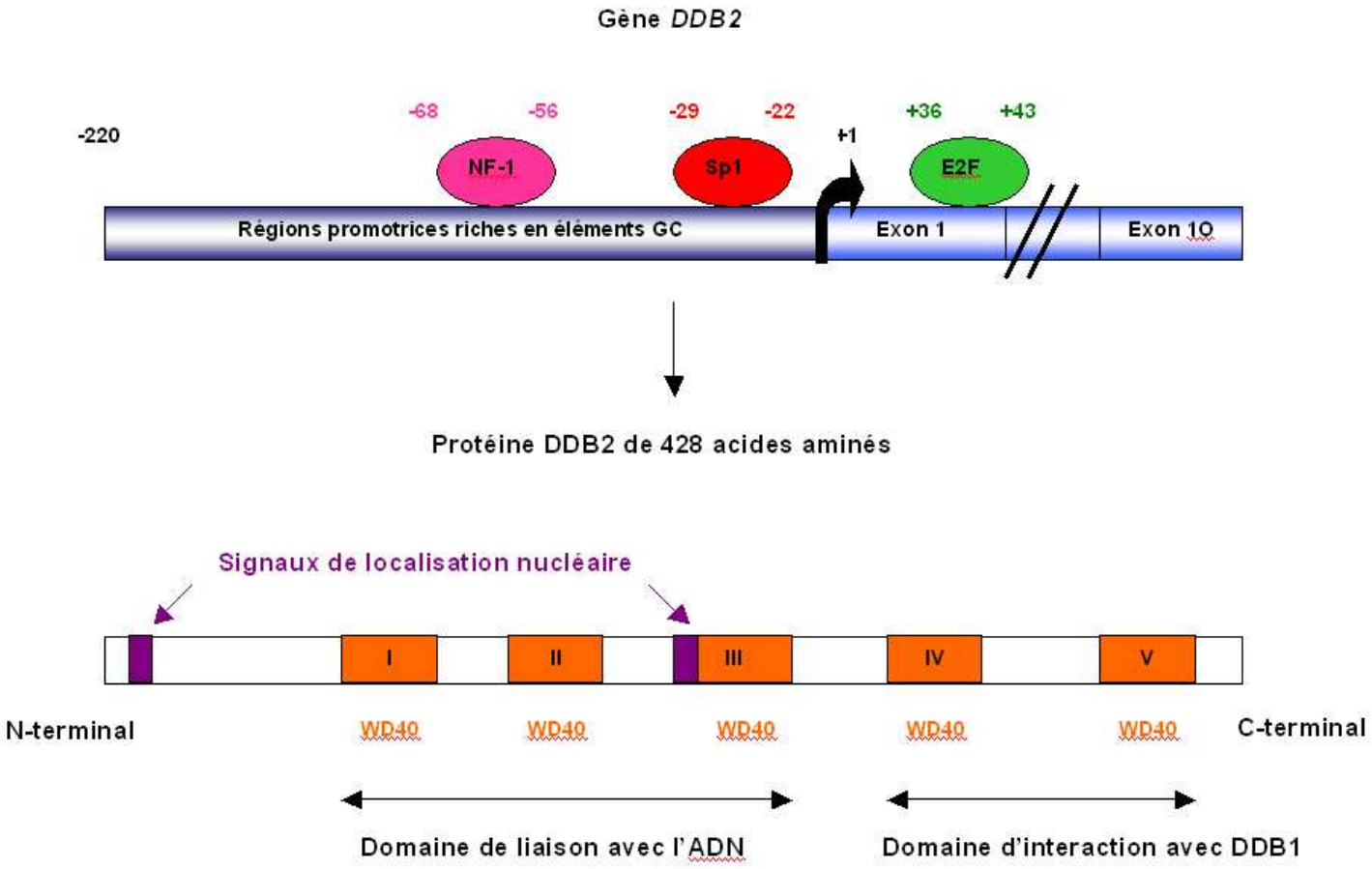
B. Régulation de l'expression du gène *SOD2* dans les cellules cancéreuses mammaires

La régulation de l'expression du gène de la SOD Mn est peu connue dans les cellules tumorales mammaires. Aucune mutation n'a été révélée dans la région proximale du promoteur du gène *SOD2* dans les lignées de cellules tumorales mammaires MCF-7 et MDA-MB231) [Xu *et al*. 1999b]. Le niveau faible de l'expression observée *in vivo* dans la plupart des tumeurs mammaires s'expliquerait en partie par l'existence du polymorphisme Ala-16Val du gène *SOD2* qui diminue la quantité intra-mitochondriale de l'enzyme. L'association entre ce polymorphisme et l'augmentation des risques de développer un cancer du sein est aujourd'hui clairement établie [Ambrosone *et al*. 1999a ; Ambrosone 1999b ; Mitrunen *et al*. 2001 ; Millikan *et al*. 2004 ; Bica *et al*. 2008]. Des modifications épigénétiques de la région proximale du gène ont également été décrites dans le cas de la lignée de cellules tumorales mammaires MDA-MB435. Dans ces dernières, la faible expression de la SOD Mn dépend d'une augmentation de la méthylation des cytosines et d'une diminution de l'acétylation des histones, comparativement aux cellules immortalisées MCF-10A [Hitchler *et al*. 2006]. Dans les cellules tumorales mammaires (MCF-7, T-47D et MDA-MB231), la modification des histones entraîne une modification structurale de la chromatine, qui rend moins accessibles les sites de fixation des facteurs de transcription présents dans la région proximale du gène de la SOD Mn [Hitchler *et al*. 2008].

C. La SOD Mn et la résistance aux traitements anticancéreux dans les cellules tumorales mammaires

Les mécanismes de résistance aux anticancéreux sont d'origine multiple. Dans le paragraphe III.4.F, les données rapportées de la littérature montrent l'implication de la SOD Mn dans la résistance aux traitements anticancéreux. Plusieurs mécanismes de résistance ont d'ailleurs été décrits dans le cancer du sein. Leur existence a été particulièrement mise en évidence grâce à des études réalisées sur la lignée cellulaire MCF-7. Le principal mécanisme dépend de la surexpression d'une protéine transmembranaire appelée glycoprotéine P ou pGp, dont le gène codant est *MDR1* (*MultiDrug Resistance 1*) [Akman *et al*. 1990], et qui conduit les cellules MCF-7 à résister aux anthracyclines, à la colchicine et la vinblastine [Zyad *et al*. 1994]. Certains auteurs ont montré en particulier une corrélation entre le niveau d'expression de la SOD Mn et le niveau de résistance aux anthracyclines des cellules MCF-7 [Li et Oberley 1997]. De plus, l'induction de l'expression de la SOD Mn par le TNFα conduit à une réponse adaptative des cellules MCF-7 aux anthracyclines [Zyad *et al*. 1994] ou aux radiations ionisantes [Lin *et al*. 1993 ; Siemankowski *et al*. 1999 ; Guo *et al*. 2003a]. Enfin, une étude récente montre que l'induction de l'expression de la SOD Mn par le tamoxifène, un antagoniste du récepteur aux oestrogènes, constituerait, selon les auteurs, un des mécanismes de résistance à l'hormonothérapie des tumeurs mammaires ER positives [Daosukho *et al*. 2005].

A l'heure actuelle, aucun mécanisme expliquant l'expression constitutive élevée ou induite par les substances anticancéreuses de la SOD Mn, n'est décrit dans les cellules tumorales mammaires. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, la recherche, dans les cellules tumorales mammaires, de protéines pouvant réguler l'expression de la SOD Mn, a permis d'identifier dans le laboratoire d'accueil, une protéine appelée DNA Damaged-Binding protein 2 (DDB2), interagissant avec la région proximale du promoteur du gène codant l'enzyme antioxydante.



<u>Figure 22</u> : Représentation schématique de la structure du gène et de la protéine DDB2 humaine.

[d'après Rapic-Otrin *et al*. 2003 et Nichols *et al*. 2003]

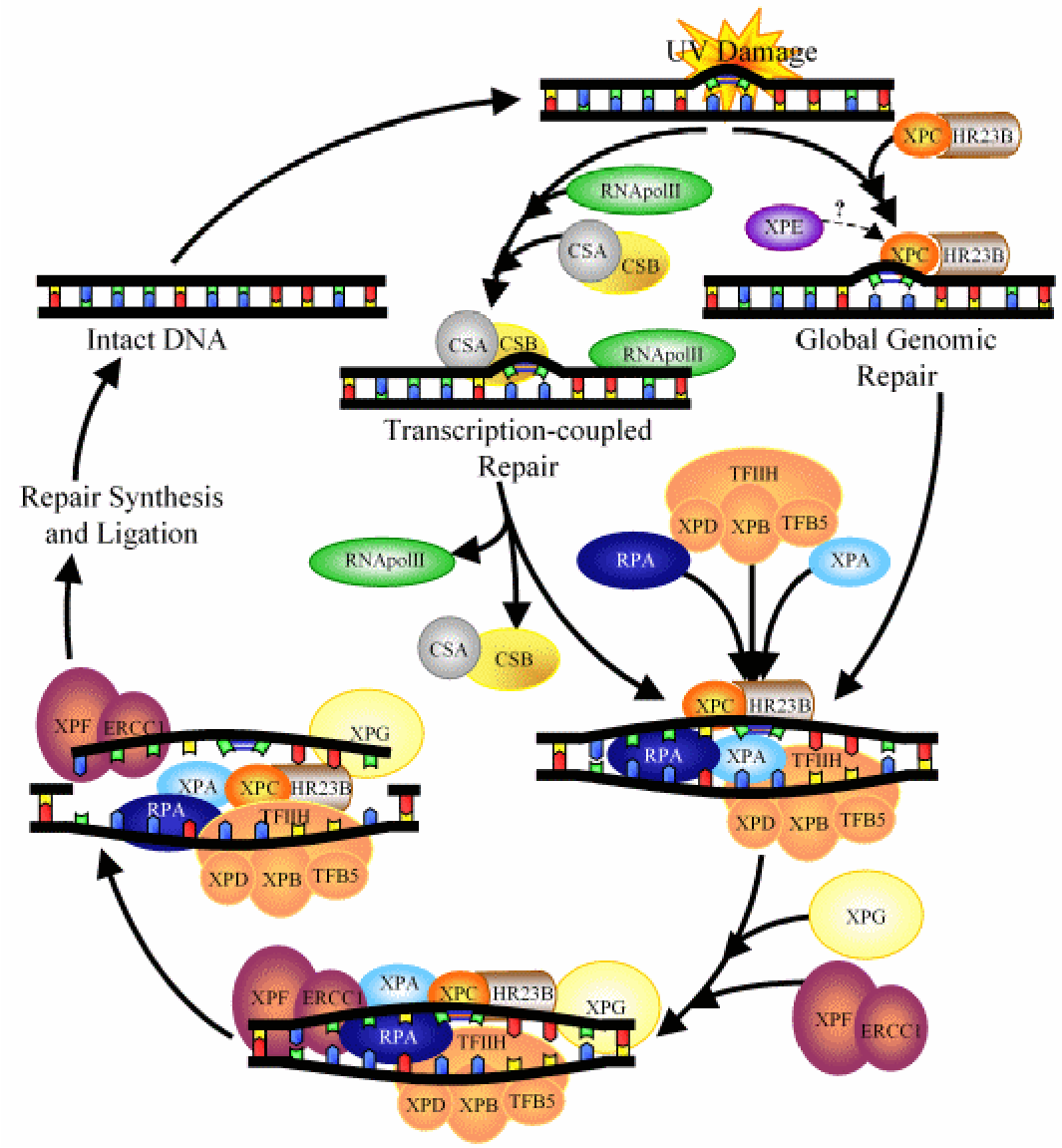
IV LA PROTÉINE DAMAGED DNA-BINDING 2 (DDB2)

1. Structure du gène et de la protéine DDB2

La protéine humaine "Damaged DNA-binding 2"(DDB2), a été identifiée pour la 1ère fois dans le placenta humain [Feldberg et Grossman 1976 ; Feldberg *et al*. 1982], et plus particulièrement dans un complexe protéique communément appelé DDBP (Damaged DNA-binding protein). DDBP se présente sous la forme de deux sous-unités, respectivement de 127 kDa, appelée DDB1, et de 48 kDa ou DDB2. Les gènes respectifs de ces deux sous-unités sont localisés sur le chromosome 11 [Dualan *et al*. 1995]. Le gène codant DDB1 est très conservé chez les eucaryotes, alors que celui codant DDB2 est identifié uniquement chez les Mammifères [Tang et Chu 2002]. DDB1 est exprimée de manière constitutive alors que DDB2 possède un gène inductible lors d'une exposition aux ultraviolets ou UV [Takao *et al*. 1993]. La protéine DDB2 présente une localisation exclusivement nucléaire, tandis que la protéine DDB1 se trouve dans le cytoplasme et dans le noyau [Shiyanov *et al*. 1999b].

La protéine DDB2 est la mieux connue des deux sous-unités. Elle est composée de 428 acides aminés, possède 5 domaines et contient deux séquences d'adressage vers le noyau du côté N-terminal et dans le domaine III [Inoki *et al*. 2004]. Chaque domaine possède un motif répété, caractéristique des protéines interagissant avec la chromatine, appelé WD40 qui contient des répétitions des acides aminés tryptophane-acide aspartique [Tang et Chu 2002] (**Figure 22**). La structure du gène présente 10 exons, à l'origine de variants protéiques suite à un épissage alternatif, caractérisés dans les cellules HeLa. Ces variants jouent le rôle de dominants négatifs de la protéine DDB2 sauvage, sur l'activité DDBP [Inoki *et al*. 2004].

La régulation de l'expression de DDB2 est peu connue. Les premières études ont montré que la protéine p53 régule l'expression basale du gène *DDB2* et ceci même en l'absence de lésions sur l'ADN [Hwang *et al*. 1999]. Les études suivantes, réalisées sur les cellules HeLa, ont montré que le promoteur proximal du gène (220 pb du site d'initiation de la transcription) est composé de régions riches en éléments GC et qu'il ne possède pas de boîte TATA. Plus précisément, l'analyse de cette région a permis de mettre en évidence de multiples éléments de réponses de facteurs de transcription, comme NF-1, Sp1 ou encore E2F (**Figure 22**). La mutation de ces sites conduit à une diminution de l'activité du promoteur et de la transcription de DDB2 [Nichols *et al*. 2003]. Dans le cas de DDB1, le promoteur



<u>Figure 23</u> : Mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER).

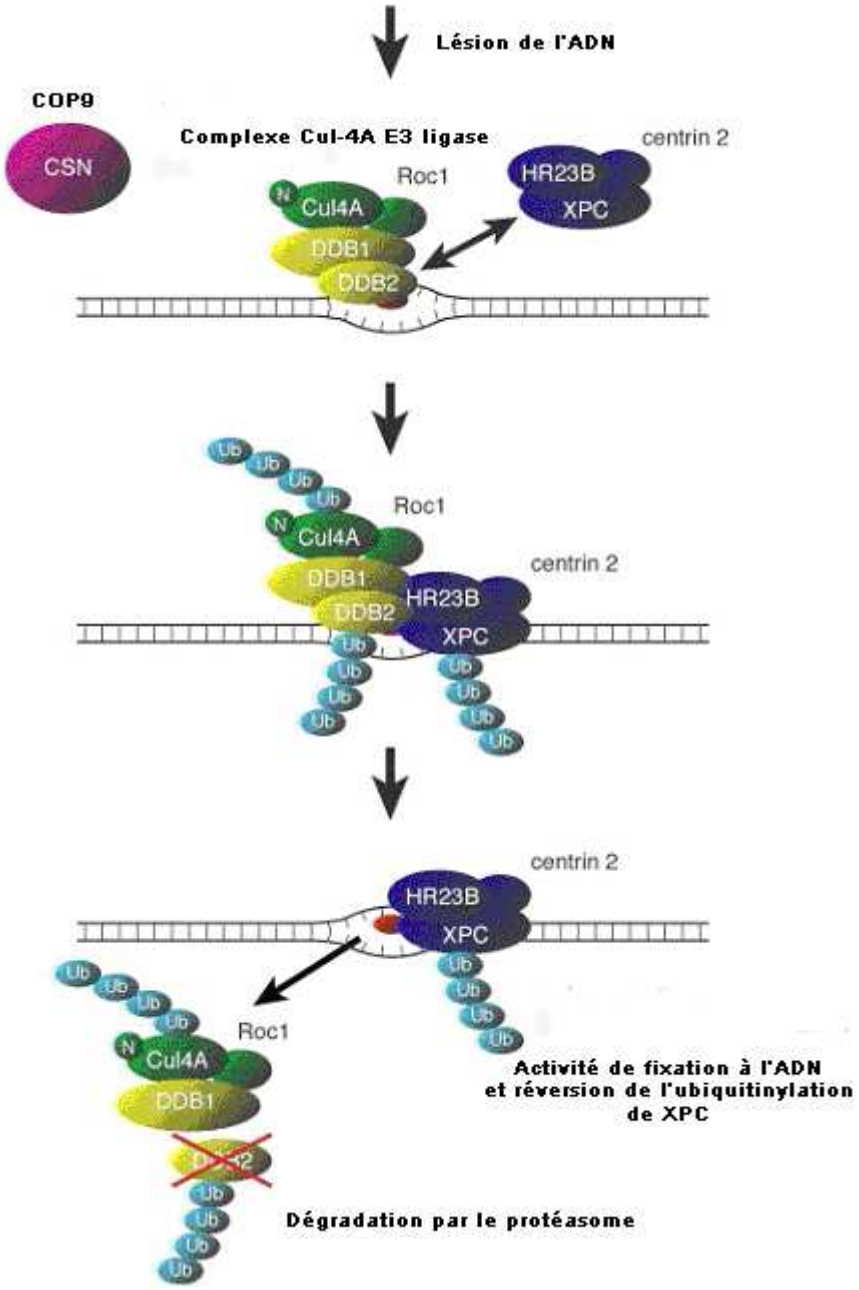
Il existe deux voies du NER selon que la lésion provoquée par les UV (**UV Damage**) se trouve dans l'ADN non transcrit (GG-NER pour **global genome repair**) ou l'ADN transcrit (TC-NER pour **transcription-coupled repair**). Ces voies ne diffèrent que par le mode de détection de la lésion : par les complexes XPE (DDB1/DDB2) et XPC-hHR23B (XP pour Xeroderma Pigmentosum) dans le cas du GG-NER, et par le blocage de la machinerie de transcription dans le cas du TC-NER. Pour le TC-NER, les molécules CSA et CSB (Cocaïne Syndrome A et B) participent à la détection du dommage au même titre que l'ADN polymérase impliquée dans la synthèse de brin. Une fois détectée, la lésion est rendue accessible pour les autres protéines de la réparation par maintien de l'ouverture de la double hélice grâce aux deux hélicases XPB et XPD du complexe TFIIH. Les nucléases XPG et XPF-ERCC1 effectuent alors l'excision d'une partie du brin endommagé puis l'ADN polymérase effectue une nouvelle synthèse de brin et la ligation est assurée par l'ADN ligase (**Repair synthesis and ligation**) [d'après Costa *et al.* 2003 ; Illustration de Shane McLoughlin].

proximal du gène est situé à 292 pb du site d'initiation de la transcription, et ne possède pas de boite TATA. Il présente aussi de nombreux éléments de réponses pour les facteurs de transcription Sp1 (-123 à –115 pb), N-myc (-56 à –51 pb) et NF-1 (-104 à –92 pb) [Nichols *et al*. 2003].

2. Importance biologique du complexe DDBP

Ce complexe est localisé dans le noyau, et se fixe avec une grande affinité sur l'ADN endommagé par les UV, par les radiations ionisantes, des agents alkylants ou des générateurs d'EAO [Tang et Chu 2002 ; Moser *et al*. 2005]. L'hétérodimère formant le complexe DDBP participe ainsi au processus de réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER). L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'intégrité de l'ADN a montré que la réparation de l'ADN par NER est cruciale dans la prévention de certains cancers de la peau induits par l'exposition aux UV chez l'homme, dans la prévention des cancers du poumon induits par le tabac et dans certains cancers du sein [Hu *et al*. 2006]. Différentes lésions de l'ADN, sont reconnues par le complexe DDBP, telles que des dimères de cyclobutane pyrimidique, les sites apuriniques et apyrimidiques et les mésappariements [Wittschieben *et al*. 2005]. Le rôle exact du complexe DDBP dans le système NER n'est pas clairement défini. Dès la reconnaissance de la lésion par la protéine DDB2, le complexe semble jouer un rôle accessoire dans ce type de réparation de l'ADN, en recrutant les protéines indispensables pour l'excision du nucléotide endommagé (**Figure 23**). Il permet aussi d'activer la réparation génomique globale [Hwang *et al*. 1999].

Une déficience du système NER est associée à une maladie génétique autosomique récessive rare appelée *Xeroderma Pigmentosum* (XP), qui se caractérise par une forte sensibilité de la peau des patients aux UV et par une incidence très élevée de mélanomes et de carcinomes [Chu et Chang 1988 ; Keeney *et al*. 1994]. Les travaux sur cette maladie ont permis de mettre en évidence 7 groupes de complémentation, XP-A à XP-G. Ces groupes correspondent tous à des protéines impliquées dans le système NER (XPA à XPG). Les malades porteurs de mutations au niveau de l'un des 7 gènes ou complexes sont donc déficients pour le système de réparation NER. C'est le cas du groupe E (XP-E) qui présente une déficience de l'activité DDBP. Cette déficience est associée à des mutations dans la partie codante du gène *DDB2* [Nichols *et al*. 1996; Itoh *et al*. 1999; Nichols *et al*. 2000]. L'injection



<u>Figure 24</u> : Processus d'ubiquitinylation de DDB2 par la Culline-4A lors de lésions sur l'ADN provoquées par une irradiation.

La protéine XPC peut subir une ubiquitinylation réversible après une irradiation par les UV, dépendante de la présence de DDB2. XPC et DDB2 interagissent physiquement et toutes deux sont poly-ubiquitinylées par le complexe Culline-4A (Cul-4A) E3 ligase. Cette poly-ubiquitinylation altère les facultés de liaison de XPC et de DDB2 sur l'ADN endommagé par les UV, enfin DDB2 est dégradée par le protéasome [Modifiée d'après Sugasawa *et al*. 2005].

de la DDB2 dans des fibroblastes provenant de patients du groupe E suffit à la restauration de l'activité du complexe DDBP et à une diminution de la sensibilité aux UV [Chu et Chang 1988].

3. Rôles biologiques de la DDB2

A. Réparation de l'ADN endommagé par les UV

Lors d'une exposition aux UV, la protéine DDB2 reste localisée dans le noyau et joue un rôle important dans le transport de DDB1 du cytoplasme dans le noyau, selon un mécanisme mis en jeu qui n'est pas encore élucidé [Liu *et al*. 2000b]. En absence de lésions de l'ADN, DDB1 serait séquestrée dans le cytosol par une protéine appelée BRAP2, qui se fixe à son signal de localisation nucléaire [Li *et al*. 1998b].

Lors de l'apparition de lésions de l'ADN suite à une irradiation aux UV, la DDB1 transportée dans le noyau, interagit à la fois avec DDB2 pour former le complexe DDBP proprement dit, mais également avec deux autres protéines, ROC1 et la Culline-4A (Cul-4A), qui possède une activité E3 ligase [Nag *et al*. 2001 ; Li *et al*. 2006a ; Angers *et al*. 2006]. Le complexe DDBP-Cul-4A ainsi formé est reconnu par le signalosome COP9 (CSN) [Groisman *et al*. 2003]. La présence de DDB1 est indispensable au sein du complexe pour la reconnaissance du nucléotide endommagé, car la protéine DDB2 seule ne présente pas d'activité de fixation sur l'ADN lésé. [Keeney *et al*. 1993]. Une fois que les nucléotides endommagés sont reconnus par la DDB2, celle-ci s'associe avec le complexe protéique XPC-hHR23P, qui est indispensable pour le recrutement des autres protéines, telles que XPA et le facteur de réplication A (RPA) impliquées dans la réparation par excision des nucléotides [Rapic-Otrin *et al*. 1998 ; Fitch *et al*. 2003b]. A la suite de cette interaction avec le complexe XPC-hHR23P, seule la protéine DDB2 est rapidement ubiquitinylée par le complexe E3 ligase de la Cul-4A, dont l'activité est dépendante d'une phosphorylation par l'oncoprotéine tyrosine kinase c-Abl [Rapic-Otrin *et al*. 2002 ; Matsuda *et al*. 2005 ; Chen *et al*. 2006 ; El-Mahdy *et al*. 2006]. Avant qu'elle soit dégradée par le protéasome 26S, l'ubiquitinylation de la DDB2 entraîne le détachement du complexe DDBP-Cul-4A-ROC1 des nucléotides endommagés [Li *et al*. 2006a]. L'auto-ubiquitinylation de la Culline-4A est également impliquée dans le détachement de l'ensemble du complexe de la région lésée de l'ADN [Sugasawa *et al*. 2005] (**Figure 24**).

La réparation de l'ADN par le système NER nécessite un blocage de la réplication de l'ADN. Très récemment, plusieurs études ont montré une interaction physique entre certaines protéines impliquées dans la réplication de l'ADN et le complexe DDBP-Cul-4A-ROC1, qui a pour conséquence d'empêcher la réplication de l'ADN lorsque celui-ci est lésé. La 1ère interaction est indépendante de la DDB2. Il s'agit de l'interaction entre la DDB1 associée à la Culline-4A et la protéine Cdt2, qui catalyse la dégradation de la protéine Cdt1. Cdt2 est une protéine de la famille DCAF (DDB1 and Cul-4A-associated Factors) interagissant avec la chromatine à l'aide de ses domaines WD40, tandis que Cdt1 interagit avec la protéine PCNA pour initier la réplication de l'ADN [Senga *et al*. 2006 ; Kim et Kipreos 2007]. La dégradation de Cdt1 conduit à un blocage de la réplication. De même, la 2ème interaction mise en évidence dans l'arrêt de la réplication, durant la réparation de l'ADN par le système NER, fait intervenir la DDB2 et la claspine, une protéine connue pour son rôle dans le contrôle de l'arrêt de la réplication lorsque l'ADN est lésé. D'après les auteurs de cette étude, cette interaction semble indispensable pour activer la protéolyse de DDB2 en même temps que l'arrêt de la réplication nécessaire pour la réparation de l'ADN [Praetorius-Ibba *et al*. 2007]. Il est connu que la réparation par le système NER dépend également de la p53, dont le niveau d'expression est contrôlé par le complexe DDBP-Cul-4A-ROC1. Lorsque les lésions de l'ADN sont détectées dans la cellule, la p53 est rapidement phosphorylée par la kinase ATR avant d'induire l'expression de ses gènes cibles comme la p21 Waf1/Cip1, puis d'être dégradée. A partir d'un modèle de fibroblastes embryonnaires de souris invalidées pour le gène *DDB2*, il a été montré que la dégradation de la p53 dépend de la DDB2 au cours de la réparation de l'ADN. En effet, la DDB2, par le transport qu'elle assure de DDB1 dans le noyau, permet la formation du complexe DDBP-Cul-4A-ROC1, qui en coopérant avec la protéine MDM2, active la dégradation de la p53, se traduisant par une diminution de l'expression de la p21 Waf1/Cip1 [Banks *et al*. 2006 ; Stoyanova *et al*. 2008].

L'activité du complexe DDBP dépend de BRCA1 et de p53, qui interviennent dans l'activation de l'expression du gène *DDB2* [Hartman et Ford 2003]. En effet, BRCA1 stabiliserait la liaison de p53 sur le promoteur du gène *DDB2* pour activer sa transcription [Takimoto *et al*. 2002]. Cependant, une étude réalisée sur des fibroblastes humains, dans lesquels la protéine p53 est inactivée, révèle que l'expression basale de la DDB2 est suffisante pour amorcer la réparation de l'ADN endommagé par les UV [Fitch *et al*. 2003a]. Très récemment, une étude révèle que la régulation de l'activité du complexe DDBP dans la réparation par excision de nucléotides, dépend également de la p38 MAPK, qui accélère la

dégradation de la DDB2 en la phosphorylant, suite à une irradiation aux UV [Zhao *et al*. 2008].

B. Remodelage de la chromatine

La présence de répétitions WD40 dans la structure primaire de la protéine DDB2 suggère son implication possible dans le remodelage de la chromatine. En effet, ces répétitions sont présentes dans des protéines telles que le complexe STAGA ou la CBP/p300, qui appartiennent à la famille des histones acétyltransférases et qui participent activement au remodelage de la chromatine, indispensable pour la transcription des gènes [Otrin *et al*. 1997 ; Martinez *et al*. 2001 ; Datta *et al*. 2001]. Deux études récentes ont permis de démontrer l'implication de la DDB2 dans le remodelage de la chromatine qui faciliterait l'accès des protéines de réparation aux lésions de l'ADN. Suite à l'activation du complexe DDBP-Culline-4A-ROC1 au niveau de la région lésée de l'ADN, la protéine DDB2 activerait la mono-ubiquitinylation des histones H2A, H3 et H4. La modification de ces histones entraînerait une désagrégation des nucléosomes et donc une relaxation de la chromatine autour de la région lésée de l'ADN, qui deviendrait ainsi accessible aux protéines de réparation [Kapetanaki *et al*. 2006 ; Wang *et al*. 2006].

Très récemment, l'équipe de Rapic-Otrin a révélé la présence de la Culline-4B, un paralogue de la Culline-4A, formant un complexe DDBP-Culline-4B-ROC1. Elle montre que la Culline-4B favorise la translocation nucléaire de DDB1, même lorsque DDB2 est absente, et qu'elle augmente l'efficacité du système NER comme la Culline-4A, en modifiant la structure de la chromatine par ubiquitinylation de l'histone H2A [Guerrero-Santoro *et al*. 2008]. Cependant, il existe une activité du complexe DDB1-Cul-4A-ROC1 sur le remodelage de la chromatine, d'une façon indépendante de la DDB2, puisque ce complexe a été montré pour d'une part interagir avec plusieurs protéines ayant des domaines répétés de type WD40, et d'autre part réguler la méthylation des histones H3 [Higa *et al*. 2006].

C. Régulation du cycle cellulaire

Certaines données dans la littérature laissent supposer que la DDB2 joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire. Son expression est régulée durant les phases du cycle cellulaire et n'est pas détectable dans les cellules ne se divisant pas. Son expression est la plus haute à la fin de la phase G1 et à la transition G1/S, tandis qu'elle diminue

fortement au cours de la phase S du cycle de cellules normales en division [Nag *et al*. 2001]. Cette expression de DDB2 durant ces phases du cycle cellulaire serait régulée par les protéines N-Myc et E2F, dont l'élément de réponse respectif a été identifié dans la région promotrice du gène [Nichols *et al*. 2003 ; Prost *et al*. 2007]. De plus, la DDB2 interagit avec des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. C'est le cas de la Culline-4A, qui appartient à une famille de protéines impliquée dans l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire [Shiyanov *et al*. 1999a ; Nag *et al*. 2001]. C'est le cas également de l'interaction entre la DDB2 et le domaine d'activation de E2F1, un facteur de transcription qui contrôle l'expression des gènes cibles impliqués dans la réplication de l'ADN et l'entrée en phase S en se fixant sur des éléments de réponse de type TTTCGCGC. Cette dernière interaction, qui conduit à une augmentation de la transcription des gènes cibles de E2F1, semble dépendre d'une séquence homologue à la protéine du rétinoblastome Rb dans la structure primaire de la protéine DDB2 [Hayes *et al*. 1998; Shiyanov *et al*. 1999b]. Il semble néanmoins que ce soit le complexe DDB1-Cul4A-ROC1 qui joue le rôle central dans la régulation du cycle cellulaire, puisque ce complexe est particulièrement impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2, en dégradant non seulement Cdt1 mais également des inhibiteurs de CDK, tels que la p21 Waf1/Cip1 et la p27 Kip1, ceci indépendamment de la DDB2 [Nishitani *et al*. 2006 ; Bondar *et al*. 2006 ; Cang *et al*. 2007].

D. Activité suppresseur de tumeur

Un défaut de la réparation par excision de nucléotides est responsable de la maladie autosomique récessive, le *Xeroderma Pigmentosum*. Les patients atteints de cette maladie se protègent des UV solaires, parce qu'ils présentent des risques élevés de développer des mélanomes [Itoh 2006]. Cependant, des souris homozygotes, invalidées du gène DDB2, développent spontanément des tumeurs dans d'autres organes, même en l'absence d'irradiations aux UV [Itoh *et al*. 2004 ; Yoon *et al*. 2005 ; Itoh *et al*. 2007]. A l'inverse, une surexpression de la DDB2 protège les souris de l'action carcinogène d'irradiations chroniques aux UV, en favorisant l'apoptose des cellules normales [Alekseev *et al*. 2005]. L'ensemble de ces études suggère donc que la protéine DDB2 jouerait un rôle suppresseur de tumeur.

E. Activité oncogénique

Très récemment, des résultats, obtenus au sein du laboratoire, ont montré que la DDB2 présente une activité oncogénique dans les cellules tumorales mammaires dépendantes des oestrogènes. La DDB2 est surexprimée à la fois dans des lignées cellulaires et dans des tumeurs mammaires exprimant le récepteur aux œstrogènes. Cette expression est cependant très faible mais pas nulle dans les cellules tumorales et les tumeurs mammaires n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes. Le développement de modèles cellulaires transgéniques a permis de montrer que la DDB2 joue un rôle important dans la prolifération des cellules tumorales mammaires. En effet, l'inhibition par ARN interférence de l'expression de DDB2 entraîne une inhibition de la croissance, associée à une diminution très significative de l'expression de gènes, tels que la cycline E, PCNA pour Proliferating Cell Antigen et la DHFR pour Dihydrofolate réductase, impliqués dans la prolifération et régulés par le facteur E2F. A l'inverse, la surexpression de la DDB2 dans des cellules tumorales mammaires ne l'exprimant que très faiblement, stimule leur prolifération. Une analyse plus précise du rôle de la DDB2 dans les cellules tumorales mammaires a permis de montrer que son activité oncogénique correspond à une implication de la protéine dans l'activation des cellules tumorales mammaires, qui la surexpriment naturellement, à entrer dans la phase de transition G1/S et à progresser dans la phase S du cycle cellulaire, plus rapidement que les cellules qui ne l'expriment pas [Kattan *et al*. 2008a].

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

* * *

L'analyse de la littérature révèle incontestablement que la SOD Mn, une des enzymes antioxydantes majeures, joue un rôle important dans le développement des tumeurs. A l'heure actuelle, elle est considérée comme un suppresseur de tumeur, ou au contraire un facteur prédictif de résistance à certains traitements anticancéreux, selon l'origine du cancer. Néanmoins, son rôle exact est mal défini. Il semble dépendre de son niveau d'expression constitutive, qui varie selon les caractéristiques de croissance et la réponse vis-à-vis des agents anticancéreux des cellules tumorales, mais aussi selon l'origine des tumeurs. De plus, les mécanismes de régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn sont mal connus et les données actuelles ne permettent pas de comprendre exactement pourquoi l'expression de l'enzyme antioxydante est distincte selon le type de cellules tumorales.

Le travail présenté dans cette thèse repose sur des résultats préliminaires, qui ont particulièrement montré une expression distincte de la SOD Mn selon l'état métastatique des cellules tumorales mammaires. L'expression constitutive de l'enzyme antioxydante est faible dans les cellules ER-positives (MCF-7 et T-47D), mais est fortement élevée dans les cellules métastatiques et ER-négatives (MDA-MB231 et SK-BR-3), suggérant l'existence de mécanismes moléculaires distincts impliqués dans la régulation du gène de la SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires. L'équipe du laboratoire a donc entrepris la recherche de nouveaux facteurs protéiques pouvant réguler l'expression constitutive du gène de la SOD Mn dans les cellules MCF-7, par une analyse systématique des protéines se fixant sur toute la partie proximale du promoteur. Ce travail a permis de mettre en évidence une protéine, qui a été identifiée après purification et séquençage, comme étant la DDB2 (en collaboration avec le Pr. J. VAN BEEUMEN, laboratoire de Biochimie et d'Ingénierie des Protéines de l'Université de Gand, Belgique). Par ailleurs, il a été montré au sein du laboratoire, une corrélation inverse entre l'expression de la DDB2 et celle de la SOD Mn [Kattan *et al.* 2008a].

Sur la base de ces résultats, les objectifs principaux de la présente Thèse étaient de montrer si l'expression de la SOD Mn est régulée par la DDB2, et quelle est l'importance biologique réelle de cette enzyme antioxydante dans la croissance et l'invasion des cellules tumorales mammaires.

Ce travail a été réalisé sur les lignées de cellules tumorales mammaires, disponibles dans le laboratoire :

- les lignées épithéliales d'adénocarcinomes mammaires **MCF-7,** (numéro ATCC® : HTB-22^{TM}) et **T-47D** (numéro ATCC® : HTB-133^{TM}) non métastatiques, qui expriment le récepteur aux œstrogènes (ER+) et la protéine p53 fonctionnelle [Brooks *et al*. 1973 ; Keydar *et al*. 1979],
- les lignées épithéliales d'adénocarcinomes mammaires **MDA-MB231** (numéro ATCC® : HTB-26^{TM}) et **SK-BR-3** (numéro ATCC® : HTB-30^{TM}), métastatiques, qui expriment une p53 mutée et non fonctionnelle, mais pas le récepteur aux œstrogènes (ER-) [Cailleau *et al*. 1978 ; Trempe 1976].

CHAPITRE 2

* * *

MATERIELS

&

METHODES

MATERIELS & METHODES

* * *

I CULTURE CELLULAIRE

1. Conditions de culture

Toutes les lignées de cellules humaines d'adénocarcinomes mammaires MCF-7, T-47D, SK-BR-3 et MDA-MB231, sont cultivées en monocouche dans des flacons de 25 cm^2 dans un milieu RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, UK), contenant 2 mM de glutamine, 0,1 mg/ml de gentamicine (Gibco) et 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF), (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 min. La culture cellulaire est réalisée à 37°C sous atmosphère humide maintenue à 5% de CO_2 (Roche, Meylan, France). Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours. Après environ sept jours de culture, le tapis de cellules à confluence est mis en suspension par dissociation à l'aide d'une solution de Trypsine 0,1%-10 µM EDTA diluée dans un tampon phosphate salin (D-PBS, Gibco). Les cellules sont ensuite réensemencées à 10^4 cellules/ml de milieu de culture.

2. Traitements des cellules tumorales mammaires

Plusieurs traitements avec différentes substances chimiques, ont été réalisés principalement sur les lignées de cellules d'adénocarcinomes mammaires MDA-MB231 et MCF-7. Chaque traitement a été répété au minimum 3 fois de manière indépendante. A la fin de chaque traitement, les cellules sont lavées deux fois avec du D-PBS avant d'être lysées.

A. Traitement par un inhibiteur des méthylases, la 5-azacytidine

A partir d'une culture de cellules MCF-7 et MDA-MB231 réensemencées à 10^4 cellules/ml de milieu complet, la 5-azacytidine (Sigma, St Louis, USA), est ajoutée à différents moments de la culture, selon la durée du traitement souhaitée, à savoir à partir du 5e et du 6e jour de culture pour des durées respectives de 48 et 24 heures de traitement. Les cellules sont traitées avec différentes concentrations de 5-azacytidine (10 et 20 µM) obtenues à partir d'une solution mère à 500 µM dans de l'eau stérile.

B. Traitement par l'acide okadaique, un inhibiteur de la protéine phosphatase 2A (PP2A)

Une solution mère d'acide okadaique (Sigma) à 50 nM est préparée dans de l'eau stérile. Les cellules MDA-MB231 réensemencées à 5 x 10^4 cellules/ml de milieu complet, sont traitées avec 500 nM d'acide okadaique pendant 6 heures.

C. Traitement par les antioxydants

Des cultures de cellules MDA-MB231 réensemencées à 10^4 cellules/ml de milieu complet, sont traitées avec un ou deux antioxydants à différentes concentrations à savoir :

- 1 et 5 mM de N-acétyl-L-cystéine (NAC) (Sigma) pendant 8 jours
- 2 et 10 mM de Pyruvate (Sigma) pendant 8 jours
- 2 µM de Mn(III) tetrakis (1-méthyl-4-pyridyl) porphyrin pentachloride (MnTMPyP) (Biomol international, Plymouth, USA) pendant 6 jours.

D. Traitement par les inducteurs du gène de la SOD Mn

A partir d'une culture de cellules MCF-7 réensemencées à 10^4 cellules/ml de milieu complet, des inducteurs du gène de la SOD Mn comme le Tumor Necrosis Factor α (TNFα) (LabFrontier, Séoul, Corée du Sud) ou le Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (PMA) (Sigma), sont ajoutés au 6e jour de culture pour une durée de 12 heures de traitement. Les cellules sont traitées avec 20 ng/ml de TNFα et 200 nM de PMA, obtenus à partir de solutions mères respectivement à 1 µg/ml dans de l'eau stérile et à 100 µM dans du DMSO

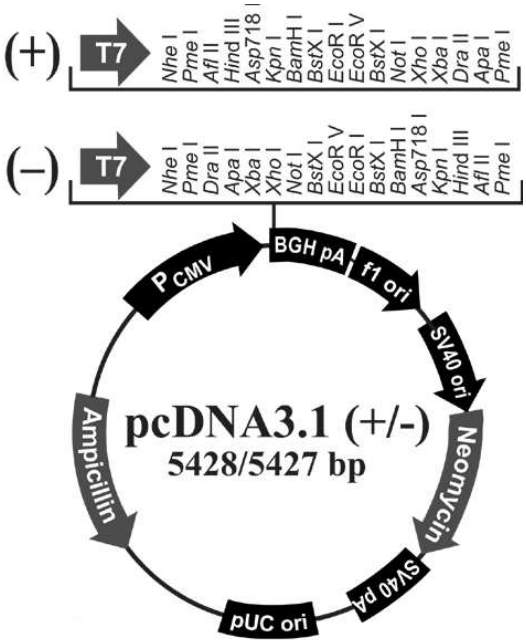
(Diméthylsulfoxyde, Sigma). Les cellules traitées avec le PMA sont comparées aux cellules témoins cultivées dans un milieu contenant 0,2 % de DMSO.

3. Développement des modèles cellulaires transgéniques

A. Construction du vecteur plasmidique contenant l'ADN complémentaire inversé de la SOD Mn

A.1. Synthèse de l'ADNc par transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) de la SOD Mn humaine (668 pb) est réalisée à partir d'ARN totaux extraits des cellules MDA-MB231 (cf paragraphe III.1), à l'aide d'un kit commercial High fidelity Extensor PCR (AB Gene, Epsom, UK) permettant de synthétiser avec une grande fidélité les différents ADNc. La partie codante du gène est synthétisée entre les amorces sens (5'-GGACTGGGTACCAGC**ATG**TTGAGCCGGGCAG-3') et antisens (5'-CTGAGCTCTAGAGTTTACTTTTTGCAAGCCATG-3'), contenant respectivement les sites de coupure des enzymes de restriction *Kpn I* et *Xba I* (Promega, France). L'ADNc de DDB2 (1300 pb) a été préalablement synthétisé à partir d'ARN totaux extraits des cellules MCF-7 par RT-PCR en utilisant le même kit commercial que précédemment et les amorces sens (5'-GGACTGGGTACCACACGCAGGACGCGATGGCTC-3') et antisens (5'-CTGAGCTCTAGATCACTTCCGTGTCCTGGCTTCC-3') se terminant respectivement par les sites *Kpn I* et *Xba I* [Kattan *et al*. 2008a]. La PCR est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.



<u>Figure 25</u> : Représentation de la carte du vecteur plasmidique pcDNA3,1(+/-) (Invitrogen), utilisé pour l'insertion de l'ADNc correspondant à la SOD Mn.

La PCR est réalisée dans un volume final de 50 µl contenant 1 µg d'ADNc, le tampon d'incubation, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de déoxynucléotides triphosphates (dNTP), 0,5 µM de chacune des amorces et 2,5 unités de Taq polymérase. Le milieu réactionnel de PCR est placé dans un thermocycleur (BioRad) et soumis à une dénaturation initiale durant 2 min à 94°C, suivie de 10 cycles comprenant une dénaturation de 10 s à 94°C, puis 30 cycles avec une dénaturation de 20 s à 94°C, une hybridation à 53°C durant 30 s et une élongation à 68°C de 2 min. Ce programme est terminé par une élongation à 72°C durant 7 min.

Les fragments amplifiés sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1,2% (Life Technologies) préparé dans du tampon TBE 1X (90 mM Tris, 90 mM Borate (pH 8), 2 mM d'EDTA) contenant 0,5 mg/ml de bromure d'éthidium (BET). Les échantillons sont repris par une solution comportant 50% de glycérol, 50% de TBE 1X et du bleu de bromophénol avant d'être déposés sur le gel. La séparation électrophorétique s'opère à voltage constant (100 V) pendant 35 min. Les fragments amplifiés sont visualisés sous UV grâce à la fluorescence du BET intercalé dans l'ADN. Le gel est calibré par un marqueur de taille connue (Smart Ladder, Eurogentec, Liège, Belgique) qui est déposé en même temps que les échantillons. L'exploitation des résultats est réalisée avec le logiciel Quantity One sur un appareil GelDoc 2000 (BioRad).

A partir d'une électrophorèse préparative, l'ADNc est purifié dans le gel à l'aide du kit commercial Prep A Gene (Bio-Rad).

A.2. Clonage de l'ADNc dans le vecteur plasmidique pcDNA3,1(-)

Le plasmide pcDNA3,1(-) (**Figure 25**) est digéré durant 1 heure à 37°C par les enzymes de restriction *Kpn I* et *Xba I* (Promega) à raison de 2 unités par µg d'ADN. L'ADNc purifié est également digéré par les mêmes enzymes de restriction dans les mêmes conditions. Après extraction des enzymes au phénol/ chloroforme, l'ADNc ainsi que le plasmide sont précipités par l'isopropanol, puis dissous dans l'eau distillée dans un volume minimum. Les extrémités cohésives du vecteur sont ensuite déphosphorylées par 0,1 unité de phosphatase alcaline de veau (Promega) durant 30 min à 37°C. A nouveau, l'enzyme est éliminée par une extraction au phénol/ chloroforme et le plasmide est précipité par 2,5 volumes d'éthanol absolu froid, avant d'être solubilisé dans l'eau à une concentration de 100 ng/µl. Le plasmide

est ensuite incubé avec l'ADNc préalablement digéré, en présence de 3 unités de ligase et d'un tampon d'incubation contenant 0,1 mM d'ATP (Promega) durant 5 min à température ambiante, selon un rapport ADNc/vecteur de 5. Les bactéries compétentes *Escherichia Coli* (TG1) rendues compétentes par le $CaCl_2$ [Sambrook *et al*. 1989] sont transformées avec l'ensemble de la réaction de ligation, par choc thermique à 42°C pendant 2 min, puis incubées sous agitation 1 h à 37°C en milieu LB (10 g/l tryptone, 5 g/l extrait de levure, 10 g/l NaCl, pH 7). Après étalement des bactéries sur boîte de pétri de 90 mm en milieu LB (LB contenant 20 g/l de bactoagar) et de l'ampicilline, les clones bactériens sont incubés une nuit à 37°C.

L'ADNc se retrouve ainsi dans une position inversée, en vue de synthétiser un ARN antisens de la SOD Mn.

Les plasmides de chaque colonie repiquée dans 20 ml de milieu LB contenant 20 µg d'ampicilline, sont extraits selon la méthode de lyse alcaline [Birnboim et Doly 1979] et précipités par l'isopropanol. La présence de l'insert est vérifiée à la fois par digestion enzymatique avec *Kpn I* et *Xba I* et par PCR à l'aide des amorces sens et antisens utilisés pour la synthèse de l'ADNc (Voir paragraphe 3.A.1). Chaque clone bactérien, révélé positif, est ensuite cultivé dans 300 ml de milieu LB contenant de l'ampicilline afin d'extraire et de purifier sur une résine d'hydroxyapatite, une grande quantité de plasmides, à l'aide d'un kit commercial contenant toutes les solutions nécessaires (Nucleobond, Macherey-Nagel, Allemagne). L'ADN plasmidique précipité, puis séché sous vide, est dosé au spectrophotomètre à 260 nm. Le séquençage de l'ADNc est réalisé par un séquenceur automatique (INRA, Champenoux).

B. Transfection stable des cellules

Les cellules tumorales mammaires MCF-7 et MDA-MB231 sont transfectées avec le vecteur plasmidique, en utilisant le poly-éthylènimine linéaire comme agent de transfection (Trans PEI d'Eurogentec). Ce Trans PEI (8µl), dilué dans 150 mM de NaCl, est mis en contact avec 4 µg de vecteurs plasmidiques dans du milieu RPMI complet, durant 30 min à température ambiante. Ce mélange est ajouté à une culture de cellules ensemencées 24 heures auparavant à raison de 10^5 / puits dans une plaque de 6 puits. Après 24 heures, les cellules tumorales ayant reçu le plasmide portant un gène de résistance, sont

sélectionnées durant 3 semaines en présence de 800 µg/ml de Néomycine (Gibco) ajouté dans le milieu de culture. En parallèle, des cellules ayant été transfectées avec un vecteur vide sont sélectionnées de la même façon. La néomycine est enlevée du milieu de culture une semaine avant chaque expérience.

Dans le cadre de notre travail, d'autres modèles de cellules tumorales mammaires et transgéniques, qui surexpriment ou au contraire ont une expression inhibée de la protéine DDB2 par ARN interférence, ont été développés dans le laboratoire et ont été décrits précédemment [Kattan *et al*. 2008a].

4. Etude *in vitro* de la croissance cellulaire et de la capacité à former des colonies

Un test de prolifération cellulaire est déterminé par un comptage quasi quotidien de chaque lignée cellulaire dont on désire comparer la croissance. Il est réalisé en ensemençant 10^4 cellules/ml de milieu RPMI complet dans une plaque de 24 puits. Chaque comptage est réalisé tous les 2 jours pendant 8 jours à l'aide d'un hématimètre de type Malassez. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type du nombre de cellules de trois puits indépendants. Chaque test a été réalisé un nombre minimum de 3 fois et la significativité des résultats a été évaluée par un test de Student.

La clonogénicité représente la capacité des cellules ensemencées à très faible densité à former des colonies. Ainsi, 500 cellules sont ensemencées dans une boite de Pétri de 100 mm contenant 10 ml de milieu RPMI complet. Après 10 jours de culture, les colonies obtenues sont fixées à l'éthanol 70% durant 2 min et colorées avec 1% de cristal violet préparé dans de l'eau durant 5 min. Après rinçage des boites de Pétri avec l'eau bidistillée, le comptage des colonies est effectué par le logiciel Quantity One sur un appareil GelDoc 2000 (BioRad). Chaque lignée est ensemencée dans 3 boites de Pétri et chaque test a été renouvelé indépendamment au minimum 3 fois. Les résultats obtenus permettent de calculer le « Plating Efficiency (PE) » ou pourcentage de formation des colonies, selon la formule :

$$PE\ (\%) = \frac{\text{Nombre de colonies}}{\text{Nombre de cellules ensemencées}} \times 100$$

La significativité des résultats a été évaluée par un test de Student.

5. Etude *in vitro* de la migration cellulaire en chambre de Boyden

L'invasivité des cellules tumorales est étudiée en chambre de Boyden modifiée, qui mesure la capacité de migration des cellules à travers les pores d'un filtre de 8 µm composé d'une membrane de polycarbonate (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA), le tout placé au dessus d'un puits d'une plaque de 24 puits. Les cellules sont ensemencées à 2 x 10^5 cellules/ml dans la chambre supérieure dans 300 µl de milieu sans SVF. Cinq cents µl de milieu complet sont placés dans les chambres inférieures. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les cellules non invasives restées dans la chambre supérieure sont retirées à l'aide d'un coton-tige, tandis que les cellules invasives ayant migré dans les chambres inférieures sont colorées avec 0,5% de cristal violet et lysées par une solution de SDS 10% (SodiumDodécylSulfate, Sigma). Cent µl de cette dernière solution sont ensuite transférés dans une plaque de microtitration de 96 puits, afin de mesurer l'absorbance à 560 nm avec un lecteur de microplaques (Labsystem, Cergy-Pontoise, France), qui représente le nombre de cellules migrantes.

6. Test de cytotoxicité au MTT

La méthode colorimétrique utilisant le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol)-2,5-diphényltétrazolium, Sigma) permet d'évaluer la cytotoxicité liée aux différents traitements. Le réactif MTT est un composé de couleur jaune pâle en solution aqueuse qui est métabolisé par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes et transformé en cristaux de formazan de coloration bleue absorbant à 540 nm. Le test est réalisé en plaque de 96 puits dans lesquelles sont ensemencées 10^4 cellules/ml. Au terme des traitements, les cellules sont incubées dans 50 µl d'une solution de MTT à 5 mg/ml dans du D-PBS. Après 4 heures à 37°C, les cellules sont lysées par addition de 50 µl de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) à 10% (p/v) et l'absorbance est lue à 540 nm avec un lecteur de microplaques, prélablement calibré à zéro avec des puits ne contenant que le milieu de culture additionné de MTT et de SDS.

7. Transfection transitoire des cellules par la technique de l'interférence à l'ARN

Le terme ARN interférent ou « small interfering RNA » (siRNA) désigne un ARN simple ou double brin, qui interfère avec un ARN messager spécifique conduisant à sa dégradation et à la diminution de sa traduction en protéine. Trois séquences correspondantes à des siRNA double brin, spécifiques de chacun des facteurs de transcription Sp1 et AP-2α ont été synthétisées et purifiées par la société Eurogentec, et sont récapitulées dans le tableau suivant :

siRNA	oligonucléotides sens	oligonucléotides antisens
Sp1(1)	5'-CCAGCAACAUGGGAAUUAU-3	5'-AUAAUUCCCAUGUUGCUGG-3'
Sp1(2)	5'-GGAUGGUUCUGGUCAAAUA-3'	5'-UAUUUGACCAGAACCAUCC-3
Sp1(3)	5'-GAUCUGCAGUCCAUUAAUA-3'	5'-UAUUAAUGGACUGCAGAUC-3'
AP-2α(1)	5'-CGUGUCCGAAACCGAAUUU-3'	5'-AAAUUCGGUUUCGCACACG-3'
AP-2α(2)	5'-GCUGCUUGACCCACUUCAA-3'	5'-UUGAAGUGGGUCAAGCAGC-3'
AP-2α(3)	5'-GCUCCACCUCGAAGUACAA-3'	5'-UUGUACUUCGAGGUGGAGC-3'

Un jour avant la transfection, 10^5 cellules/ml sont ensemencées dans une plaque de 6 puits, puis sont transfectées transitoirement avec les siRNA correspondant à Sp1 ou AP-2α en utilisant un agent de transfection appelé JetSI-Endo (PolyPlus-transfection, Strasbourg, France), correspondant à un PEI à courte chaîne. Brièvement, 4 µL de JetSI-Endo sont dilués dans 100 µl de milieu RPMI sans SVF. Parallèlement, les siRNA Sp1 et AP-2α sont également dilués dans 100 µl de milieu RPMI sans SVF pour obtenir une concentration finale de 50 nM. Le mélange JetSI-Endo/siRNA est ensuite ajouté sur les cellules dans du milieu complet. Après 4 heures d'incubation à 37°C, du milieu complet de culture est ajouté jusqu'à 4 ml. Les cellules sont ensuite laissées en contact avec les siRNA pendant 24, 48 ou 72 heures, avant d'être lavées deux fois avec du D-PBS , puis congelées à -80°C jusqu'à utilisation. Les cellules témoins de l'expérience sont transfectées dans les mêmes conditions,

mais avec 50 nM d'un siRNA non spécifique ayant les séquences sens : 5'-UUAAACUUCAGCCCAGUGA-3' et antisens : 5'-CAGUAAACGCCGUCUUAUA-3'.

II ANALYSE DE L'ACTIVITE DE PROTEINES NUCLEAIRES SUR L'ADN

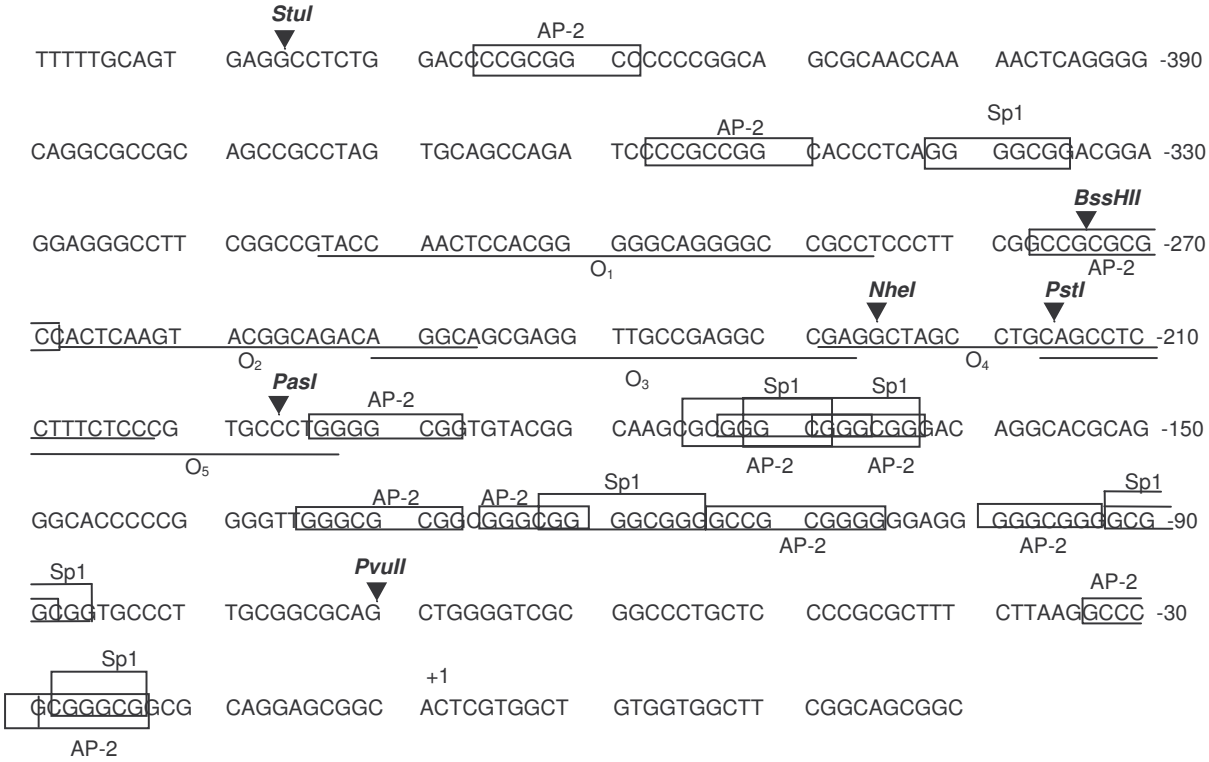
1. Etude de l'activité de fixation des protéines nucléaires sur l'ADN par retard sur gel

A. Extraction et dosage des protéines nucléaires

Les protéines nucléaires provenant des cellules MDA-MB231 ou MCF-7 sont extraites selon la méthode de Olnes et Kurl (1994). Après deux lavages successifs avec du D-PBS, les cellules sont mises en suspension par grattage dans 5 ml de D-PBS, puis centrifugées à 200 g pendant 5 min à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans un tampon Hepes 10 mM, pH 7,9, contenant 1,5 mM de KCl, 8 mM de $MgCl_2$ et 0,5 mM de Dithiothréithiol (DTT), puis laissé sur la glace pendant 15 min. Les noyaux sont isolés par homogénéisation après addition de 0,6 % de détergent Nonidet P40 (NP40) et centrifugés à 200 g à 4°C pendant 5 min. Après élimination du surnageant, les noyaux sont ensuite lysés dans un tampon de lyse nucléaire Hepes 20 mM, pH 7,9, contenant 450 mM de NaCl, 0,2 mM d'EDTA, 0,15 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de DTT, 0,5 mM de phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF) et 0,25 % de Nonidet P-40, sur la glace pendant 20 min sous agitation régulière. Après une centrifugation à 12000 g et à 4°C pendant 10 min, les protéines nucléaires contenues dans le surnageant sont stockées à –80°C avant d'être utilisées. Le dosage des protéines nucléaires est estimé selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) à l'aide d'une trousse de dosage commercialisée (DC protein Assay, BioRad). La concentration protéique est ensuite déterminée spectrophotométriquement à 750 nm en utilisant une gamme étalon correspondant à différentes concentrations connues d'albumine sérique bovine (BSA).

B. Marquage des sondes oligonucléotidiques

Des sondes oligonucléotidiques, dont les séquences correspondent aux éléments de réponse reconnus par les facteurs de transcription Sp1 et AP-2α étudiés, ainsi que celles



<u>Figure 26</u> : Schéma de la région 5' du gène de la SOD Mn allant des résidus nucléotidiques –450 à +30 par rapport au site d'initiation de la transcription (+1).

recouvrant la région proximale du promoteur du gène de la SOD Mn (**Figure 26**) ont été synthétisées dans le commerce (Eurogentec).

Leurs séquences sont indiquées dans le Tableau suivant :

Eléments de réponse	Séquences 5'-3'
Oligonucléotide O_1	TACCAACTCCACGGGGGCAGGGGCCGCCT
Oligonucléotide O_2	ACTCAAGTACGGCAGACAGGCA
Oligonucléotide O_3	AGGCAGCGAGGTTGCCGAGGCCGA
Oligonucléotide O_4	GAGGCT**AGCCTGCAGCCT**CCTTTCTCC
Oligonucléotide O_4 muté 1	G**C**GGCTAGCCTGCAGCCTCCTTTC**GA**C
Oligonucléotide O_4 muté 2	GAGGCT**C**GC**A**TGCAGCCTCCTTTCTCC
Oligonucléotide O_4 muté 3	GAGGCTAGCCTGC**C**GC**A**TCCTTTCTCC
Oligonucléotide O_4 muté 4	G**CT**GCTAGCCTGCAGCCTCCTTTCTCC
Oligonucléotide O_4 muté 5	GAGGCTAGCCTGCAGCCTCCTTTC**GA**C
Oligonucléotide O_4 muté 6	GAGGCTA**TA**CTGCAGCCTCCTTTCTCC
Oligonucléotide O_4 muté 7	GAGGCTAGCCT**TA**AGCCTCCTTTCTCC
Oligonucléotide O_4 muté 8	GAGGCTAGCCTGCA**TA**CTCCTTTCTCC
Oligonucléotide O_4 muté 9	GAGGCTAGCCTGCAGCCT**AA**TTTCTCC
Oligonucléotide O_4 muté 10	GAGGCTAGCCTGCAGCCTCC**GG**TCTCC
Oligonucléotide O_5	CAGCCTCCTTTCTCCCGTGCCCTGG
Sp1	ATTCGATCGGGGCGGGG
AP-2α	GATCGAACTGACCGCCCGC

Les parties complémentaires de chaque oligonucléotide (10 ng) sont hybridées dans le tampon d'incubation de l'enzyme de Klenow (Fermentas), pendant 10 min à 4°C. Les extrémités simple brin de chaque oligonucléotide hybridé sont synthétisées par élongation

pendant 30 min à 37°C dans un tampon d'incubation contenant 0,5 mM de dATP, de dGTP de dTTP et du d[αP^{32}]CTP, à l'aide de 10 unités de l'ADN polymérase du fragment de Klenow. La sonde double brin ainsi radiomarquée est séparée des nucléotides non incorporés par gel filtration sur une matrice de séphadex G25 (Amersham, UK). La radioactivité émise par chaque sonde est appréciée à l'aide d'un compteur Geiger.

C. Interaction des protéines sur l'ADN et analyse du complexe

Les protéines nucléaires (5 µg) sont incubées avec 1 ng de sonde oligonucléotidique radiomarquée dans un tampon d'incubation 10 mM Hepes, pH 7,9, contenant 2 mM de $MgCl_2$, 0,4 mM d'EDTA, 16 mM de KCl, 0,4 mM de DTT et 1 µg de poly dI-dC et dans un volume final complété par de l'eau stérile à 10 µl. Après 30 min d'incubation sur la glace, 1 µl de tampon de dépôt correspondant au tampon d'incubation additionné de bleu de bromophénol et contenant 10% de glycérol est ajouté au volume réactionnel.

La spécificité de l'interaction ADN-protéine est étudiée en incubant les extraits nucléaires avec des quantités croissantes (10, 25, 50, 100 fois en excès) de sonde oligonucléotidique froide et double brin, soit identique à celle radiomarquée, soit non spécifique correspondant à l'élément consensus de reconnaissance du facteur de transcription NF-κB (5'-AGTTGAGGGGACTTT-3'), durant 5 min sur la glace, avant d'y ajouter la sonde spécifique radiomarquée.

Le complexe ADN-protéine est analysé par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 5% préparé dans un tampon Tris 45 mM/Borate 45 mM / 1 mM EDTA pH 8 (TBE 0,5 X). Les échantillons rapidement déposés sont soumis à un voltage constant de 110 V pendant 30 min dans le tampon TBE 0,5 X. Le gel est ensuite séché sous vide à 80°C pendant 20 min, puis exposé sur un film photographique à -80°C (X-Omat, Kodak).

La nature du complexe retardé sur gel est caractérisée en utilisant un anticorps reconnaissant une protéine précise fixée sur l'élément de réponse, qui est ajouté après incubation des protéines nucléaires avec la sonde radiomarquée. Ainsi, 1 µg d'anticorps polyclonaux spécifiques soit anti-Sp1 (sc-59X, Santa Cruz Biotechnology), soit anti-AP-2α (sc-184X, Santa Cruz Biotechnology), soit anti-DDB1 (Santa Cruz Biotechnology), soit anti-DDB2 (Santa Cruz Biotechnology) est ajouté pour les super retards sur gel pendant 30 min à 4°C. Le complexe super-retardé est ensuite analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide (5%) comme précédemment.

2. Etude de l'activité de fixation des protéines nucléaires sur l'ADN par immunoprécipitation sur chromatine (« ChIP »)

Cette méthode est réalisée en utilisant un kit commercial (Active Motif, Belgique) contenant les solutions pour extraire et fragmenter de façon enzymatique la chromatine, ainsi que les billes magnétiques sur lesquelles est greffée la protéine G pour l'étape d'immunoprécipitation.

A. Extraction de la chromatine

Une culture de cellules tumorales mammaires MCF-7 à 80% de confluence sont fixées dans du milieu de culture RPMI 1640 sans sérum de veau fœtal mais contenant 1% de formaldéhyde pendant 10 min à température ambiante. Après deux lavages successifs, la fixation au formaldéhyde est arrêtée par un lavage des cellules avec une solution de D-PBS contenant 125 mM de Glycine durant 5 min à température ambiante. Les cellules ainsi fixées, sont ensuite récupérées par grattage dans une solution de D-PBS contenant 2 mM de PMSF, puis par centrifugation à 720 g pendant 10 min à 4°C. Le culot de cellules est resuspendu dans un tampon de lyse fourni par le kit commercial, dans lequel sont ajoutés extemporanément 2% du volume d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC) et 2 mM de PMSF. Les cellules en suspension sont lysées dans le tampon à l'aide d'un homogénéiseur de type Dounce et le lysat obtenu est centrifugé à 2400 g pendant 10 min à 4°C. Le culot correspondant aux noyaux est ensuite resuspendu dans un tampon de digestion, car compatible avec le cocktail d'enzymes utilisé pour la fragmentation de la chromatine, et contenant 2% de PIC et 2 mM de PMSF. Après une pré-incubation du mélange à 37°C, pendant 5 min, le cocktail enzymatique est ajouté à raison de 200 U/ml et laissé en contact avec les noyaux pendant 10 min à 37°C, un temps optimisé pour obtenir des fragments de chromatine de 200 à 1000 pb, conformément aux instructions du kit. La réaction est arrêtée par l'ajout de 0,5 M d'EDTA. Une centrifugation de 10 min à 12000 g et à 4°C permet de récupérer la chromatine fragmentée dans le surnageant, qui est immédiatement congelée à –80°C jusqu'à utilisation. Un échantillon de 25 µl est prélevé afin d'extraire l'ADN par un mélange de phénol/chloroforme, suivi d'une précipitation par 2 volumes d'éthanol absolu à -20°C. L'ADN redissout dans de l'eau stérile est finalement quantifié par spectrophotométrie à 260 nm pour estimer la quantité d'ADN contenu dans l'extraction de chromatine. La qualité de

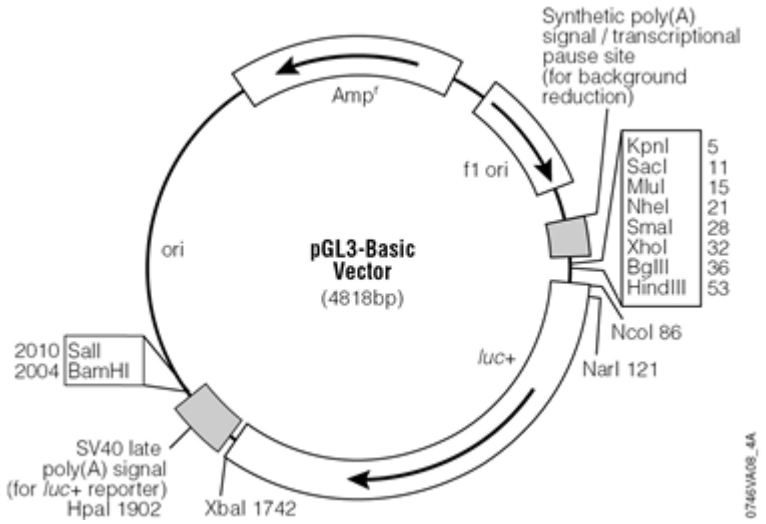
préparation de la chromatine fragmentée est analysée par une électrophorèse sur gel de 1% d'agarose en TBE 1X.

B. Immunoprécipitation des protéines d'intérêt

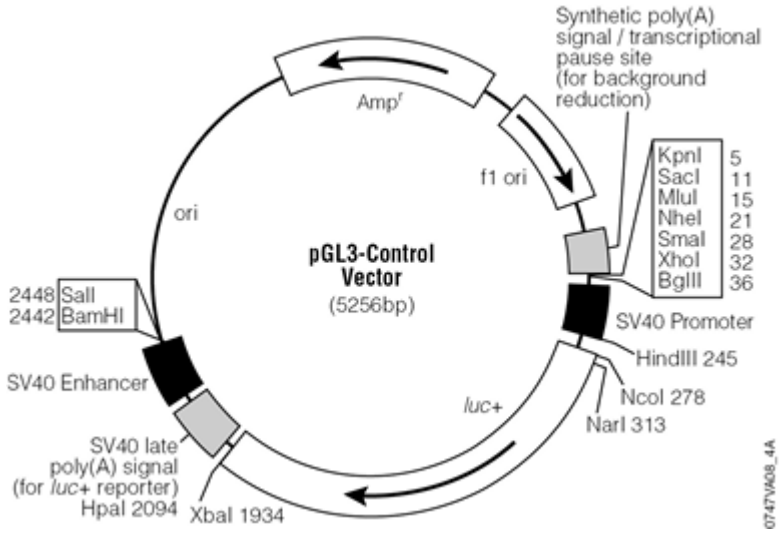
Chaque immunoprécipitation est réalisée à l'aide des solutions fournies dans le kit commercial. Brièvement, le mélange pour chaque réaction est réalisé dans un volume final de 100 µl contenant 25 µl de billes de protéines G magnétiques, un volume correspondant au minimum à 6,3 µg de chromatine fragmentée, 10 µl de tampon d'incubation (ChIP Buffer 1), 1µl % de PIC, 2 µg d'anticorps polyclonaux spécifiques dirigés contre les protéines d'intérêt telles que Sp1 (PEP2 : sc-59X, Santa Cruz Biotechnology), AP-2α (C-18 : sc-184X, Santa Cruz Biotechnology), DDB2 (H-127 : sc-25368, Santa Cruz Biotechnology) ou encore l'Immunoglobuline G (A9169, Sigma) servant de témoin négatif, le tout complété par de l'eau stérile. L'ensemble est ensuite placé à 4°C pendant 4 heures sous rotation. Après 3 lavages à l'aide des tampons ChIP 1 et 2 fournis dans le kit commercial, la chromatine retenue sur les billes magnétiques de protéine G est éluée par 50 µl de tampon d'élution fourni dans le kit commercial durant 15 min à température ambiante. Afin d'enlever les protéines fixées sur la chromatine éluée, cette dernière est traitée avec 1 µg de protéinase K pendant 1 heure à 37°C. L'addition d'un tampon d'arrêt de l'activité protéinase K est effectuée et l'ADN libéré de la chromatine est conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

C. Analyse par PCR

L'ADN isolé par immunoprécipitation est amplifié par PCR, selon la méthode décrite au paragraphe III.3, en utilisant des amorces spécifiques qui encadrent un fragment de 217 pb de la région proximale du promoteur du gène de la SOD Mn, contenant les éléments de réponse des protéines Sp1, AP-2α et DDB2. La séquence de ces amorces est la suivante : l'amorce sens 5'-CGGCAGCGCAACCAAAACTCAG-3' et antisens 5'-CACGGGAGAAAGGAGGCTGCAG-3', ayant 62°C pour température d'hybridation. La région proximale du promoteur précédemment immunoprécipitée, est amplifiée après 40 cycles de PCR, et les résultats sont analysés sur gel de 1,5% d'agarose, calibré par un marqueur de taille connu (Gene Ruler 100 pb Plus DNA Ladder). L'exploitation des résultats est réalisée avec le logiciel Quantity One sur l'appareil GelDoc 2000 (BioRad)



<u>Figure 27</u> : Représentation de la carte du plasmide pGL3 utilisé comme vecteur pour cloner les différentes parties de la région 5' du gène de la SOD Mn.
Le vecteur pGL3 (Promega, Madison, WI) contient le gène rapporteur, la luciférase et un gène de résistance à l'ampicilline, ainsi qu'une région de clonage portant les sites de coupure pour différentes enzymes de restriction.



<u>Figure 28</u> : Représentation de la carte du plasmide pGL3-Control Vector utilisé comme vecteur pour cloner la partie de la région 5' du gène de la SOD Mn allant des nucléotides -3340 à –426 par rapport au site d'initiation de la transcription (+1).
Le vecteur pGL3-control vector (Promega, Madison, WI) contient le gène rapporteur, la luciférase et un gène de résistance à l'ampicilline, un promoteur basal fort de type SV40, ainsi qu'une région de clonage portant les sites de coupure pour différentes enzymes de restriction.

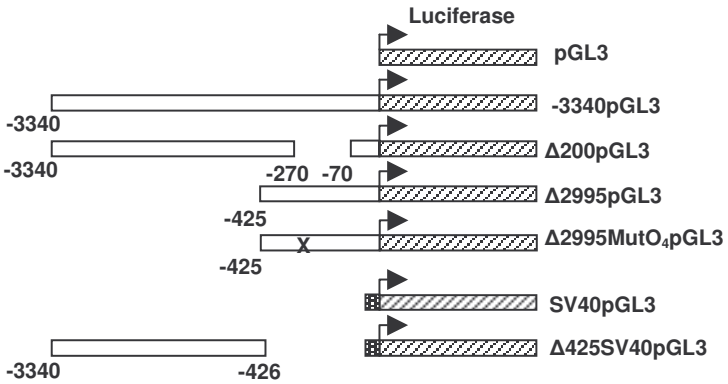
3. Etude de l'activité transcriptionnelle des protéines nucléaires sur l'ADN

A. Construction des plasmides contenant les différentes parties du promoteur du gène de la SOD Mn

Les différentes constructions, nécessaires à l'étude de la régulation de l'expression de la SOD Mn ont été réalisées à partir d'un plasmide pGL3 basique (**Figure 27**), dans lequel la région 5' flanquante (3,6 kb) du gène de l'enzyme antioxydante a été insérée. Cette région de 3,6 kb est comprise entre les nucléotides –3340 à +260 par rapport au site d'initiation de la transcription (+1). Ce plasmide, que nous avons appelé **-**3340pGL3, a été grâcieusement fourni par le Docteur Moon B. Yim [Kim *et al*. 1999].

Le plasmide témoin correspondant est réalisé en procédant à la délétion d'environ 200 pb dans la région promotrice du gène, qui inclue la région de fixation de DDB2, par une digestion du plasmide –3340pGL3 avec les enzymes de restriction *BssH II* et *Pvu II*. Les parties complémentaires des extrémités simples brins du vecteur plasmidique ainsi ouvertes sont ensuite resynthétisées à l'aide de l'activité ADN polymérase du fragment de Klenow (Fermentas) durant 30 min à 37°C, puis liées de façon covalente à l'aide de la T4 ligase, 10 min à température ambiante. La construction plasmidique ainsi réalisée est appelée Δ200pGL3 (**Figure 29**).

Le plasmide, contenant uniquement la région proximale du promoteur du gène de la SOD Mn (nucléotides -425 à +260), a été obtenu après digestion du plasmide –3340pGL3, par les enzymes de restriction *Kpn I* et *Stu I* (Promega, Charbonnières, France) et est appelé Δ2995pGL3. La partie, qui résulte de la digestion précédente, c'est-à-dire allant des nucléotides -3340 à -426, est insérée dans le plasmide SV40pGL3, préalablement linéarisé par les enzymes de restriction *Kpn I* et *Sma I* et déphosphorylé comme précédemment, pour s'appeler au final Δ425SV40 (**Figures 28 et 29**).



<u>Figure 29</u> : Représentation schématique du plasmide de base -3340pGL3 contenant la région 5' flanquante du gène de la SOD Mn (région comprise entre les nucléotides –3340 et +260 par rapport au site d'initiation de la transcription (+1)) et des différentes constructions plasmidiques contenant des délétions de parties de la région promotrice (Δ200pGL3, Δ2995pGL3, Δ2995MutO$_4$pGL3, Δ425SV40pGL3).

B. Mutagenèse dirigée de la région nucléotidique O_4

La séquence nucléotidique O_4 (**Figure 26**) est enlevée après digestion du vecteur plasmidique Δ2995pGL3 par les enzymes de restriction *Nhe I* et *Pas I* (respectivement Promega et Fermentas), avant d'être remplacée par la séquence correspondant à l'oligonucléotide O_4 muté 3 (**Figure 26**) qui ne fixe pas DDB2 et portant les sites de coupure des deux enzymes de restriction pour générer un plasmide appelé Δ2995MutO_4pGL3 (**Figure 29**).

C. Transfection transitoire et activité luciférase

Les cellules MDA-MB231 et MCF-7 sont transfectées de façon transitoire avec les plasmides, dans les conditions décrites dans le paragraphe I.7. Ces cellules sont co-transfectées avec 1 µg des différentes constructions plasmidiques pGL3 et 0,2 µg d'un plasmide contrôle appelé pSV40/SEAP, qui contient un gène codant la phosphatase alcaline placentaire ou SEAP (BD Biosciences Clontech). Après 24 h, l'activité phosphatase alcaline est mesurée dans le milieu de culture des cellules transfectées à l'aide d'un kit commercial (BD Biosciences Clontech). Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du D-PBS, puis lysées à l'aide d'un tampon de lyse avant de mesurer l'activité luciférase à l'aide d'un kit commercial (Roche), dans le surnageant obtenu après centrifugation. La luminescence émise lors des réactions enzymatiques est quantifiée en Unité Relative de Lumière (URL) à l'aide d'un luminomètre (TD-20/20, Turner designs, Sunnyvalley, CA, USA). Les résultats sont exprimés en activité relative de la luciférase, qui correspond au nombre d'URL de luciférase divisé par celui de la SEAP pour chaque construction plasmidique, et sont présentés comme la moyenne ± écart-type des valeurs de trois expériences indépendantes, chaque expérience ayant été répétée au minimum 3 fois.

III ETUDE DE L'EXPRESSION DE GENES AU NIVEAU TRANSCRIPTIONNEL (RT-PCR)

1. Extraction des ARN totaux

A partir de cultures de cellules confluentes à 90%, lavées deux fois avec du D-PBS, puis congelées à –80°C, l'extraction des ARN totaux est réalisée selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987), en ajoutant 1 ml de « RNA Now » (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Un volume de 200 µl de chloroforme y est ajouté, puis l'ensemble est mélangé vigoureusement avant d'être centrifugé à 12000 g à 4°C pendant 15 min. Après avoir isolé le surnageant correspondant à la phase aqueuse, un volume d'isopropanol est ajouté, puis les tubes sont placés à –20°C pendant 1 heure minimum. Le mélange est ensuite centrifugé à 12000 g à 4°C pendant 10 min. Le culot d'ARN totaux obtenu est alors lavé par de l'éthanol 75% froid, avant d'être dissout dans de l'eau stérile. Le dosage des ARN est effectué par spectrophotométrie en mesurant la DO à 260, en tenant compte du facteur de dilution et du fait qu'une unité de DO équivaut à 40 µg/ml d'ARN. Une double mesure à 280 nm permet d'estimer la contamination des ARN totaux par des protéines. Les expériences suivantes ont été réalisées avec des ARN pour lesquels le rapport de DO 260 nm/280 nm était supérieur à 1,8.

2. Transcription inverse (RT)

La synthèse d'ADNc est réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux extraits précédemment, selon une méthode utilisant une solution à 0,2 µg/ml d'amorces aléatoires diluée 15 fois (Invitrogen). Dans un volume final de 20 µl, sont ajoutés : 250 mM de tampon (Invitrogen), 0,5 mM de dNTP (Fermentas, St. Rémy Lès Chevreuse, France), 0,1 mM de DTT (Invitrogen), et 200 unités de reverse transcriptase (M-MLV, Invitrogen). Le mélange réactionnel est ensuite incubé pendant 2 heures à 37°C.

Gènes	Amorces Sens et Antisens	Taille des fragments amplifiés	Température d'hybridation
β-actine	5'-GGCTCCGGCATGTGCAAGGC-3' 5'-AGATTTTCTCCATGTCGTCC-3'	220 pb	45°C
SOD Mn	5'-CGACCTGCCCTACGACTAC-3' 5'-TGACCACCACCATTGAACTTC-3'	200 pb	45°C
SOD Cu/Zn	5'-CTGCATGGATTCCATGTTCATGAG-3' 5'ACTTTCTTCATTTCCACCTTTGCC3'	300 pb	50°C
Sp1	5'-AGCAGGTGGAGAGGAAGG-3' 5'-CGCAGGTGAGAGGTCTTG-3'	200 pb	58°C
AP-2α	5'-CTCCTCCACCTCCTCTCC-3' 5'-ATTATCCGTCAATTTCCAAAGC-3'	150 pb	55°C
DDB2	5'-GCGACGAAGGCCGTGTGCGTGC-3' 5'-ACTTTCTTCATTTCCACCTTTGCC-3'	300 pb	54°C
DDB1	5'-GACCTGCCCTACGACTAC-3' 5'-GACCACCACCATTGAACTTC-3'	300 pb	60°C
ERα	5'-GGAGACATGAGAGCTGCCAAC-3' 5'-CCAGCAGCATGTCGAAGATC-3'	360 pb	54°C
MDR1	5'-AAGCTTAGTACCAAAGAGGCTCTG-3' 5'-GGCTAGAAACAATAGTGAAACAA-3'	240 pb	47°C

<u>Tableau 2</u> : Séquences des différentes amorces spécifiques de chaque gène utilisées pour les réactions de PCR, ainsi que la taille des fragments d'ADNc amplifiés et la température d'hybridation optimale de chaque amorce.

3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est réalisée avec les ADNc précédemment synthétisés par RT, dans un volume final de 50 µl. L'ensemble de la PCR contient 2µl d'ADNc, 250 mM de tampon PCR 10X (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 0,2 mM de dNTP (Fermentas), 1 µM d'amorces spécifiques et 2,5 unités de Taq polymérase (Invitrogen). Les amorces sens et antisens spécifiques de chaque gène utilisé pour la PCR sont décrites dans le Tableau 1 et proviennent toutes de la société Eurogentec.

Le milieu réactionnel de PCR est placé dans un thermocycleur (BioRad) et soumis à une dénaturation initiale durant 3 min 30 à 94°C, suivie de 35 cycles comprenant une dénaturation de 30 s à 94°C, une hybridation à une température variable selon les amorces utilisées (**Tableau 2**) durant 30 s et une élongation à 72°C de 30 s. Ce programme est terminé par une élongation finale à 72°C durant 10 min.

Les fragments amplifiés sont analysés comme dans le paragraphe I.3.A.1., par électrophorèse en gel d'agarose à 2%. Le gel est calibré par un marqueur de taille connu (Gene Ruler 100 pb Plus DNA Ladder, Fermentas) et déposé en même temps que les échantillons. L'exploitation des résultats est réalisée avec le logiciel Quantity One sur l'appareil GelDoc 2000 (BioRad).

IV ETUDE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES PAR IMMUNOREPLIQUE (WESTERN BLOTTING)

1. Extraction et dosage des protéines totales

Les cellules sont récupérées et lysées dans un tampon Tris/HCl 10 mM, pH 7.2 contenant 5 mM d'EDTA, 1% de Triton X100 ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases, puis lysées pendant 20 minutes sur la glace. Après une centrifugation à 17000 g pendant 20 minutes à 4°C, les protéines présentes dans le surnageant sont dosées selon la méthode de Lowry *et al*. (1951) à l'aide d'une trousse de dosage commercialisée (DC protein Assay, BioRad). La concentration protéique est ensuite déterminée spectrophotométriquement à 750 nm en utilisant une gamme étalon correspondant à différentes concentrations connues d'albumine sérique bovine (BSA).

2. Electrophorèse et transfert des protéines sur membrane

Les protéines totales d'un extrait cellulaire (50µg) sont séparées selon leur taille en conditions dénaturantes selon la méthode de Laemmli (1970), après une dénaturation à 100°C durant 5 min dans un tampon de Laemmli (Tris/HCl 62,5 mM (pH 6,8) contenant 2% de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), 20% de saccharose et du bleu de bromophénol). Les protéines totales dénaturées sont déposées dans un gel de concentration contenant 5% de polyacrylamide préparé dans un tampon Tris/HCl 0,25 M (pH 6,8) contenant 0,1% de SDS, puis sont séparées dans un gel de séparation contenant 10 ou 12% de polyacrylamide selon les cas, préparé dans un tampon Tris/HCl 0,375 M (pH 8,8) contenant 0,1% de SDS. L'électrophorèse est ensuite réalisée à 30 mA durant 1 heure dans un tampon de migration Tris 0,05 M/Glycine 0,384 M et contenant 0,1% de SDS (pH 8,3).

Les protéines sont ensuite transférées du gel sur une membrane de Nylon de polyvinyldifluoride ou PVDF (NEN, France) à l'aide d'un appareil de transfert (BioRad) entre deux piles de feuilles de papier Whatman imbibées de tampon Tris (48 mM)/ Glycine (38 mM) (pH 7.9) contenant 0,037% de SDS et 20% de méthanol, pendant 45 min en courant

constant à 80 mA par gel [Towbin *et al.* 1979]. La membrane est calibrée à l'aide de marqueurs de masse moléculaire connue et pré-colorés (Fermentas).

3. Détection immunologique

La présence des protéines étudiées est détectée immunologiquement sur la membrane à l'aide de l'anticorps approprié en utilisant un kit commercial de révélation par chimioluminescence (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Pour éviter toute révélation non spécifique, la membrane est saturée grâce à un agent bloquant (10%) dilué à 1% dans du TBS composé de Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 contenant 150 mM de NaCl pendant 1 heure 30 sous agitation. Les anticorps polyclonaux, dilués dans du TBS contenant 0,5% d'agent bloquant, sont ajoutés au bain d'incubation précédent pendant 1 h 30 min à température ambiante. Pour chacun des anticorps utilisés, la dilution optimale est préalablement définie et rapportée dans le tableau suivant :

Anticorps polyclonaux spécifiques	Dilution	Animal	Origine
Anti-SOD Mn	1/5000	lapin	LabFrontier, Séoul, Corée du Sud
Anti-Sp1	1/200	lapin	PEP2: sc-59, Santa Cruz Biotechnology
Anti-AP-2α	1/500	lapin	A0844, Sigma
Anti-SOD Cu/Zn	1/5000	mouton	Biovalley, Marne la Vallée, France
Anti-DDB2, Anti-DDB1	1/1000	lapin	Développés chez le lapin au laboratoire contre un peptide correspondant à DDB2 ou DDB1 couplé à l'hémaglutinine de patelle
Anti-catalase	1/1000	lapin	El Bouhtoury *et al*. 1992
Anti-GPx	1/500	lapin	LabFrontier, Séoul, Corée du Sud
Anti-PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)	1/1000	lapin	FL-261 : sc-7907, Santa Cruz Biotechnology
Anti-peroxiredoxine 3	1/1000	lapin	P 1247, Sigma

Après 3 lavages de 5 min chacun avec du tampon TBS-Tween (Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 ; 150 mM de NaCl et 0,1% de Tween 20) puis un lavage avec du TBS contenant 0,5% d'agent bloquant, la membrane est incubée pendant 30 min à température ambiante avec les anticorps anti-immunoglobulines de lapin à 0,04 U/ml (A9169, Sigma) ou de mouton couplés à la peroxydase et dilués dans du TBS contenant 0,5% d'agent bloquant. Après 3 lavages de 5 min chacun avec du TBS-Tween 0,1%, l'activité de la peroxydase est révélée à l'aide du substrat chimioluminescent. La bande correspondant à la protéine spécifique reconnue par l'anticorps primaire est visualisée après exposition de la membrane sur un film photographique (X-Omat, Kodak).

Après la révélation immunologique, la membrane est colorée durant 5 min dans une solution de bleu de Coomassie, puis séchée à température ambiante, afin de montrer l'équivalence en quantité des protéines déposées dans chaque piste.

V ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES PROTEINES

1. Analyse de l'activité des enzymes antioxydantes

A. Activité des SOD sur gel

Les cellules MDA-MB231 et MCF-7 cultivées jusqu'à environ 90% de confluence sont lysées dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7,8 contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases, par trois cycles de congélation et décongélation. Après centrifugation à 17000 g et à 4°C, les protéines du lysat cellulaire, contenues dans le surnageant sont dosées de la même manière que celle décrite dans le paragraphe II.1.A.

Les protéines (50 µg) sont reprises dans le tampon de reprise Tris/Glycine contenant 20% de saccharose et du bleu de bromophénol, et sont déposées sur un gel de polyacrylamide de 8% préparé dans un tampon Tris/HCl 0,375 M (pH 8,8) ne contenant pas de SDS. L'électrophorèse est ensuite réalisée dans un tampon de migration Tris/Glycine sans SDS, de pH 8,3 à 30 mA durant 1 heure.

Selon la méthode décrite par Beauchamp et Fridovich (1971), le gel est ensuite plongé dans de l'eau distillée contenant 0,25 mg/ml de Nitrobleu de Tétrazolium pendant 20 min, puis dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,8 contenant 28 µM de Riboflavine et du TEMED (0,417 ml/ml de tampon) pendant 15 min, le tout à l'abri de la lumière et à température ambiante. L'intensité des bandes achromatiques, révélant l'activité des SOD sur le fond bleu du gel, est ensuite quantifiée par densitométrie sur le système Gel Doc 2000 (BioRad).

B. Dosage enzymatique de la catalase et de la Glutathion Peroxydase (GPX)

Les lysats cellulaires de MDA-MB231 et MCF-7 sont préparés comme pour la mise en évidence des activités SOD. L'activité de la catalase est ensuite mesurée de façon colorimétrique selon la méthode de Fossati *et al*. (1980), à l'aide d'un kit commercial (Sigma). Ce dosage est basé sur la mesure de la quantité d'H_2O_2 restant après action de la catalase. Brièvement, la méthode colorimétrique utilise l'acide 3,5-dichloro-2-

hydroxybenzène-sulfonique qui réagit avec le 4-aminoantipyrine en présence d'H_2O_2 et de peroxydase pour donner un chromophore absorbant à 520 nm. Une unité de catalase est définie comme la quantité d'enzyme qui dégrade une µmole d'H_2O_2 en O_2 et H_2O par minute. Une courbe étalon est préalablement établie à l'aide des réactifs du kit commercial et de différentes quantités d'H_2O_2 ajoutées.

L'activité de la GPX est mesurée en suivant l'oxydation du NADPH en NADP à 340 nm selon la méthode décrite par Flohé et Günzler (1984), qui utilise le tert-butylhydroperoxyde comme substrat. L'activité d'une unité de GPX correspond à une nmole de NADPH consommée par minute.

2. Analyse de l'activité gélatinase sur gel

Les cellules MDA-MB231 et MCF-7 à environ 90% de confluence dans une plaque de 6 puits, sont cultivées durant 24 heures dans 1 ml de milieu RPMI sans SVF. Le surnageant contenant les activités gélatinases, est ensuite récupéré et concentré à l'aide d'un microcon YM10 (Mililipore) à 13000 g et à 4°C pendant 45 min. Des échantillons de surnageant (10 µl) sont repris dans un tampon Tris/HCl 62,5 mM pH 6,8 contenant 2% de SDS et 20% de saccharose, et déposés dans un gel de concentration à 5% de polyacrilamide préparé comme dans le paragraphe IV.2. Les activités gélatinases sont séparées dans un gel inférieur contenant 10% de polyacrylamide, préparé comme précédemment (paragraphe IV.2.), mais contenant 0,1% de gélatine. L'électrophorèse est ensuite réalisée à 30 mA pendant 1 heure dans un tampon de migration Tris/Glycine avec SDS.

Après incubation du gel dans un tampon Tris/HCl 50 mM pH 8 contenant 2,5% de triton X-100 durant 3 heures à température ambiante, puis un rinçage à l'eau, les gélatinases sont renaturées par incubation avec du tampon Tris/HCl 50 mM pH 8 contenant 10 mM de $CaCl_2$, 50 mM de NaCl et 50 mM d'Azide de Na durant 20 heures à 37°C. L'activité gélatinase est ensuite révélée dans une solution de Bleu de Coomassie à 0,2% (p/v) dans 25% d'isopropanol et 10% d'acide acétique durant 30 min à température ambiante. Après décoloration dans un bain contenant 10% de méthanol et 10% d'acide acétique, les bandes non colorées correspondant aux activités gélatinases, apparaissent dans le gel.

VI DOSAGE DU GLUTATHION ET DU PEROXYDE D'HYDROGENE

1. Mesure de la quantité intracellulaire de glutathion (GSH) total et réduit

Les cellules tumorales mammaires MDA-MB231 cultivées jusqu'à 80% de confluence sont lysées dans 300 µl d'acide perchlorique (3,3% v/v). Après 10 min de centrifugation à 12000 g à 4°C, la quantité intracellulaire de glutathion total et réduit est mesurée dans le surnageant par chromatographie liquide haute performance (HPLC), préalablement calibrée avec une solution étalon contenant différentes concentrations de glutathion réduit, selon la méthode décrite par Leroy *et al.* (1993). Dans les culots, les protéines précipitées sont solubilisées dans 200 µl de NaOH et dosées selon la méthode de Lowry *et al.* (1951). Le niveau de GSH est ainsi exprimé en nmoles/mg de protéines. La quantité de GSH oxydé est donc calculée en soustrayant la quantité de GSH réduit à celle de GSH total.

2. Dosage du taux d'H_2O_2 intracellulaire

La mesure de la production d'H_2O_2 intracellulaire dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB231 est basée sur l'oxydation par l'EAO d'une molécule non fluorescente, la 2',7'-dichlorofluorescin-diacétate (DCFH-DA) (Sigma) en un dérivé fluorescent, la dichlorofluorescéine (DCF). Les cellules tumorales mammaires sont ensemencées à raison de $4x10^5$ /ml dans une plaque de 6 puits et préalablement traitées ou non avec différents antioxydants comme la NAC (5 mM), le pyruvate (10 mM), la catalase-polyéthylène glycol (200 U/ml) ou encore avec 2 µM de MnTMPyP. Après 24 heures de traitement, le milieu de culture est remplacé par du D-PBS contenant 50 µM de DCFH-DA pendant 45 min à 37°C à l'obscurité. Avant les analyses, les cellules sont lavées trois fois au D-PBS et sont ensuite récupérées dans un tampon de lyse constitué de 10 mM Tris/HCl à pH 7.4, 5 mM d'EDTA, 1% de Triton X100, 0,1% de SDS et un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Après 5 min de centrifugation à 14000 g et à 4°C, 200 µl de surnageant sont

prélevés et utilisés pour mesurer l'intensité de fluorescence de la DCF soumise à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission à 530 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaques (SAFAS, Monaco). Comme témoin positif de l'expérience, les cellules sont traitées avec 0,5 mM d'H_2O_2 pendant 30 min avant l'incubation avec le DCFH-DA. Afin de vérifier la spécificité de la mesure de la production d'H_2O_2 intracellulaire, les cellules sont incubées en présence de 50 µM de DCF (Sigma), le dérivé oxydé fluorescent de la molécule de DCFH-DA.

CHAPITRE 3

* * *

RESULTATS

RESULTATS

* * *

I ETUDE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION DU GENE *SOD2* DANS LES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES HUMAINES ŒSTROGENES-DEPENDANTES

1. Identification de la protéine DDB2 comme un nouveau régulateur transcriptionnel de l'expression constitutive du gène *SOD2*

A. Résultats préliminaires obtenus antérieurement

Les mécanismes moléculaires expliquant une expression constitutive distincte de la SOD Mn selon le type de cellules cancéreuses ne sont pas clairement établis. Dans ce sens, une recherche de facteurs protéiques pouvant réguler l'expression constitutive ou induite de la SOD Mn dans différents modèles de cellules cancéreuses mammaires a été entreprise au sein du laboratoire d'accueil. La région proximale ayant été montrée importante dans l'expression constitutive de l'enzyme antioxydante, une analyse systématique des protéines se fixant sur cette partie du promoteur a été entreprise antérieurement à ce travail de thèse, à l'aide d'expériences de retard sur gel avec différentes sondes oligonucléotidiques radiomarquées (O_1 à O_5). Seule une sonde oligonucléotidique (O_4) correspondant aux nucléotides –230 à –200 pb, a permis de piéger un complexe ADN-protéine retardé sur gel, dans des extraits nucléaires de cellules tumorales mammaires MCF-7. Ce complexe protéique a été observé par des expériences de southwestern blot et d'UV-crosslinking, ceci uniquement dans les extraits nucléaires et non cytoplasmiques. La purification de ce complexe protéique a été réalisée par chromatographie d'affinité, utilisant la sonde oligonucléotidique O_4 et des extraits nucléaires de cellules MCF-7. L'analyse par spectrométrie de masse sur la fraction purifiée (en collaboration avec le Pr J. Van Beeumen, Université de Gand, Belgique) a permis

l'identification de la DDB2 comme la protéine majeure du complexe interagissant avec la région O_4 du promoteur proximal du gène de la SOD Mn.

B. Caractérisation de la séquence d'ADN fixant la protéine DDB2 dans la région proximale du promoteur du gène de la SOD Mn

A l'issue de ces résultats préliminaires, le présent travail a tout d'abord consisté à confirmer la fixation de la protéine DDB2 sur la région proximale du promoteur du gène de la SOD Mn, dans le modèle cellulaire d'adénocarcinome mammaire MCF-7 par des expériences à la fois *in vitro*, telles que le super retard sur gel, et *in vivo*, comme l'immunoprécipitation sur chromatine, à l'aide d'anticorps polyclonaux spécifiques. Ces derniers ont d'ailleurs permis de localiser par immunocytochimie la DDB1 à la fois dans le noyau et le cytosol et la DDB2 strictement dans le noyau au sein des cellules MCF-7. De même, l'introduction de l'ADNc codant la DDB2, à la fois dans des cellules de rein de singe immortalisées de type COS-7 ainsi que dans les cellules MCF-7, a permis de confirmer par gel retard les capacités spécifiques de la fixation de cette protéine sur la séquence correspondante à l'oligonucléotide O_4. Au contraire, l'inhibition de l'expression de la DDB2 par la stratégie de l'ARN interférence (modèle développé par une doctorante du laboratoire) entraîne une diminution importante de la fixation de la protéine sur la sonde oligonucléotidique O_4. Enfin, nous avons montré que l'absence de complexe sur la sonde oligonucléotidique O_4 dans la lignée MDA-MB231 dépend d'un défaut d'expression de la DDB2 dans ces cellules tumorales mammaires, puis que l'introduction du gène codant cette protéine dans ces cellules (modèle développé par une doctorante du laboratoire) permet d'obtenir une activité de fixation sur l'ADN.

Afin de caractériser avec précision la séquence d'ADN fixant la protéine DDB2, plusieurs oligonucléotides mutés sur deux bases de la séquence O_4 ont été synthétisés et utilisés dans des expériences de retard sur gel, avec des extraits nucléaires de cellules MCF-7. Certaines substitutions localisées dans un pentanucléotide répété et séparé par deux nucléotides charnières, diminuent l'activité de fixation de la protéine DDB2 sur l'ADN. La séquence spécifiquement reconnue par la DDB2 s'avère ainsi correspondre à la répétition pentanucléotidique suivante, séparée par deux nucléotides charnières : AGCCTGCAGCCT localisée entre plusieurs sites de fixation des facteurs de transcription Sp1 et AP-2α dans la région proximale.

C. Rôle de la protéine DDB2 dans la régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn

Pour cette étude, nous avons disposé d'un vecteur plasmidique, contenant une région de 3040 pb et correspondant à la région promotrice caractérisée du gène de la SOD Mn (grâcieusement fourni par le Dr. Moon B. Yim [Kim *et al*. 1999]. A l'aide de cet outil, nous avons montré que la partie proximale, s'étendant de –425 à -70 du site d'initiation de la transcription (+1) est principalement responsable de l'expression constitutive de la SOD Mn qui dépend de la région promotrice du gène. Nous avons montré qu'il existe une corrélation inverse entre l'expression de la DDB2 et celle de la SOD Mn entre les cellules MCF-7 et les MDA-MB231.

A l'aide du modèle de cellules MCF-7 ayant l'expression de la DDB2 fortement diminuée par ARN interférence, nous avons étudié les conséquences sur l'expression de la SOD Mn. Nos résultats révèlent que la DDB2, en interagissant avec sa séquence spécifique située dans la région proximale du promoteur du gène de la SOD Mn, impose une expression constitutive faible dans les cellules MCF-7. En effet, l'analyse fonctionnelle du promoteur, lui même placé en amont d'un gène rapporteur, révèle que l'inhibition de l'expression de la DDB2 entraîne une augmentation de son expression, comparativement aux témoins. De même, lorsque le site de fixation de DDB2 est muté dans la région proximale du promoteur du gène de la SOD Mn qui contrôle le gène rapporteur, l'expression de celui-ci est augmentée dans les cellules MCF-7 qui surexpriment naturellement la DDB2. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse transcriptionnelle et traductionnelle du gène de la SOD Mn, à la fois dans les cellules MCF-7 dont l'expression de DDB2 est inhibée et dans les cellules MDA-MB231 qui surexpriment la DDB2 après introduction de son gène.

L'ensemble de ces résultats décrit ainsi pour la 1 ère fois, que la DDB2 joue directement un rôle de régulateur de la transcription d'un gène cible, dont on connaît l'implication dans la croissance des cellules tumorales, en se fixant sur un élément de réponse qui est défini également pour la 1 ère fois.

L'implication de la DDB2 est indépendante d'un mécanisme de régulation épigénétique, telle que la méthylation, puisque l'exposition des cellules MCF-7 à deux concentrations différentes et à différents temps d'un inhibiteur de méthylases, la 5-azacytidine, ne change pas significativement l'expression du gène *SOD2*. De même, l'action de la DDB2 semble indépendante de celle du facteur de transcription AP-2α, qui est connu également pour réguler négativement l'expression constitutive du gène de la SOD Mn dans

d'autres types de cellules cancéreuses, en agissant sur plusieurs sites de fixation proches de celui reconnu par la DDB2, dans la partie proximale du promoteur du gène de l'enzyme antioxydante. La présence de ces facteurs de transcription a d'ailleurs été mise en évidence dans cette partie proximale du promoteur du gène de la SOD Mn par immunoprécipitation sur la chromatine. Enfin, l'expression de ce facteur de transcription ainsi que Sp1, par Western blot, ainsi que par gel retard avec des extraits nucléaires (résultats non montrés) ne change pas quelque soit l'expression de la DDB2.

D. Signification biologique de la régulation de l'expression constitutive du gène *SOD2* par la DDB2

Le rôle de la DDB2 dans la régulation de cette expression constitutive de la SOD Mn laisse à penser que ce mécanisme est impliqué dans la croissance tumorale. En effet, l'implication biologique de la SOD Mn dans la croissance tumorale dépend en partie de son expression constitutive. Nous avons donc développé une nouvelle lignée stable de cellules MCF-7 ayant déjà l'expression de la DDB2 inhibée, et dans laquelle l'expression constitutive de la SOD Mn, augmentée en conséquence, est à son tour diminuée en utilisant la stratégie d'ARN antisens (MCF-7 DDB2-siRNA MnSOD AS). Les résultats montrent que l'inhibition de la SOD Mn dans les cellules MCF-7 DDB2-siRNA entraîne une stimulation de la prolifération cellulaire, ainsi qu'une augmentation de leur capacité à former des colonies. Ces résultats mettent ainsi en évidence un nouveau mécanisme dans lequel la DDB2 joue un rôle dans la croissance des cellules tumorales mammaires oestrogènes-dépendantes, en exerçant une régulation négative du gène *SOD2*.

Ces résultats font l'objet d'un article publié en 2009 dans *Journal of Biological Chemistry* :

<u>Article 1</u>: "Identification of Damaged DNA Binding 2 protein as a transcriptionnal regulator of the constitutive *sod2* gene expression in human breast cancer cells."

JBC Papers in Press. Published on April 1, 2009 as Manuscript M808208200
The latest version is at http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M808208200

IDENTIFICATION OF DAMAGED DNA BINDING 2 PROTEIN AS A TRANSCRIPTIONAL REGULATOR OF THE CONSTITUTIVE *SOD2* GENE EXPRESSION IN HUMAN BREAST CANCER CELLS

Vanessa Minig[1], Zilal Kattan[1], Josef van Beeumen[2], Emilie Brunner[1], and Philippe Becuwe[1]

From Laboratory of Cell Biology, EA 4001 PREDICTHER, Henri Poincare's University-Nancy I, France[1]; and from Laboratory for Protein Biochemistry and Protein Engineering, Ghent University, 9000 Gent, Belgium[2]

Running head: DDB2 regulates basal *sod2* expression in breast cancer cells

Address correspondence to: Philippe Becuwe, Professor, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Fax: +33-3-83-68-42-19; E-mail: becuwe@scbiol.uhp-nancy.fr

Manganese superoxide dismutase (MnSOD) plays a role in breast tumor cell growth, which depends on its constitutive expression. However, the mechanisms responsible for the regulation of constitutive *sod2* gene expression, at different malignant phenotype in breast cancers remain to be determined. The present study reports the identification and characterization of a DNA sequence located in the proximal promoter of the *sod2* gene, which forms a complex with a nuclear protein from breast tumor MCF-7 cells. Purification of this complex showed that it contained the Damaged DNA-Binding 2 (DDB2), a well known protein involved in nucleotide excision DNA repair and cell cycle regulation. Functional analysis of the proximal promoter of the *sod2* gene or modulation of DDB2 expression, allowed us to demonstrate that DDB2 regulates negatively the constitutive expression of the *sod2* gene in breast cancer cells. We demonstrate that the binding of DDB2 was associated with the loss of acetylated H3 histones and the decrease in the binding of Sp1 but not AP-2α transcription factors to the *sod2* proximal promoter. In addition, we show that DDB2 exerts, at least in part, a control of breast cancer cell growth through its negative regulation of constitutive expression of the *sod2* gene. For the first time, these data give supporting evidence that DDB2 is a new transcriptional regulator, and they provide insight into the molecular function of breast cancer cell growth which will have an important clinical interest.

Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is a mitochondrial enzyme involved in the dismutation of the superoxide radical ($O_2^{\bullet}$-) into hydrogen peroxide (H_2O_2) and molecular oxygen (O_2). H_2O_2 then is converted to water by either catalase, glutathione peroxidase or peroxiredoxins (1). Also, MnSOD works in concert with these H_2O_2-detoxifying enzymes to protect cells from the damage associated with exposure to reactive oxygen species (ROS), and from inflammatory cytokines and ionizing radiation (2,3). MnSOD is encoded by the nuclear *sod2* gene located on chromosome 6q25. The *sod2* gene is rapidly up-regulated in response to numerous stimuli such as cytokines, depending on multiple enhancer elements located into the proximal promoter and the second intron, this latter being recognized by NF-κB, C/EBP and NF-1 transcription factors (4). In addition, the proximal promoter of the *sod2* gene is characterized by a lack of TATA or CAAT boxes and exhibits the presence of a GC-rich region containing binding sites for Sp1 and AP-2 transcription factors (5). This proximal promoter could be responsible of the

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

Copyright 2009 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

basal transcription of *sod2* gene in several cell lines.

It has been reported that MnSOD plays a role in cancer, depending on its constitutive expression. In vitro studies have shown that a low-MnSOD expression is correlated with a high-rate tumor cell growth, whereas high-MnSOD content is associated with the invasive and metastatic properties of tumor cells (6). Alteration in the MnSOD expression is also associated with that of H_2O_2-detoxifying enzymes, in tumor cells as compared to the normal counterparts (7,8), leading to an imbalance in the redox state by an increase in the level of ROS (9,10). Indeed, transcription of the *sod2* gene may be either upregulated or repressed in tumor cells, depending on malignant phenotype. It has been described that the down-regulated expression of the *sod2* gene in cancer cells may be due, in part, to defects in transcriptional regulation of the gene (11), because of either mutations in the proximal promoter (12), or abnormal methylation (13). However, mechanisms underlying upregulation of *sod2* gene in other cancer cells remain largely unknown.

Breast cancer cells display altered transcription of *sod2* gene. Recently, our previous study and a clinical investigation reported that metastatic breast tumor cell lines contain elevated levels of MnSOD and decreased levels of H_2O_2-detoxifying enzymes, as compared with nonmetastatic breast tumor cell lines, and that this correlates with an increased invasiveness (14,15). However, the mechanisms responsible for the regulation of *sod2* gene expression, depending on the malignant phenotype in breast cancer remain to be determined. Only decreased MnSOD expression in the breast cancer MDA-MB 435 cell line is attributed to epigenetic mechanisms rather than mutations in the proximal promoter of *sod2* gene (16).

We hypothesized that decreased MnSOD transcription in breast cancer cells could be due, at least in part, to the involvement of an unknown transcription factor. We report in this study, the identification and characterization of a new regulatory sequence in the proximal promoter of *sod2* gene, which is bound by a protein identified as Damaged DNA Binding 2 (DDB2). This 48-kDa protein was originally a component of the damage-specific DNA-binding heterodimeric complex DDB, which is involved in nucleotide excision repair of UV-induced DNA damage (17). Recently, we reported that DDB2 is overexpressed in some breast cancer cell lines and plays a role in cell proliferation by controlling the G1/S transition of cell cycle (18). Our present results demonstrate that DDB2 regulates negatively the constitutive transcription of *sod2* gene when it is bound on the proximal promoter, and may exert a control on proliferation of breast tumor cells through this regulation.

Experimental Procedures

Cell culture- Different human breast cancer cell lines were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 % (v/v) fetal calf serum and 5 µg/ml gentamicin (Invitrogen), at 37°C in a water-saturated atmosphere with 5% CO_2 / 95% air. Cells were seeded at 1 x 10^4 cells/ml and treated for 48 or 72 h with 10 or 20 µM 5-azacytidine.

Preparation of total, nuclear and cytoplasmic extracts- Human breast cancer cell lines were harvested and lysed in a 10 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail, at 4°C for 20 min. After centrifugation at 17,000 x *g* for 20 min at 4°C, the supernatant was collected as total protein extract. Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared as described by Olnes and Kurl (19), without modifications. Protein concentrations were determined in the

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

total, nuclear and cytoplasmic extracts according to Lowry *et al.*, (20) using bovine serum albumin as a standard (Bio-Rad).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and supershift assay- Oligonucleotides with complementary sequences at their 3' termini, corresponding to five regions of proximal *sod2* promoter and named O_1 to O_5 were annealed and the protruding single-stranded regions were filled in with (α-^{32}P)dCTP using Klenow fragment of DNA polymerase I (Euromedex). The sequence of each oligonucleotide is shown in Figure 1A. The binding reaction mixture (10 µl) for EMSA, containing 1 ng of DNA probe, 1 µg poly dI-dC, and of nuclear (2 or 5 µg) or cytoplasmic (15 µg) proteins in 10 mM HEPES, pH 7.9, 16 mM KCl, 0.4 mM EDTA, 0.4 mM dithiothreitol, and 2 mM $MgCl_2$, was incubated for 30 min at 0°C. The DNA-protein complexes were resolved in native 5% polyacrylamide gels in 0.5X Tris Borate/EDTA at 100 V for 45 min. The dried gels were exposed to Trimax XM film overnight at -80°C. In order to test the specificity of the binding, competition studies were performed in the presence of a 10 to 100-fold molar excess of unlabeled specific double stranded oligonucleotide O_4, or nonspecific double-stranded probe containing the transcription factor NF-κB consensus site (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'), prior to the addition of 1 ng of the radiolabeled probe. Characterization of the protein binding-DNA element sequence was done by mobility shift assay using different mutated sequences of the oligonucleotide O_4 (referenced in Fig. 2). To identify the proteins present in the complex, supershift assays were carried out with 2 µg of antibodies raised against either DDB1 (Santa Cruz Biotechnology; catalog no. sc25367), DDB2 (Santa Cruz Biotechnology; catalog no. sc25368) or Sp1 proteins (Santa Cruz Biotechnology; catalog no. sc59X), respectively. The antibodies were incubated 15 min at 0°C with nuclear proteins prior to the addition of the specific labeled probe.

Purification procedure- Proteins binding to O_4 oligonucleotide were purified from MCF-7 nuclear extract by DNA affinity chromatography. Briefly, 10 µg of biotinylated double stranded O_4 oligonucleotide (Eurogentec) were incubated with 400 µl streptavidin-agarose beads (Sigma) in buffer A (10 mM HEPES buffer, pH 7.9 containing 40 mM KCl, 5 µg/ml aprotinin and leupeptin, 0.5 mM PMSF and 2 µg/ml poly dI-dC), at room temperature for 30 min. Beads were washed with buffer A and then incubated with 10 mg of nuclear extract at 4°C for 2 hours. Beads were washed once with 5 volumes of buffer A and twice with 5 volumes of buffer B (10 mM HEPES buffer, pH 7.9 containing 100 mM KCl, 5 µg/ml aprotinin and leupeptin, 0.5 mM PMSF and 2 µg/ml poly dI-dC), at 4°C for 5 min. The DNA-binding proteins were then eluted with 3 bed volumes of buffer C (10 mM HEPES buffer, pH 7.9 containing 0.75 M KCl, 5 µg/ml aprotinin and leupeptin, 0.5 mM PMSF and 2 µg/ml poly dI-dC) at 4°C for 30 min and were concentrated 10-fold by using a Microcon centrifugal filter with a cut off for 10 kDa proteins (Millipore). The first concentrated fraction (6.2 µg) was submitted one more time to the DNA-affinity step in buffer B. After the second elution with buffer C, the active fraction (about 0.1 µg) was then concentrated and analyzed by EMSA as described above, and by electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gel according to Laemmli (21), followed by protein silver staining (22). After preparative SDS-polyacrylamide electrophoresis and Coomassie (G250) blue staining, the band corresponding to the purified protein was excised from the gel and digested with trypsin. The peptide mixture was analysed by matrix-

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.

Southwesternblot analysis and UV cross-linking- Oligonucleotide corresponding to O_4 was labeled as described above with [α-^{32}P] dCTP using Klenow fragment of DNA polymerase I (Euromedex). For southwesternblot analysis, proteins from the nuclear extract (30 µg) or purified proteins from the first and second cycle of the purification procedure were run on SDS-polyacrylamide gels (10%) according to Laemmli (21) and transferred onto a nitrocellulose membrane. The membrane was soaked in a 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 buffer containing 50 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1 mM dithiotreitol (DTT) and 5 % (w/v) skimmed milk powder for 1 h at room temperature. After two washings with TNE-50 buffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.3, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA), the membrane was placed in a denaturing solution (7 M guanidine HCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8.3, 2 mM EDTA, 50 mM DTT, 0.25 % (w/v) skimmed milk powder) for 1 h at room temperature. The membrane was subsequently washed with two changes of TNE-50 buffer and placed in a renaturing solution (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1 % (v/v) Nonidet P-40, 0.25 % (w/v) skimmed milk powder) for 16 h at 4°C. The membrane was washed as before with TNE-50 buffer and incubated in a solution containing 5 mL of TNE-50 buffer, 3 µg/mL of poly(dI-dC) and about 60.000 cpm of ^{32}P-labeled oligonucleotide O_4 for 2 h at 4°C. After four washings 15 min each with TNE-50, the membrane was exposed to a film in an autoradiography cassette at –70°C for 2 h. For UV cross-linking, the binding reaction was performed as the EMSA method and DNA-binding proteins were cross-linked to the ^{32}P-labeled oligonucleotide O_4 by exposure to 254 nm of UV light for 30 min on ice. The reaction mixture was supplemented with 10 mM $CaCl_2$ and the DNA probe was then digested by 5 units of DNase I and 0.4 units of micrococcal nuclease for 30 min at 37°C. After the addition of 7.5 µl of nonreducing Laemmli sample buffer and boiling for 5 min, proteins cross-linked with the probe were analyzed by electrophoresis on 9% SDS-polyacrylamide gel and autoradiography.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay- Subconfluent breast cancer cells were cross-linked directly using 1% formaldehyde for 10 min. Chromatin isolation and enzymatic shearing were carried out using the ChIP-IT Express kit (Active Motif) according to the instruction manual. Prepared chromatin was then mixed with 2 µg polyclonal antibodies specific to Sp1, AP-2α, DDB2 (Santa Cruz Biotechnology; sc59X, sc8975X and sc25368, respectively), H3 Histone methylated at lysine-4 (dimeH3K4), H3 Histone acetylated at lysine-27 (AcH3K27), RNA polymerase II phosphorylated at serine residue 5 (RNA Pol II) and control immunoglobulin G (Active Motif). PCR was performed using primer pairs designed using Beacon designer (Bio-Rad) and encompassing either the DDB2-binding site (DDB2 region), or transcription start site (Pol II region) into the *sod2* promoter, which are listed in Table 1. PCR was carried out in a final volume of 50 µl, containing 5 µl PCR buffer, 15 µl of immunoprecipitated or 5µl of not immunoprecipitated (Input) chromatin, 0.5 µM specific forward and reverse primers, 0.25 mM of each dNTP, 2.5 U *Taq* polymerase and water to a 50 µl final volume. The reaction mixture was incubated at 94°C for 3 min for an initial denaturation and 40 cycles were performed with the following PCR program: denaturing 94°C-45 s, annealing 59°C-45 s, elongation 72°C-45 s. Ten microliters of each PCR were subjected to electrophoresis on a 2% Tris-borate-EDTA agarose gel, and DNA bands were detected by ethidium bromide staining and by Gel Doc 2000

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

system (Bio-Rad). PCR positive control used GAPDH primers from a ChIP control kit (Active Motif) and generated a 166 bp product.

Expression vector, RNA interference, RNA antisense and stable transfection- The DDB2 pcDNA3(+) expression vector, the pSIREN/U6/DDB2-siRNA vector and the pcDNA vector containing antisense cDNA of human MnSOD were constructed and used for stable transfection of breast cancer and COS-7 cells, as described elsewhere (14, 18).

RT-PCR analysis- Total RNA was isolated by TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, and used for RT-PCR analysis. Two micrograms of total RNA were reverse-transcribed for 50 min at 42°C in 20 µl of PCR buffer with 2.5 mM dNTPs, 5 µM random hexamer primers, 1.5 mM $MgCl_2$ and 200 U SuperScript II reverse transcriptase. Primer sequences (Invitrogen) and the expected product sizes of the *sod2*, *ddb1*, *ddb2*, *mdr1* and *β-actin* are detailed in Table 1. PCR analysis was carried out, as described previously (14, 18). Ethidium bromide-stained bands resulting from the amplification were visualized by UV transillumination and the fluorescence intensity was quantified using a Gel Doc 2000 system (Bio-Rad).

Western blot analysis- A total protein (20 or 50 µg) was run on SDS-polyacrylamide gels (12%) according to Laemmli (21) and transferred onto a PVDF membrane as described previously (14), followed by immunoblot analysis using either polyclonal anti-DDB1 and anti-DDB2 (Santa Cruz Biotechnology), anti-MnSOD (Calbiochem), or anti-AP-2α (Sigma; catalog no. A0844) antibodies at the optimized dilution. Bands were detected using an IgG polyclonal antibody conjugated to peroxidase (Sigma), after exposition to a chemiluminescent substrate. The equal loading of the protein was confirmed by Coomassie blue staining of the blot.

Construction of luciferase reporter plasmids- All restriction enzymes were purchased by Promega, except *PasI* which was from Euromedex. The 5'-flanking region (from –3340 to +260 nucleotide residues) of the human *sod2* gene ligated with the promoterless pGL3-basic vector (-3340pGL3) containing the firefly luciferase gene (Promega) was kindly provided by Dr. Moon B. Yim (23). To generate a pGL3 basic plasmid containing only the proximal promoter with the Sp1, AP-2 and O_4 DNA-binding sequences in the 5'-flanking region of the *sod2* gene (Fig. 1A), the -3340pGL3 plasmid was digested with the restriction enzymes *KpnI/StuI*. The cohesive ends of the linearized plasmid were then filled in using Klenow fragment of DNA polymerase I, followed by ligation. The resulting plasmid containing a fragment from –425 to +260 residues was named □2995pGL3. As a negative control, a deletion of a large sequence (about 200 bp), including the O_4 sequence, in the proximal region was produced by digestion of the -3340pGL3 with the restriction enzymes *BssHII/PvuII*. The cohesive ends of the linearized plasmid, named Δ200pGL3, were then filled in using Klenow fragment of DNA polymerase I, followed by ligation. As a supplemental negative control, the fragment from –3340 to -426 nucleotide residues, resulting from the previous *KpnI/StuI* digestion of the 5' flanking region of the *sod2* gene, was purified and ligated in the SV40 promoter pGL3 vector (SV40pGL3) linearized with *KpnI* and *SmaI*. The resulting plasmid was named Δ425SV40.

Site-directed mutagenesis- The Δ2995pGL3 corresponding to the proximal promoter of the 5'-flanking region of the *sod2* gene was deleted of the O_4 sequence by digestion with the restriction enzymes *NheI/PasI* (Fig. 1A). The O_4 sequence was replaced by the corresponding sequence Mut3O_4 (Fig.

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

2A) and encompassed by *NheI* and *PasI* sites to generate Δ2995MutO_4pGL3.

Transient transfection and luciferase assays- MCF-7 cells were transiently transfected with different luciferase reporter plasmids, using TransPEI reagent (Eurogentec) according to the manufacturer's instructions, and harvested 24 hours after transfection. As a control for transfection efficiency, the pSV40/SEAP plasmid (0.2 µg) expressing the secreted alkaline phosphatase (BD Biosciences Clontech) was used for transfection. The luciferase assays were performed using the luciferase reporter gene assay system (Roche), and SEAP activity was detected using luminescent SEAP detection assay (BD Biosciences Clontech). Relative luciferase activities were calculated by dividing activity found for SEAP, and expressed as mean ± standard deviations (SD) from at least three independent experiments, each being performed in triplicate.

Cell growth and colony formation- Cells (1 x 10^4) were plated in 24-well dishes. Cell growth rate was determined by counting the number of cells with a hemocytometer as a function of time. The data from cell growth were expressed as means ± SD from at least three independent experiments, each being performed in triplicate. To allow colony formation, cells (5 x 10^2) were plated in 100-mm culture dishes and incubated for 10 days. Colonies were then stained with 0.1 % crystal violet and scored when they contained more than 50 cells. Results were expressed as colony formation (%) = (colonies formed/cells seeded) x 100 %.

Statistical analysis- Evaluation of statistical significance was assessed using analyses of variance (ANOVA) and the Fisher protected least significant difference test. Statistical significance was indicated as $P < .05$.

RESULTS

Identification of a new DNA sequence in the proximal promoter of the SOD2 gene bound by an unknown protein complex. Proteomic analysis was done to trap new potential transcription factors. For that, EMSA were performed with several oligonucleotides corresponding to the region -420 to -190 bp of the proximal promoter of *sod2* gene, which is located between the most Sp1 and AP-2 transcription factor binding sites (Fig. 1A). Fig. 1B shows only the results for a set of 5 oligonucleotides named O_1, O_2, O_3, O_4, and O_5. Among these, only the O_4 oligonucleotide formed a shifted DNA-protein complex with MCF-7 nuclear extracts (Fig. 1C). The specificity of this DNA-binding protein was verified using an excess of unlabeled O_4 or NF-κB probes for competition. DNA binding of this protein complex was completely suppressed by addition of different amounts of the unlabeled O_4 probe (Fig. 1C), whereas it was unchanged by addition of the unrelated NF-κB consensus probe (Fig. 1D). In addition, this protein complex was observed only in nuclear and not in cytoplasmic extracts (Fig. 1D). To better characterize the DNA sequence involved in the formation of the complex, we generated a collection of mutant O_4 oligonucleotides (Fig. 2A). First, all oligonucleotides were tested for binding activity with the unknown complex. Secondly, these mutant oligonucleotides were used as competitors for the labeled O_4 probe. Mutant oligonucleotides, Mut 2, 3, 6 and 8, were unable to bind to the DNA-binding protein complex (Fig. 2B) or to compete with the labeled O_4 probe (Fig. 2C). The corresponding mutations were located in the AGCCT repeat separated by two hinge nucleotides GC. The mutation of both these hinge nucleotides decreased the formation of the complex on O_4 probe. Taken together, these results suggest AGCCTGCAGCCT as a new specific DNA sequence that

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

interacts with a protein complex which is necessary to identify.

Purification of proteins interacting with the new DNA sequence in the proximal promoter of the sod2 gene. We purified the DNA-binding protein complex in nuclear extracts from MCF-7 cells by affinity chromatography using the biotinylated O_4 oligonucleotide as a ligand bound to the streptavidin-agarose beads for an effective purification. This procedure was carried out twice to accomplish a high purification. As shown in Fig. 3A, the fraction from the second step of the purification procedure, eluted with 0.75 M KCl, was analyzed by SDS-PAGE. Only one major band at 43-kDa was observed after protein silver staining. In addition, this fraction was able to shift the O_4 oligonucleotide (Fig. 3B). The presence of the 43-kDa-purified protein was confirmed also by southwesternblot analysis and by UV cross-linking, showing only one O_4 oligonucleotide cross-linked protein at 43-kDa (Figs. 3C & 3D). The band at 43-kDa was then excised from the gel, digested with trypsin and analyzed by mass spectrometry. Two tryptic fragments allowed us to identify the protein as DDB2. Identification of DDB2 was confirmed by Western blot, supershift and transfection experiments. DDB2 was detected by Western blot in the purified fraction from the second step of the purification procedure, using a specific anti-DDB2 polyclonal antibody (Fig. 4A). The supershift experiment was done with nuclear extract from MCF-7 cells and the O_4 oligonucleotide. No evident supershift was observed, only a marked decrease in the DNA-binding activity of DDB2 with the respective polyclonal antibody. This result was specific because no changes were observed with anti-DDB1 or anti-Sp1 polyclonal antibodies (Fig. 4B). To verify the DNA-binding activity of DDB2 on the O_4 oligonucleotide, nuclear extracts from MCF-7 cells transfected with siRNA targeting DDB2 showed a significant decrease in the DNA-binding activity of DDB2 on its specific DNA sequence, compared to parental cells (Wt) as well as stably transfected cells with scrambled siRNA duplex sequence (control siRNA) as controls (Figs. 4C & 4D). To determine if DDB2 protein was able to bind to the proximal promoter of *sod2* gene *in vivo*, we performed ChIP assay in control MCF-7 cells (Wt and control siRNA) and DDB2 siRNA transfected MCF-7 cells using the anti-DDB2 polyclonal antibodies. As expected, a 232bp DNA fragment containing the DDB2 binding site of the proximal *sod2* promoter was immunoprecipitated in the presence of the specific anti-DDB2 and amplified by PCR in control cells but not in DDB2-deficient cells (Fig. 4E). In addition, the DNA-binding activity of DDB2 was lastly confirmed when COS-7 and MCF-7 cells were stably transfected with the *ddb2* gene or with an empty vector as a negative control (Figs. 5A & 5C). Nuclear extracts from transfected COS-7 cells showed a strong DNA-binding activity on the O_4 oligonucleotide in EMSA compared to negative controls (Fig. 5B). The same results were obtained with nuclear extracts from three MCF-7 cell clones transfected with the DDB2 expression vector (Figs. 5D & 5E).

Role of DDB2 in the regulation of constitutive sod2 gene expression in breast cancer cells. After establishing that DDB2 binds to the proximal *sod2* promoter, we wanted to study the consequence of this binding on the transcription of the *sod2* gene in breast cancer cells. We used the luciferase reporter gene system under the control of different promoter constructs of *sod2* gene (Fig. 6A). MCF-7 cells transfected transiently with the -3340pGL3 plasmid gave a luciferase activity corresponding to the 5'-flanking region-dependent transcriptional activity of *sod2* gene. The results from cells transfected with the construct Δ2995pGL3 indicated that the

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

major transcriptional activity corresponding to the 5'-flanking region of *sod2* gene was dependent on the proximal promoter. This was confirmed with the construct Δ425SV40 which corresponded to the 5'-flanking region of *sod2* gene without the proximal promoter. Deletion of the 200 bp region in the proximal promoter (construct Δ200pGL3), containing the O_4 sequence reduced strongly the transcriptional activity of the 5'-flanking region of the *sod2* gene (Fig. 6B). In addition, transcriptional activity of the proximal promoter was strongly increased in the DDB2 siRNA-transfected MCF-7 cells, suggesting a negative role of DDB2 on the constitutive *sod2* gene expression. To further confirm the role of DDB2 on the negative regulation of constitutive *sod2* gene expression, site-directed mutagenesis analysis for DDB2-binding site (O_4 sequence) was performed into the proximal promoter of *sod2* gene. The resulting construct (Δ2995MutO_4pGL3), containing two mutated residues (sequence Mut3O_4) and unable to bind DDB2, was used for transfection of Wt, control siRNA- and DDB2 siRNA-transfected MCF-7 cells. The results showed that mutations in the DDB2-binding site increased significantly transcription activity of the proximal *sod2* promoter in the Wt and control siRNA-transfected MCF-7 cells (Fig. 6C). Finally, these results were confirmed by RT-PCR and Western blot analyses showing an increased MnSOD mRNA level in DDB2 siRNA-transfected MCF-7 cells compared to control cells (Figs. 6D & 6E). Taken together, these results demonstrate that the binding of DDB2 to a specific and well characterized DNA sequence, which is located in the proximal *sod2* promoter, affects the constitutive level of MnSOD by a negative regulation of its gene in MCF-7 cells. In addition, the negative effect of DDB2 on the constitutive level of MnSOD was not associated with a hypermethylation of the *sod2* promoter, because the treatment of MCF-7 cells with an inhibitor of DNA methyltransferases did not change MnSOD mRNA levels (Fig. 6F). We verified these results in the breast cancer MDA-MB231 cell line, which express low DDB2 but high MnSOD mRNA and protein levels (Figs. 10A & 10B). Introduction of the *ddb2* gene into MDA-MB231 cells led to an increase in the DNA-binding activity of DDB2 (Figs. 7A & 7B) and in consequence a decrease in the mRNA level of MnSOD (Fig. 7C).

Consequence of the DDB2-DNA binding on the histone modifications and recruitment of transcription factors to the sod2 proximal promoter. We sought to know whether the negative effect of DDB2 on the constitutive transcription of *sod2* gene could be attributed to an interference with the transcriptional machinery. Also using ChIP assays, we compared the histone modifications and the recruitment of RNA Pol II, Sp1 and AP-2α to the *sod2* proximal promoter containing the GC-rich region with Sp1- and AP-2α-binding sites, and the transcription start site (Pol II region) in MCF-7 and MDA-MB231 cells as well as in DDB2 siRNA-transfected MCF-7 cells. Control IgG and anti-DDB2 immunoprecipitated chromatins from breast cancer cells were not amplified by PCR and were used as negative controls for these experiments (Fig. 8). The results indicated that dimeH3K4 and RNA Pol II were bound to the *sod2* proximal promoter, whatever breast cancer cells. However, AcH3K27 and Sp1 transcription factor were detected at the *sod2* promoter only in breast cancer cells such as MDA-MB231 and DDB2-siRNA transfected MCF-7 cells. In addition, we observed the binding of AP-2α to the *sod2* promoter only in DDB2-expressing breast cancer cells (Wt and control siRNA MCF-7 cells). These results suggest that DDB2 on its binding site may interfere with the transcriptional

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

program of *sod2* gene at the level of acetylated H3 histone and recruitment of Sp1 at the *sod2* proximal promoter in breast cancer MCF-7 cells.

Biological significance of the regulation of constitutive sod2 gene expression by DDB2. In order to study the biological significance of the regulation of constitutive *sod2* gene expression by DDB2, we used the MnSOD antisense technique to specifically downregulate the increased expression of MnSOD in DDB2-siRNA transfected MCF-7 cells. These latter were stably transfected either with a pcDNA vector containing MnSOD antisense cDNA or an empty-vector (MCF-7 DDB2 siRNA Neo). Two clones named MCF-7 DDB2 siRNA MnSOD AS cl.8 and cl.9 were isolated for their decrease in MnSOD protein level, compared to that in parental MCF-7 DDB2 siRNA and MCF-7 DDB2 siRNA Neo cells (Fig. 9A). Growth curves were assessed by seeding cells in 24-well tissue culture plates at 1 x 10^4 cells/well and then cells were counted every two days over a 8-day period. The DDB2 deficient MCF-7 cell clone transfected or not with the pcDNA empty vector and showing a similar growth rate, grew significantly more slowly than the Wt and the control siRNA-transfected MCF-7 cells, as described previously (18). However, downregulation of MnSOD in this DDB2 deficient MCF-7 cell clone led to stimulation of cell proliferation, with an intermediate growth curve between control (Wt and Control siRNA), and DDB2-deficient MCF-7 cells (DDB2 siRNA and Neo) (Fig. 9B). These results were confirmed by the colony formation (Fig. 9C). For both methods, no significant differences were observed between MCF-7 DDB2 siRNA and MCF-7 DDB2 siRNA Neo cells, or between Wt and Control siRNA MCF-7 cells. Finally, we compared the DDB2 and MnSOD expressions (Figs. 10A & 10B) with breast cancer cell growth for 4 days (Fig. 10C). For all cell lines used, results showed that MnSOD expression was always inversely correlated with that of DDB2 and the cellular proliferative activity. Taken together, these results suggest that DDB2 may play a role in breast cancer cell growth by exerting a negative regulation of the *sod2* gene.

DISCUSSION

Much progress has been made in determining the function of MnSOD in tumor growth. Differential regulation of the proximal promoter activity may play an important role in the development of cancer (24). However, little is known about how the constitutive transcription of the *sod2* gene is regulated. We reported previously that MnSOD expression was decreased in nonmetastatic but increased in metastatic breast tumor cells, and this differential expression led to distinct consequences on tumor cell growth. Breast cancer cells such as MCF-7 cells with low MnSOD levels had a high rate of proliferation, whereas MDA-MB 231 cells with a high MnSOD expression had a high invasive ability (14). However, the mechanism leading to the differential *sod2* gene expression with the malignant phenotype in breast cancer remains largely unknown. Therefore, the goal of this study was to identify a new mechanism which could explain the distinct constitutive expression of the *sod2* gene between non-malignant and malignant breast cancer cells.

This current study reports the identification and characterization of a new cis-element present in the proximal promoter of the *sod2* gene and interacting with the DDB2 protein. Characterization of this new cis-element results from a systematic analysis of the proximal promoter, excluding Sp1 and AP-2 binding sites in GC boxes. These latter transcription factor binding sites are well known to interact *in vivo* with Sp1 and AP-2 proteins (5). The new cis-

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

element, containing a repeated pentanucleotide which is separated by two hinge nucleotides, is located upstream the GC-rich region and at -230 bp from the the transcription start site. Experimental evidence supports that both repeated pentanucleotide are important for the DNA-binding activity of DDB2. However, mutations into the second AGCCT repeat lead to a distinct and smaller shift, where no marked decrease in DNA-binding activity was observed in the presence of the specific competitor, and which may probably correspond to an unknown and nonspecific protein complex. In addition, the hinge nucleotides are involved in the DNA-binding activity of DDB2, because mutations of these latter decrease the formation of the specific complex between DNA and protein. Results from southwestern blot and UV-cross linking experiments suggest that the cis-element is able to bind only one DDB2 molecule, because only about a 43 kDa protein complex is detected in both cases. This DDB2 consensus binding site identified in the human *sod2* gene promoter may be useful to identify other potential target genes in the future.

Involvement of DDB2 in the constitutive transcription of the human *sod2* gene was evaluated in MCF-7 cells. Our results from the ChIP assay show that DDB2 is able to bind to the *sod2* proximal promoter *in vivo*. The consequence of this binding is that DDB2 plays a negative role in the constitutive transcription of *sod2* gene in MCF-7 cells, because mutations of the DDB2 binding site or knockdown of DDB2 expression increase transcription. These results are confirmed in DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells, whose constitutive transcription of *sod2* gene is strongly decreased. This is in accordance with the previous observation which describes an inverse correlation in the MnSOD expression between MCF-7 and MDA-MB231 cells (14).

The present study, showing DDB2 as a new negative regulator of the constitutive transcription of the *sod2* gene, describes a different mechanism from those reported in previous studies. The *sod2* gene is not commonly mutated in breast cancer in contrast to other cancers (12). Epigenetic processes have already been involved in the transcriptional repression of *sod2* gene, such as methylation and histone modifications. It has been observed that methylation of the *sod2* gene promoter decreases the expression of MnSOD in some cancer cells, including MDA-MB435 breast cancer cells (13,16,25). This possibility was excluded in the present study by experiments consisting of treatment of MCF-7 cells with inhibitors of DNA methyltransferases and showing no changes in MnSOD mRNA levels. We analysed if DDB2 could interact with other epigenetic process such as histone modifications, leading to a low level of MnSOD. Indeed, previous studies have shown in breast cancer cells that the low levels of acetylated and methylated H3 histones at the *sod2* promoter was consistent with the decrease in the MnSOD expression (26). In the present study, we describes that the binding of DDB2, is associated with a low acetylated H3 histone at the *sod2* proximal promoter. These results are in accordance with the previous study showing that MnSOD level correlate with the acetylation status of H3 histones present at the *sod2* promoter (27). In MDA-MB231 cells, which express very low level of DDB2, acetylated H3 histones are detected at the *sod2* promoter. In contrast, the methylated H3 histone is bound to the *sod2* promoter, whatever the DDB2 status. It is known that both methylated and acetylated histones are indicative of the active transcription of gene, as we observed previously for *sod2* gene in MDA-MB231 cells and confirmed by the present ChIP analysis (14,28). No interference with the RNA Pol II binding

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

was observed whatever the breast cancer cells.

Low level of acetylated histones is associated with a condensed chromatin structure, which can decrease the accessibility of transcription factors to their respective binding sites. Depending on the histone modifications, we analysed by ChIP the recruitment of Sp1 and AP-2α at the GC-rich region, which is located downstream of the DDB2 binding site into the *sod2* proximal promoter. These transcription factors are described to be involved in the constitutive *sod2* gene expression (5,29,30). In the present study, we suppose that the increased constitutive transcription of *sod2* gene in DDB2 knockdown MCF-7 cells is probably dependent of the Sp1 transcription factor. Our ChIP analysis has shown that Sp1 is able to bind to the *sod2* proximal promoter in DDB2 knockdown MCF-7 cells, in which the level of acetylated H3K27 is high. Indeed, the constitutive transcription of the *sod2* gene depending on its 5'-flanking region is strictly dependent of the proximal promoter. Moreover, it has been demonstrated that the Sp1 binding site located into the GC-rich region of the proximal promoter, that encompasses the 150 bp PCR fragment from immunoprecipitated chromatin, is sufficient for constitutive transcription of *sod2* gene (5,26). The same results were obtained for MDA-MB231 cells, which have a very low DDB2 expression and a high constitutive transcription of *sod2* gene (14). In the case of AP-2α, we observed *in vivo* that this transcription factor is able to bind its response element located into the GC-rich region, when chromatin structure is more condensed because of a low level of acetylated H3K27, and when DDB2 is bound to its specific DNA sequence. Also, we can suppose that AP-2α may be associated with DDB2 for the repression of the transcription of the *sod2* gene. In previous studies, AP-2α has been involved in the decrease of constitutive transcription of the *sod2* gene, as well as in normal and some cancer cell lines by interfering with Sp1 binding (5,29,30). Even if the AP-2α expression did not change, this situation was not observed in DDB2-knockdown MCF-7 cells.

Our findings demonstrate for the first time that DDB2 may have a new biological activity, that of a transcriptional regulator of the *sod2* gene. Some observations however suggested the possibility that DDB2 may play a role in the regulation of gene transcription. DDB2 acts as a co-factor of the transcription factor E2F1 (31). In addition, DDB2 is well known to play a role in nucleotide excision repair of UV-induced DNA damages by contributing to the assembly of DNA repair mechanisms in coordination with DDB1, because it shares homology with chromatin reorganizing proteins (32,33). Also, the present study suggests that DDB2 could play its negative role on the transcription of *sod2* gene by influencing the remodeling of chromatin and the nature of the transcription factor recruited to the *sod2* proximal promoter.

It is not the first time that a protein involved in the DNA repair plays a role in the gene regulation. This is the case of the DDB1 protein, which has already been involved in the regulation of constitutive transcription of the fibromodulin gene by interacting with a specific DNA response element (34).

Recently, we reported that DDB2 was involved in breast tumor cell proliferation by activating the G1/S transition and S-phase progression of the cell cycle. These results were correlated with the expression of S phase markers, such as Proliferating Cell Antigen, cyclin E and dihydrofolate reductase (18). In the present study, we have demonstrated that DDB2 regulates constitutive MnSOD expression, leading to modulation of breast tumor cell proliferation. Indeed, consequence of DDB2 knockdown is the increase in MnSOD levels and a decrease

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

in the proliferation of MCF-7 cells. In addition, we observed that MnSOD expression was always inversely correlated with that of DDB2 and the cellular proliferative activity in all breast cancer cells used. Our results can be compared to the previous studies published by us and others. The mechanism by which MnSOD plays a role in tumor growth is dependent on its constitutive expression, which varies among cancer cell types, and the overall balance of ROS (24,35). A previous study has already reported that introduction of the *sod2* gene in MCF-7 cells reduced cell growth (36), and it has been postulated that the low MnSOD level in this breast cancer cell line may lead to an accumulation of intracellular $O_2^{\bullet}$- radicals, which act as second messenger molecules promoting cancer cell proliferation (37). Moreover, the present study showed that MnSOD expression is decreased in DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells. This can be associated with our previous results, which reported a stimulated growth of this breast cancer cell line in which either the *ddb2* gene was introduced or MnSOD expression was inhibited (14,18). Taken together, these data lead us to propose that MnSOD may be at least in part a new significant pathway through which DDB2 exerts its control of breast cancer cell growth. It is not excluded that DDB2 may be involved in the regulation of invasiveness by maintaining low MnSOD levels in DDB2-overexpressing breast cancer MCF-7 cells, because an elevated level of MnSOD may reflect tumor progression to a metastatic phenotype in DDB2-deficient breast cancer MDA-MB231 cells (14,15).

In summary, the data reported here provide for the first time evidence that DDB2 plays a role as a repressor of the MnSOD expression, which is associated with a low acetylation of H3 histone and AP-2α binding at the *sod2* proximal promoter. This new biological activity of DDB2 explains, at least in part, the distinct constitutive expression of the antioxidant enzyme and tumor cell growth between MCF-7 and MDA-MB231 cell lines. This new mechanism supports the fact that DDB2 may represent an important clinical interest as a prognostic marker of breast cancer progression. This latter comment implies research to identify a pattern of other DDB2 target genes in the future.

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

REFERENCES

1. Matés, J. M. (2000) *Toxicology* **153**, 83-104
2. St Clair, D. K., Wan, X. S., Oberley, T. D., Muse, K. E., and St Clair, W. H. (1992) *Mol Carcinog* **6**, 238-242
3. Kiningham, K. K., Oberley, T. D., Lin, S., Mattingly, C. A., and St Clair, D. K. (1999) *FASEB J* **13**, 1601-1610
4. St Clair, D. K., Porntadavity, S., Xu, Y., and Kiningham, K. (2002) *Methods Enzymol* **349**, 306-312
5. Xu, Y., Porntadavity, S., and St Clair, D. K. (2002) *Biochem J* **362**, 401-412
6. Nelson, K. K., Ranganathan, A. C., Mansouri, J., Rodriguez, A. M., Providence, K. M., Rutter, J. L., Pumiglia, K., Bennett, J. A., and Melendez, J. A. (2003) *Clin Cancer Res* **9**, 424-432
7. Kinnula, V. L., and Crapo, J. D. (2004) *Free Radic Biol Med* **36**, 718-744
8. Oberley, L. W. (2005) *Biomed Pharmacother* **59**, 143-148
9. Kiningham, K. K., and St Clair, D. K. (1997) *Cancer Res* **57**, 5265-5271
10. Ridnour, L. A., Oberley, T. D., and Oberley, L. W. (2004) *Antioxid Redox Signal* **6**, 501-512
11. St Clair, D. K., and Holland, J. C. (1991) *Cancer Res* **51**, 939-943
12. Xu, Y., Krishnan, A., Wan, X. S., Majima, H., Yeh, C. C., Ludewig, G., Kasarskis, E. J., and St Clair, D. K. (1999) *Oncogene* **18**, 93-102
13. Huang, Y., He, T., and Domann, F. E. (1999) *DNA Cell Biol* **18**, 643-652
14. Kattan, Z., Minig, V., Leroy, P., Dauça, M., and Becuwe, P. (2008) *Breast Cancer Res Treat* **108**, 203-215
15. Tsanou E, Ioachim E, Briasoulis E, Damala, K., Charchanti, A., Karavasilis, V., Pavlidis, N., and Agnantis, N. J. (2004) *Histol Histopathol* **19**, 807-813
16. Hitchler, M. J., Wikainapakul, K., Yu, L., Powers, K., Attatippaholkun, W., and Domann, F. E. (2006) *Epigenetics* **1**, 163-171
17. Chu, G., and Chang, E. (1988) *Science* **242**, 564-567
18. Kattan, Z., Marchal, S., Brunner E., Ramacci, C., Leroux, A., Merlin, J. L., Domenjoud, L., Dauça, M. and Becuwe, P. (2008). *PLoS ONE* **3**(4), e2002.
19. Olnes, M. J., and Kurl, R. N. (1994) *Biotechniques* **17**, 828-829
20. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J Biol Chem* **193**, 265-275
21. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
22. Merril, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A., and Ebert, M. H. (1981) *Science* **211**, 1437-1438
23. Kim, H. P., Roe, J. H., Chock, P. B., and Yim, M. B. (1999) *J Biol Chem* **274**, 37455-37460
24. Pani, G., Colavitti, R., Bedogni, B., Fusco, S., Ferraro, D., Borrello, S., and Galeotti, T. (2004) *Curr Med Chem* **11**, 1299-1308
25. Hodge, D. R., Peng, B., Pompeia, C., Thomas, S., Cho, E., Clausen, P. A., Marquez, V. E., and Farrar, W. L. (2005) *Cancer Biol Ther* **4**, 585-592
26. Hitchler, M. J., Oberley, L. W., and Domann, F. E. (2008) *Free Radic Biol Med* **45**, 1573-1580
27. Maehara, K., Uekawa, N., and Isobe, K. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 187-192
28. Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001) *Science* **293**, 1074-1080

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

29. Yeh, C. C., Wan, X. S., and St Clair, D. K. (1998) *DNA Cell Biol* **17**, 921-930
30. Zhu, C. H., Huang, Y., Oberley, L. W., and Domann, F. E. (2001) *J Biol Chem* **276**, 14407-14413
31. Hayes, S., Shiyanov, P., Chen, X., and Raychaudhuri, P. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 240-249
32. Tang, J., and Chu, G. (2002) *DNA Repair (Amst)* **1**, 601-616
33. Martinez E, Palhan VB, Tjernberg A, Lymar ES, Gamper AM, Kundu, T. K., Chait, B. T., and Roeder, R. G. (2001) *Mol Cell Biol* **21**, 6782-6795
34. Bevilacqua, M. A., Iovine, B., Zambrano, N., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Russo, T., and Cimino, F. (2005) *J Biol Chem* **280**, 31809-31817
35. Kim, K. H., Rodriguez, A. M., Carrico, P. M., and Melendez, J. A. (2001) *Antioxid Redox Signal* **3**, 361-373
36. Li, J. J., Oberley, L. W., St Clair, D.K., Ridnour, L. A., and Oberley, T. D. (1995) *Oncogene* **10**, 1989-2000
37. Yang, J. Q., Li, S., Domann, F. E., Buettner, G. R., and Oberley, L. W. (1999) *Mol Carcinog* **26**, 180-188

FOOTNOTES

This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (Comités Meuse and Meurthe et Moselle) and Henri Poincaré's Nancy University. V. Minig had a fellowship from the Ligue contre le Cancer (Comité Meurthe et Moselle). The authors are grateful to V. Besancenot for her skillful technical assistance, and to Professor S. Thornton for critical reading of the manuscript.

The abbreviations used are: MnSOD, Manganese superoxide dismutase; H_2O_2, hydrogen peroxide; ROS, reactive oxygen species; DDB1 and DDB2, damaged DNA binding 1 and 2.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Identification of a new DNA-binding protein activity in the proximal promoter of the *SOD2* gene in nuclear extract from MCF-7 cells. *A.* DNA sequence of the human proximal promoter of the *sod2* gene and the localization of Sp1, AP-2-binding sites and oligonucleotides used for protein trapping. The sequence numbers are relative to the transcription-initiation site (+1). Restriction enzyme recognition sites used in this study are marked. The underlined regions are DNA sequences corresponding to the oligonucleotides (O_1 to O_5) used as probes for protein trapping. The Sp1 and AP-2-binding sites are boxed. *B.* The ^{32}P-labeled oligonucleotides from O_1 to O_5 were challenged in EMSA experiments with the nuclear proteins (5 µg) from MCF-7 cells, as described in Materials and Methods. *C.* EMSA experiments were done with 5 µg nuclear proteins from MCF-7 cells. Competition was carried out with specific and unlabeled oligonucleotide O_4 at 10- to 100-fold molar excess to demonstrate the specificity of the DNA binding protein activity on oligonucleotide O_4. The reaction mixture was analyzed in native polyacrylamide gels. *D.* EMSA experiments were done with nuclear (5 µg) or cytoplasmic (15 µg) proteins from MCF-7 cells. Competitions were carried out with nuclear proteins and a 50-fold molar excess of the unlabeled specific oligonucleotide O_4 (s.c.) or with the nonspecific oligonucleotide corresponding

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

to the NF-κB consensus site (ns.c.). In all EMSA experiments, specific DNA binding protein, non specific complex (NS) and free probe are indicated by the arrows.

Fig. 2. Determination of the sequence of the new cis-element bound by a specific protein complex. *A.* The complete DNA sequence of the mutant O_4 oligonucleotides (from Mut 1 to Mut 10) are presented with two nucleotide changes (underlined in the Figure), compared to the wild type O_4 oligonucleotide (Wt). *B.* The Wt and each mutant O_4 oligonucleotides were ^{32}P-labeled and used for EMSA experiments with 5 µg nuclear proteins from MCF-7 cells. *C.* A 50-fold molar excess of the oligonucleotides from Mut 1 to Mut 10 were used as competitor in the EMSA experiments with the ^{32}P-labeled O_4 Wt oligonucleotide and 5 µg nuclear proteins from MCF-7 cells. Specific DNA binding protein, non specific complex (NS) and free probe are indicated by the arrows.

Fig. 3. Purification of the protein interacting with the new cis-element located in the proximal promoter of the *sod2* gene. *A & B.* DNA-binding protein in nuclear extracts from MCF-7 cells was purified by DNA affinity chromatography, using the biotinylated double stranded O_4 oligonucleotide, bound to streptavidin-agarose. The fractions eluted with 0.75 M KCl during the first and the second step of purification were analyzed by electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gel with protein silver staining and by EMSA experiments with the ^{32}P-labeled O_4 oligonucleotide. Competition was carried out with a 50-fold molar excess of the unlabeled specific oligonucleotide O_4 (s.c.) in EMSA to verify the specificity of the shift. The EMSA reaction mixture was analyzed in native polyacrylamide gels. *C.* The affinity purified DNA-binding protein eluted from the first and the second step of purification was analyzed by Southwesternblot with the ^{32}P-labeled O_4 oligonucleotide and the result was compared to the crude nuclear extract (30 µg), as described in Materials and Methods. *D.* The affinity purified DNA-binding protein eluted from the second step of purification and cytoplasmic extract (30 µg proteins) as negative control were incubated with the ^{32}P-labeled O_4 oligonucleotide and exposed to 254 nm of UV light for 30 min. The resulting DNA-protein complex was denatured and separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, before visualization after autoradiography. Competitions were carried out with a 50-fold molar excess of unlabeled specific O_4 oligonucleotide (s.c.) or with the nonspecific oligonucleotide corresponding to the NF-κB consensus site (ns.c.). In figures, specific DNA binding protein, non specific complex (NS) and free probe are indicated by the arrows.

Fig. 4. Identification of the protein interacting with the new cis-element located in the proximal promoter of the *sod2* gene. *A.* Western blot analysis of the affinity purified DNA-binding protein. The fraction eluted with 0.75 M KCl during the second step of purification that contained the purified protein, was subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to a PVDF membrane, and then probed with a specific polyclonal antibody raised against DDB2. *B.* The nature of the 43-kDa purified protein was confirmed by supershift experiments, which were done with nuclear proteins from MCF-7 cells incubated with 2 µg of antibodies raised against either DDB1, DDB2 or Sp1 prior to the addition of the ^{32}P-labeled O_4 oligonucleotide. *C.* MCF-7 cells were transfected stably with siRNA targeting DDB2 (DDB2 siRNA) or with scrambled siRNA duplex sequence (control siRNA). Expression of DDB2 was analyzed in the total protein extract (50 µg) and was compared to DDB1 and AP-2α levels, by Western blot using the respective polyclonal antibodies (* position of a nonspecific band for Western blot). Coomassie blue membrane staining was used as the

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

protein loading control. *D.* DNA-binding activity of DDB2 was analyzed in nuclear extracts from MCF-7 cells transfected stably with siRNA targeting DDB2 or with control siRNA by EMSA with the ^{32}P-labeled O_4 oligonucleotide. In EMSA and supershift, specific DNA binding protein, non specific complex (NS) and free probe are indicated by the arrows. *E.* Binding of DDB2 to the *sod2* proximal promoter was evaluated *in vivo* by ChIP assay in control and DDB2 siRNA MCF-7 cells, as described in Materials and Methods. Chromatin was immunoprecipitated or not by DDB2, Sp1, AP-2α antibodies or control IgG. The immunoprecipitated chromatin was analysed by PCR using primers encompassing DDB2 binding site (DDB2 region) and defined in Table 1. Input chromatin represents a portion of the enzymatically sheared chromatin before immunoprecipitation.

Fig. 5. DNA-binding activity of DDB2 by EMSA in DDB2-transfected COS-7 and MCF-7 cells. *A.* COS-7 cells were transfected stably with the vector driving the expression of human DDB2 (COS-7 DDB2) or with the empty vector only (COS-7 Neo). Overexpression of DDB2 was verified in total protein (50 µg) by Western blot analysis using a specific polyclonal antibody raised against DDB2. Coomassie blue membrane staining was used as the protein loading control. *B.* DNA-binding activity of DDB2 was analysed in nuclear proteins (5 µg) from COS-7 cells transfected stably with DDB2 expression vector or empty vector by EMSA with the ^{32}P-labeled O_4 oligonucleotide. Competitions were carried out with a 50-fold molar excess of unlabeled specific O_4 oligonucleotide (s.c.). *C.* MCF-7 cells were transfected stably with the vector driving the expression of human DDB2 (MCF-7 DDB2) or with the empty vector only (MCF-7 Neo). Overexpression of DDB2 was verified in total protein (20 µg) by Western blot analysis using a specific polyclonal antibody raised against DDB2. Coomassie blue membrane staining was used as the protein loading control. *D.* DNA-binding activity of DDB2 was analysed in nuclear proteins (2 µg) from MCF-7 Neo and MCF-7 DDB2 (cl.2, cl.4 and cl.6) cells by EMSA with the ^{32}P-labeled O_4 oligonucleotide. *E.* Competitions were carried out with nuclear extracts from MCF-7 Neo or MCF-7 DDB2 cl.4 and a 50-fold molar excess of the unlabeled specific O_4 oligonucleotide (s.c.) or with the nonspecific oligonucleotide corresponding to the NF-κB consensus site (ns.c.). Specific DNA binding protein, non specific complex (NS) and free probe are indicated by the arrows.

Fig. 6. Consequence of DDB2 knockdown on constitutive transcription of the *sod2* gene in MCF-7 cells. *A.* Schematic representation of the different deletion series in the promoter region of the *sod2* gene relative to the full construct -3340pGL3 upstream of the luciferase reporter gene. *B.* Wild type MCF-7 cells were transfected transiently with luciferase reporter gene under the control of the different deletion series in the promoter region of *sod2* gene. After 24 hours of transfection, cells were lysed and relative luciferase activities were measured and corresponded to the *sod2* gene transcription depending on the 5'-flanking region. *C.* Wild type, control siRNA and DDB2 siRNA-transfected MCF-7 cells were transfected transiently with luciferase reporter gene under the control of the proximal promoter (Δ2995pGL3) of the *sod2* gene, in which the cis-element recognized by DDB2 (AGCCTGCAGCCT) was mutated to AGCCTGCCGCAT (Δ2995MutO_4pGL3), and relative luciferase activities were measured. A significant differences were observed between DDB2 siRNA-transfected MCF-7 cells and control (Wt and control siRNA) cells (* $P<0.05$), and between control MCF-7 cells transfected with Δ2995MutO_4pGL3 *versus* cells transfected with (Δ2995pGL3 (** $P<0.05$). *D & E.* MnSOD mRNA and protein levels were analyzed in total RNA and protein isolated from Wt, control siRNA and DDB2 siRNA-transfected

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

MCF-7 cells (DDB2 siRNA), by RT-PCR and Western blot analysis. *F.* Effect of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacytidine on *sod2* gene expression in wild-type MCF-7 cells. RT-PCR analysis for MnSOD, MDR1 and β-actin mRNA levels was carried out with total RNA isolated from wild type MCF-7 cells treated for 48 or 72 h with 10 or 20 µM 5-azacytidine. Analysis of the MDR1 mRNA level was used as a positive control of the treatment with 5-azacytidine.

Fig. 7. Consequence of DDB2 overexpression on constitutive transcription of the *sod2* gene in MDA-MB231 cells. *A.* MDA-MB231 cells were transfected stably with the vector driving the expression of the human DDB2 (MDA DDB2) or with the empty vector only (MDA Neo). Overexpression of DDB2 was verified in total protein (50 µg) by Western blot analysis. As a control, the membrane was also probed with an anti-DDB1. Coomassie blue membrane staining was used as the protein loading control. *B.* DNA-binding activity of DDB2 was analyzed by EMSA with the ^{32}P-labeled O_4 oligonucleotide and with nuclear proteins (5 µg) from Wt MDA-MB231 cells, or transfected stably with either DDB2 expression vector or empty vector. *C.* MnSOD mRNA level was analyzed in total RNA isolated from Wt, Neo and DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells (MDA DDB2) by RT-PCR analysis.

Fig. 8. Consequence of DDB2 binding on the modifications of histone and recruitment of Sp1 and AP-2α at the *sod2* proximal promoter. Methylation of H3K4 and acetylation of H3K27 histones and recruitment of Sp1 and AP-2α in the GC-rich region of the *sod2* proximal promoter (Pol II region) located downstream of the DDB2 DNA-binding were analyzed *in vivo* by ChIP assay in MCF-7 (controls and DDB2 siRNA) and MDA-MB231 cells, as described in Materials and Methods. Chromatin was immunoprecipitated by DDB2, Sp1, AP-2α, RNA Pol II, dimeH3K4, AcH3K27 antibodies or control IgG. The immunoprecipitated chromatin was analyzed by PCR using primers of the Pol II region into the *sod2* proximal promoter (see Table 1), and primers of the *gapdh* promoter as positive control. Input chromatin represents a portion of the enzymatically sheared chromatin before immunoprecipitation.

Fig. 9. Biological significance of the regulation of constitutive *sod2* gene expression by DDB2 in MCF-7 cells. *A.* DDB2 siRNA-transfected MCF-7 cells were transfected stably with the pcDNA vector containing MnSOD antisense cDNA (MCF-7 DDB2 siRNA MnSOD AS) or empty-vector (MCF-7 DDB2 siRNA Neo). Two clones (MCF-7 DDB2 siRNA MnSOD AS cl.8 and cl.9) were isolated for their decrease in MnSOD protein level, which was assessed by Western blot analysis using specific polyclonal antibodies in total protein (50 µg) from MCF-7 control and transfected cells. Coomassie blue membrane staining was used as the protein loading control for Western blot analysis. *B.* All MCF-7 cells were plated in 24-well dishes (1 x 10^4 per well) in complete medium and cell numbers were counted every 2 days for 8 days. Means are shown for three experiments. *C.* All MCF-7 cells were seeded (500 cells) in 100-mm dishes and grown for 10 days. Colonies with more than 50 cells were counted and data from three independent experiments were expressed as the % of colony formation = (colonies formed/cells seeded) x 100%. Statistically significant differences for growth after 8 days of culture, and colony formation between either MCF-7 DDB2 siRNA Neo or MCF-7 control siRNA *versus* MCF-7 DDB2 siRNA MnSOD AS cl.8 and cl.9 cell value are indicated as * and **, respectively (P<0.05). No significant difference was observed between MCF-7 DDB2 siRNA and MCF-7 DDB2 siRNA Neo, or between Wt and control siRNA MCF-7 cells.

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

Fig. 10. Comparison of DDB2 and MnSOD expressions with growth of breast cancer cell lines. *A & B.* DDB2 and MnSOD mRNA and protein levels were analyzed in total RNA and protein isolated from the breast cancer cell lines (MDA-MB231, SKBR3, MCF-7 and T47D), by RT-PCR and Western blot (* position of a nonspecific band). *C.* All breast cancer cell lines were plated in 24-well dishes (1 x 10^4 per well) in complete medium and cell numbers were counted every day for 4 days. Means are shown for three experiments.

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

TABLE I

Primers for RT-PCR and ChIP analysis.

Gene or promoter	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)
Genes			
sod2	5'-CGACCTGCCCTACGACTAC-3'	5'-TGACCACCACCATTGAACTTC-3'	198
ddb1	5'-ACCTCAAGGAAGTGAACTACATGTG-3'	5'-CTCATGAGGAGCAGTGCTGCTGGAGA-3'	300
ddb2	5'-ACCAGTTTTACGCCTCCTCAATGG-3'	5'-TTTCCCTCTAACCTGGCGCAGGTC-3'	300
β-*actin*	5'-GGCTCCGGCATGTGCAAGG-3'	5'-AGATTTTCTCCATGTCGTCC-3'	220
mdr1	5'-AAGCTTAGTACCAAAGAGGCTCTG-3'	5'-GGCTAGAAACAATAGTGAAAACAA-3'	240
sod2 promoter for ChIP			
DDB2 region	5'-ACTCAAGTACGGCAGACAGGCAG-3'	5'-TTAAGAAAGCGCGGGGAGCAG-3'	232
Pol II region	5'-CTGCTCCCCGCGCTTTCTTAA-3'	5'-GCTGCTAGTGCTGGTGCTACCGCTGA-3'	199

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

Figure 1

A

StuI
AP-2
TTTTTGCAGT GAGGCCTCTG GACCCCGCGG CCCCCCGGCA GCGCAACCAA AACTCAGGGG -390

AP-2 Sp1
CAGGCGCCGC AGCCGCCTAG TGCAGCCAGA TCCCCGCCGG CACCCTCAGG GGCGGACGGA -330

BssHII
GGAGGGCCTT CGGCCGTACC AACTCCACGG GGGCAGGGGC CGCCTCCCTT CGGCCGCGCG -270
O_1 AP-2

NheI PstI
CCACTCAAGT ACGGCAGACA GGCAGCGAGG TTGCCGAGGC CGAGGCTAGC CTGCAGCCTC -210
O_2 O_4

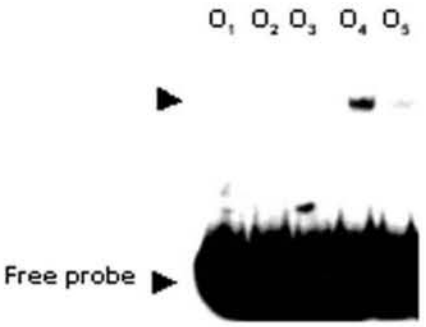
PasI AP-2 O_3 Sp1 Sp1
CTTTCTCCCG TGCCCTGGGG CGGTGTACGG CAAGCGGGGG CGGGCGGGAC AGGCACGCAG -150
O_5 AP-2 AP-2

AP-2 AP-2 Sp1 Sp1
GGCACCCCCG GGGTTGGGCG CGGCGGGCGG GGCGGGGCCG CGGGGGGAGG GGGCGGGGCG -90
AP-2 AP-2

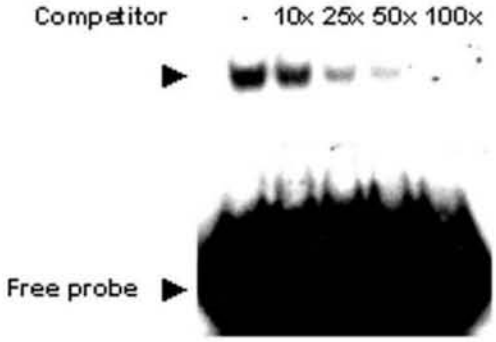
Sp1 PvuII AP-2
GCGGTGCCCT TGCGGCGCAG CTGGGGTCGC GGCCCTGCTC CCCGCGCTTT CTTAAGGCCC -30

Sp1 +1
GCGGGCGGCG CAGGAGCGGC ACTCGTGGCT GTGGTGGCTT CGGCAGCGGC
AP-2

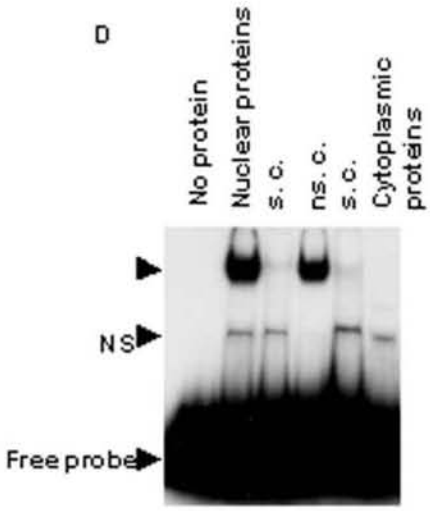
B



C



D



Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

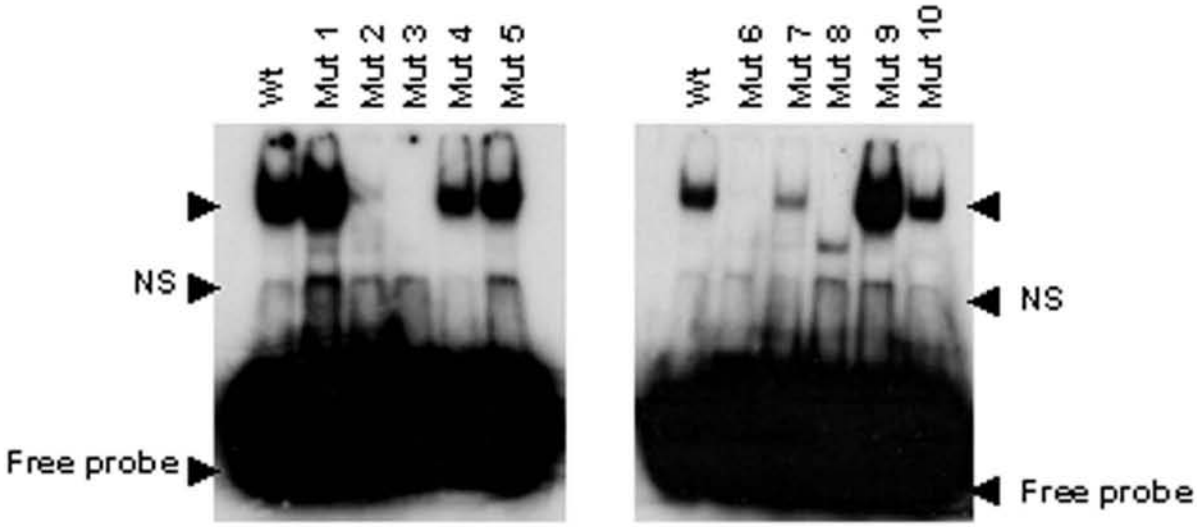
ASBMB The Journal of Biological Chemistry jbc

Figure 2

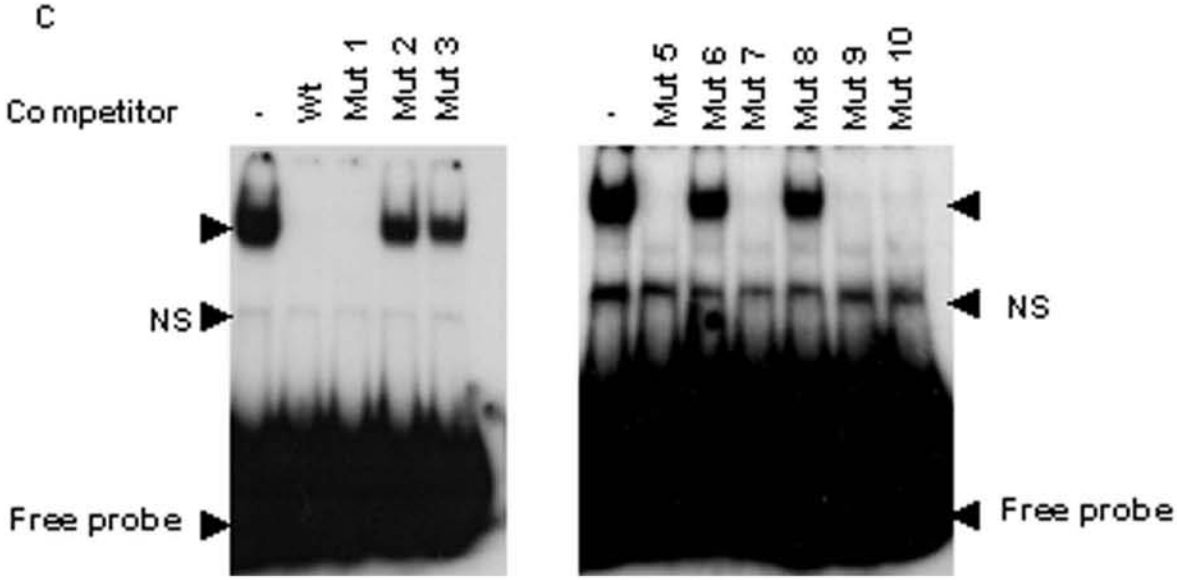
A

Wt	5'- GAGGCTAGCCTGCAGCCTCCTTTCTCC -3'
Mut1	5'- GCTGCTAGCCTGCAGCCTCCTTTCGAC -3'
Mut2	5'- GAGGCTCGCATGCAGCCTCCTTTCTCC -3'
Mut3	5'- GAGGCTAGCCTGCCGCATCCTTTCTCC -3'
Mut4	5'- GCTGCTAGCCTGCAGCCTCCTTTCTCC -3'
Mut5	5'- GAGGCTAGCCTGCAGCCTCCTTTCGAC-3'
Mut6	5'- GAGGCTATACTGCAGCCTCCTTTCTCC -3'
Mut7	5'- GAGGCTAGCCTTAAGCCTCCTTTCTCC -3'
Mut8	5'- GAGGCTAGCCTGCATACTCCTTTCTCC -3'
Mut9	5'- GAGGCTAGCCTGCAGCCTAATTTCTCC -3'
Mut10	5'- GAGGCTAGCCTGCAGCCTCCGGTCTCC-3'

B



C



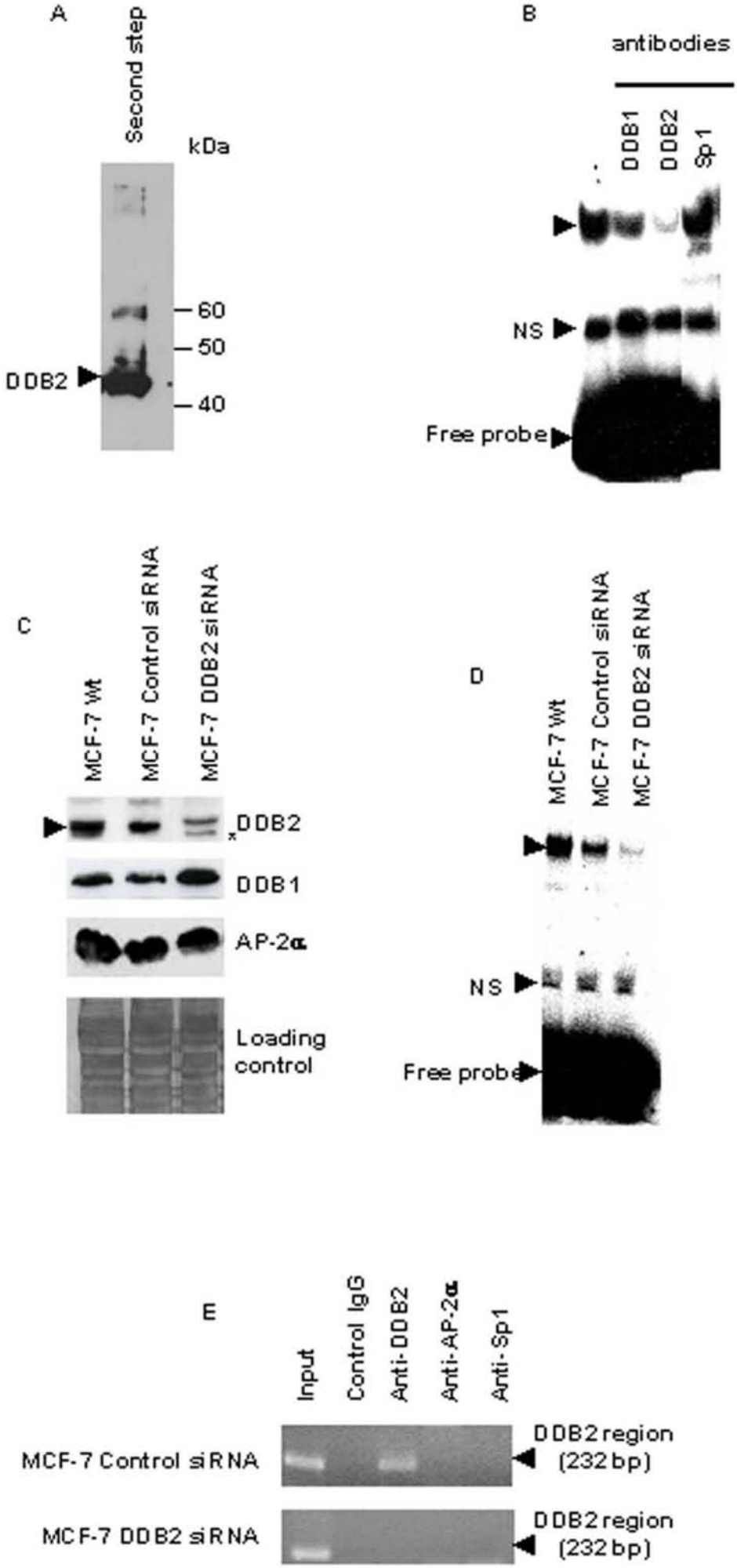
Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

The Journal of Biological Chemistry
ASBMB
jbc

Figure 3

Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

Figure 4

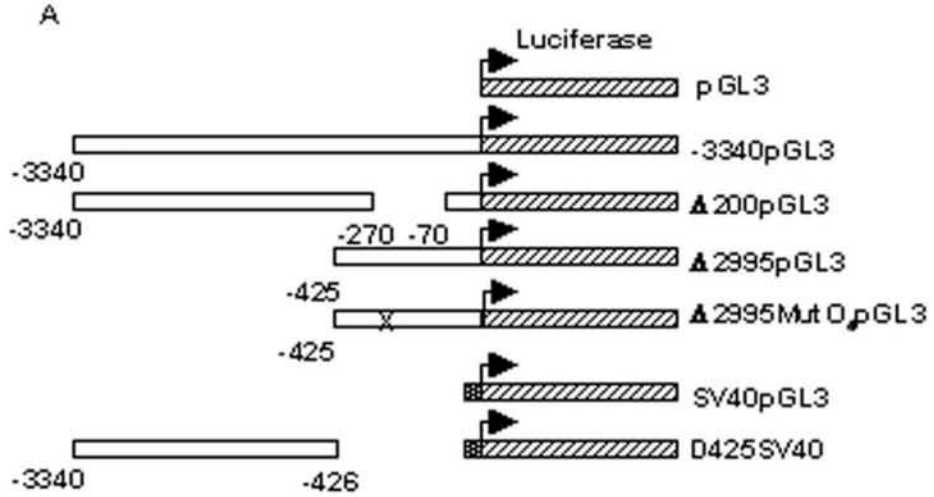


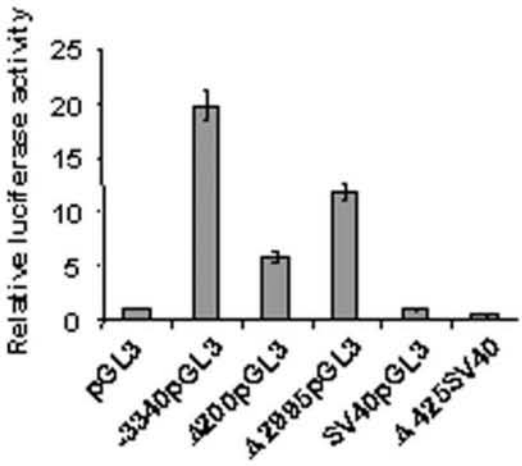
Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

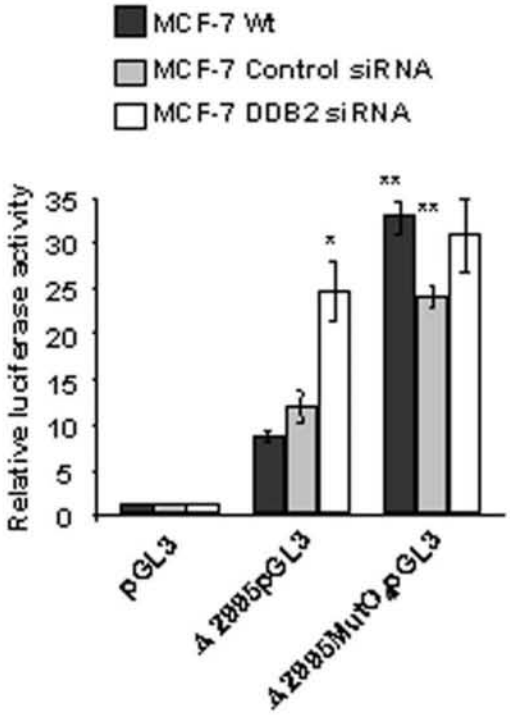
Figure 5

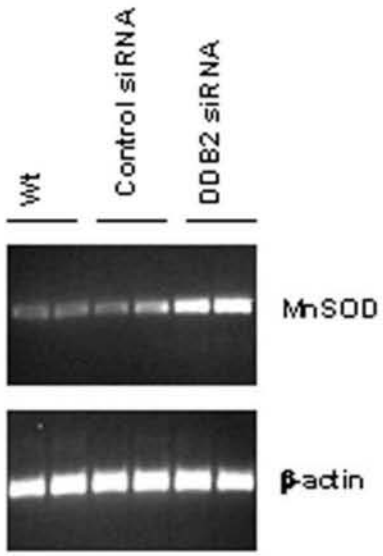
Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

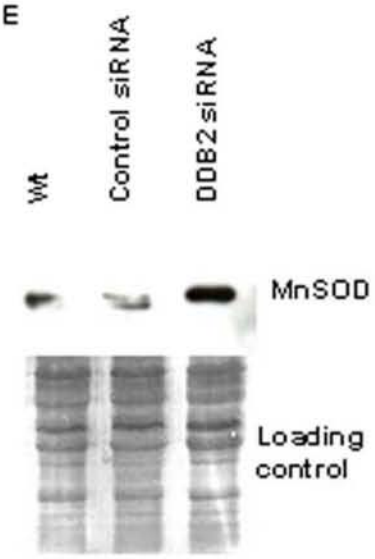
Figure 6

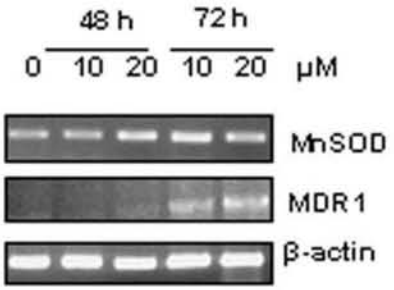












Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

Figure 7

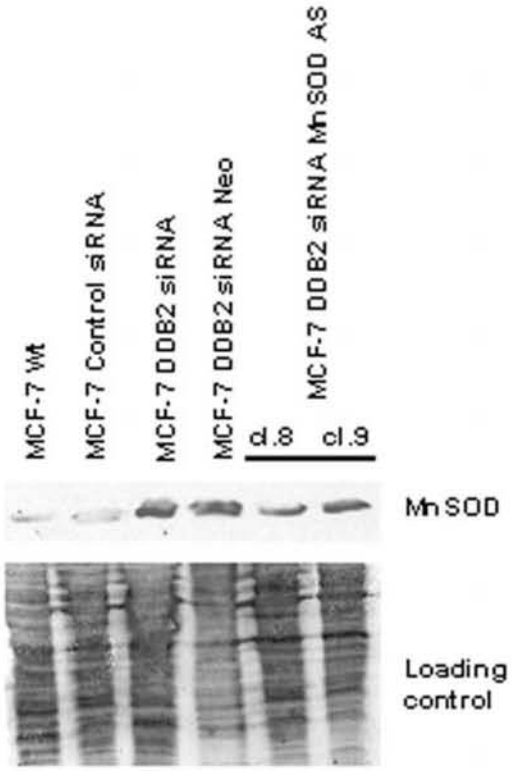
Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

Figure 8

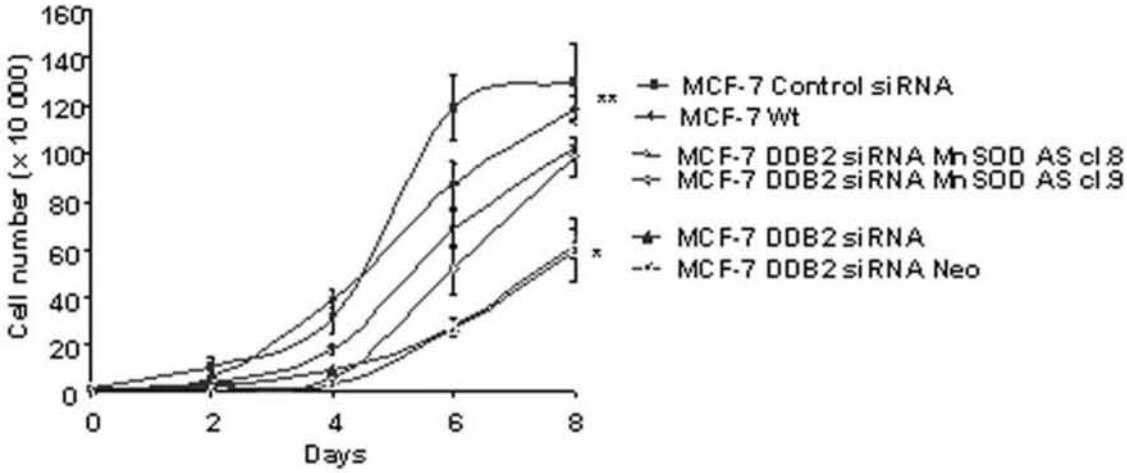
Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

Figure 9

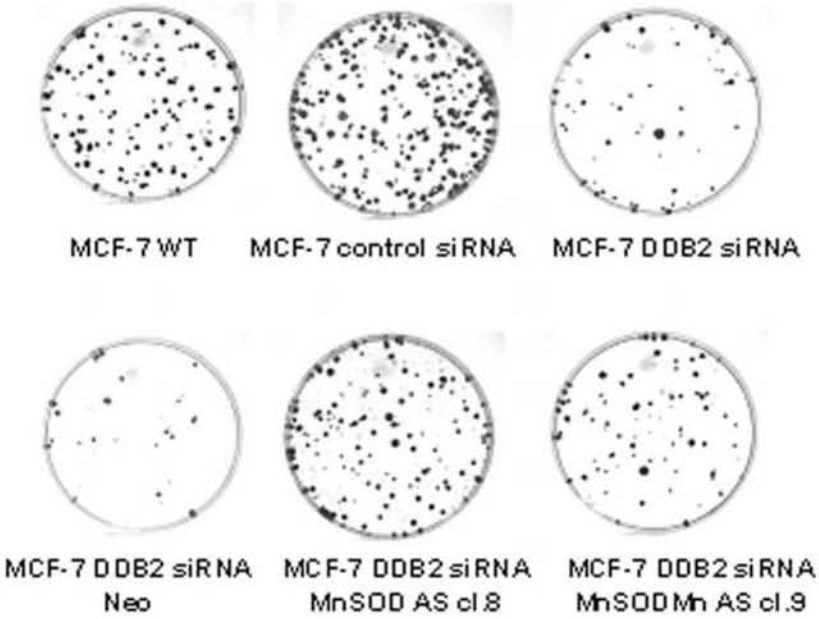
A



B

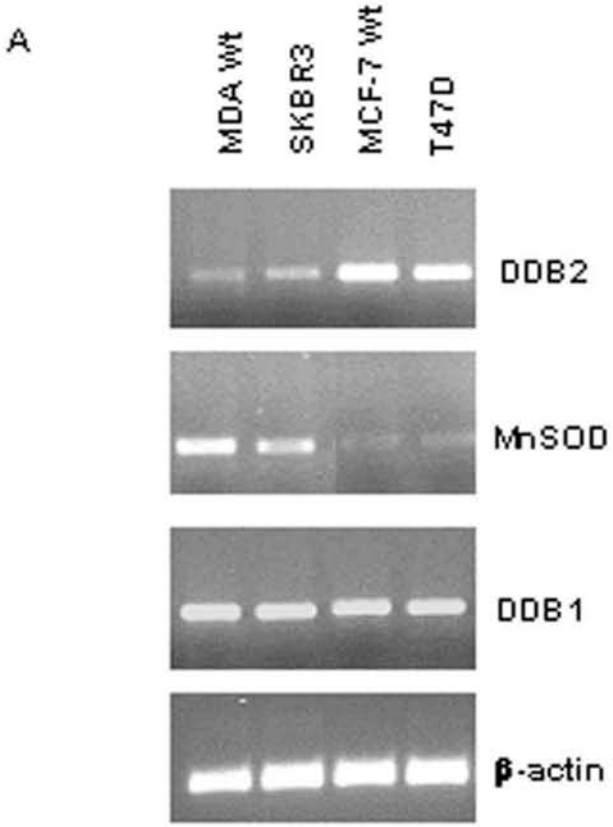


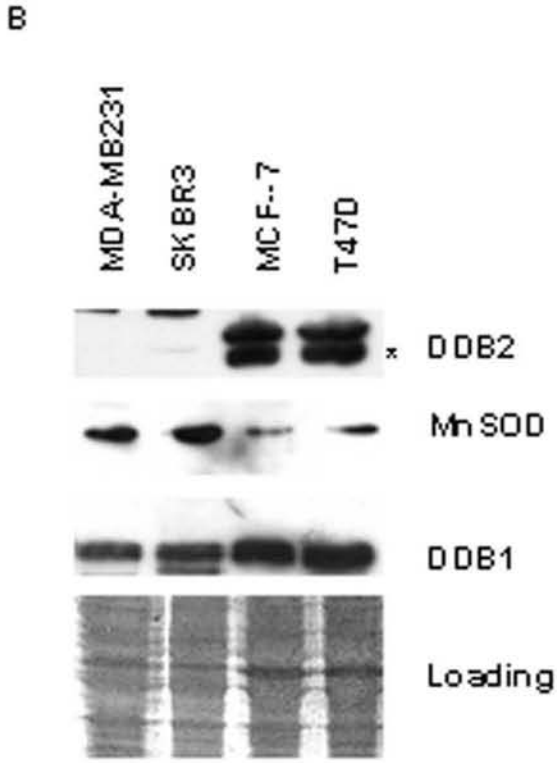
C

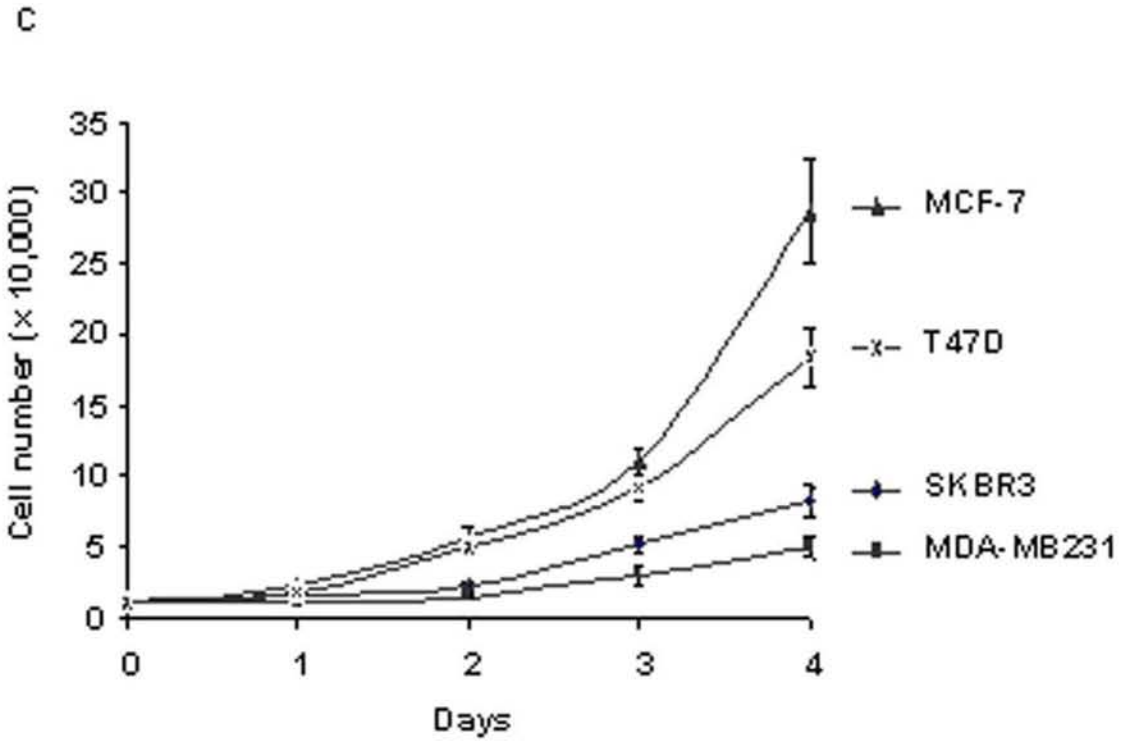


Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

gure 10

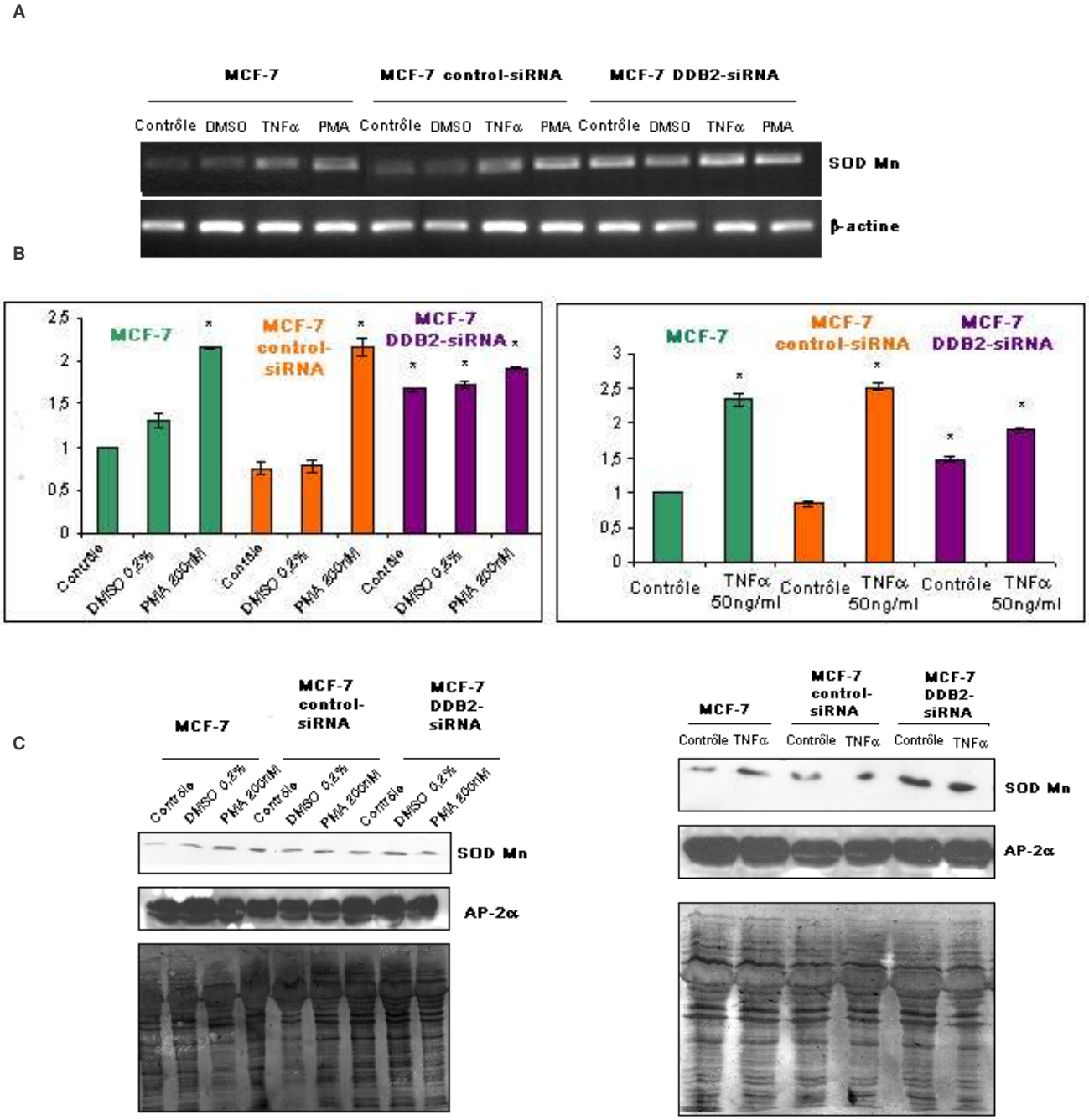






Downloaded from www.jbc.org by on April 20, 2009

ASBMB
The Journal of Biological Chemistry
jbc



<u>Figure 11</u> : Etude de l'expression du gène de la SOD Mn lorsque celui ci est induit par le Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (PMA) ou par le TNFα dans les cellules tumorales mammaires MCF-7, MCF-7 control-siRNA et MCF-7 DDB2-siRNA.

A. Analyse par RT-PCR du gène de la SOD Mn, dans les cellules MCF-7 ,MCF-7 control-siRNA et MCF-7 DDB2-siRNA préalablement traitées avec 200 nM de PMA et 50 ng/ml de TNFα pendant 12 heures. La RT-PCR est réalisée dans les conditions décrites précédemment, avec les amorces spécifiques des gènes. **B.** Les intensités relatives des bandes représentant la SOD Mn sont quantifiées par densitométrie. Les résultats sont normalisés par rapport à ceux obtenus par la lignée MCF-7 contrôle fixée à 1, et sont significatifs pour *$p<0,05$ sur trois échantillons différents. **C.** Le taux de protéines SOD Mn et AP-2α est analysé par immunoréplique à l'aide des anticorps polyclonaux spécifiques dans 50µg de protéines totales extraites des cellules MCF-7, MCF-7 control-siRNA et MCF-7 DDB2-siRNA traitées chacune avec 50 ng/ml de TNFα ou 200nM de PMA pendant 12 heures. La membrane colorée au bleu de Coomassie témoigne de la quantité équivalente de protéines déposées.

2. Données complémentaires : rôle de la protéine DDB2 dans la régulation de l'expression induite de la SOD Mn

Le rôle de la protéine DDB2 régulant négativement l'expression constitutive du gène *SOD2* a été démontré dans les cellules de carcinomes mammaires MCF-7. Nous avons également vérifié l'implication de la DDB2 en présence d'inducteurs connus du gène de la SOD Mn, tels qu'un ester de phorbol, le Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (PMA) et le TNFα.

Nous avons étudié l'expression du gène de la SOD Mn aux niveaux transcriptionnel (RT-PCR) et traductionnel (Western blot), dans les cellules MCF-7 témoins (sauvages et transfectées avec un ARN interférent non spécifique) et celles ayant une expression de DDB2 inhibée (MCF-7 DDB2-siRNA), qui ont été exposées pendant 12 heures à une concentration préalablement définie de PMA et de TNFα. Les résultats obtenus montrent que le PMA et le TNFα induisent comme attendu, le gène de la SOD Mn dans les cellules témoins. En revanche, l'expression élevée de la SOD Mn dans les cellules MCF-7 DDB2-siRNA n'est pas augmentée en présence des deux inducteurs (**Figure 11**).

3. Conclusions

L'ensemble de nos résultats montre pour la 1 ère fois que la protéine DDB2 possède, en dehors de son activité dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides, une fonction biologique de régulateur de la transcription d'un gène cible, la SOD Mn. Cette fonction est dépendante de la présence d'un élément de réponse, dont la séquence n'a jamais été caractérisée jusqu'à présent, mais semble indépendante de la fixation des facteurs de transcription Sp1 et AP-2α ou encore d'une méthylation de la région proximale du promoteur du gène *SOD2*. Cependant, ce nouveau mécanisme de régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn semble ne pas être impliqué dans l'induction du gène de l'enzyme antioxydante. En revanche, il est impliqué dans le rôle que joue la SOD Mn dans la croissance des cellules tumorales.

II IMPLICATION DE LA SOD MN DANS LA CROISSANCE ET LES PROPRIETES INVASIVES DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES HUMAINES OESTROGENES-INDEPENDANTES

1. Introduction

La SOD Mn est connue pour jouer un rôle dans le développement des tumeurs. D'après la littérature, elle est faiblement exprimée dans les cellules tumorales mammaires, œstrogènes-dépendantes et joue un rôle dans leur croissance [Li *et al*. 1995]. Cependant, aucune donnée dans la littérature n'a rapportée l'expression et le rôle de cette enzyme antioxydante, selon le statut oxydo-réducteur, en particulier dans les cellules tumorales mammaires œstrogènes-indépendantes, qui sont invasives et métastatiques, contrairement aux cellules œstrogènes-dépendantes. Dans d'autres types de cellules cancéreuses, la forte expression constitutive est corrélée avec les propriétés invasives et métastatiques de ces cellules tumorales [Malafa *et al*. 2000; Toh *et al*. 2000b].

2. Résultats obtenus

Nous avons particulièrement étudié le rôle de la SOD Mn dans la croissance des cellules tumorales mammaires MDA-MB231, qui n'expriment pas le récepteur aux œstrogènes (ER négatives) et qui prolifèrent de façon hormono-indépendante. Nous avons montré que ces cellules ER négatives surexpriment naturellement la SOD Mn, comparativement aux cellules épithéliales mammaires normales et aux cellules ER positives, telles que les cellules MCF-7. La même surexpression de la SOD Mn a été également observée pour la lignée ER-négatives SK-BR-3.

La surexpression de la SOD Mn est associée à un faible taux des enzymes comme la catalase et la GPX, mais pas la peroxyrédoxine 3 (PRX3), et s'accompagne ainsi d'une production importante d'H_2O_2 dans les cellules MDA-MB231, comparativement aux cellules

MCF-7. L'inhibition de l'expression de la SOD Mn dans les cellules MDA-MB231, grâce à un vecteur plasmidique développé dans le laboratoire et permettant la transcription d'ARN antisens de la SOD Mn, entraîne d'une part une diminution de la production et une augmentation de la concentration intracellulaire de GSH d'autre part une stimulation de la prolifération, associée à une diminution de l'expression du marqueur PCNA mais sans augmentation de la formation de colonies. Comparativement, aucune différence n'est observée, lorsque les cellules MDA-MB231, exprimant moins la SOD Mn, sont exposées à un mimétique chimique de l'enzyme antioxydante, le MnTMPyP, suggérant ainsi que la SOD mitochondriale et non cytoplasmique joue un rôle central dans la régulation de la croissance des cellules MDA-MB231.

L'H_2O_2 intracellulaire, libéré par l'activité soutenue de la SOD Mn dans les cellules MDA-MB231 sauvages, joue un rôle important dans leur croissance. En effet, la présence d'antioxydants (NAC, pyruvate), éliminant spécifiquement l'H_2O_2, entraîne une diminution significative de la prolifération des cellules sauvages MDA-MB231, qui en conséquence, expriment moins la protéine PCNA.

Parallèlement, le rôle de la SOD Mn dans les propriétés invasives des cellules MDA-MB231 a été étudié en utilisant la méthode des chambres de Boyden. Les résultats montrent que l'inhibition de l'expression de la SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB231 ou le traitement de ces cellules par des antioxydants, permet de diminuer les propriétés invasives de ces cellules. Ces résultats sont associés à une diminution de significative de l'activité de la gélatinase, la MMP-9.

3. Conclusions

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la SOD Mn joue un rôle dans la régulation de la croissance tumorale et dans les propriétés invasives des cellules tumorales mammaires œstrogènes-indépendantes. Ces actions semblent être liées à la production d'H_2O_2 intracellulaire par la SOD Mn. Enfin, cette étude suggère également que la surexpression constitutive de la SOD Mn pourrait être un des mécanismes contribuant à la progression tumorale vers un état métastatique. Dans ce cas, la SOD Mn serait un facteur prédictif d'invasion tumorale dans le cancer du sein.

Ces résultats sont développés dans l'article suivant, publié dans *Breast Cancer Research and Treatment en* 2008.

<u>Article 2</u> : "Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells."

Breast Cancer Res Treat (2008) 108:203–215
DOI 10.1007/s10549-007-9597-5

PRECLINICAL STUDY

Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells

Zilal Kattan · Vanessa Minig · Pierre Leroy · Michel Dauça · Philippe Becuwe

Received: 19 October 2006 / Accepted: 5 April 2007 / Published online: 2 May 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is known to play a role in cancer. MnSOD exerts a tumor suppressive effect in estrogen-dependent human breast cancer cells. In the present study we investigated the in vitro role of MnSOD in the growth of some aggressive and highly metastatic estrogen-independent breast cancer cells, i.e., MDA-MB231 and SKBR3 cells. We show that estrogen-independent cells expressed a significantly higher basal MnSOD level compared to estrogen-dependent human breast cancer cell lines (MCF-7 and T47D). For MDA-MB231 cells, the high-MnSOD level was accompanied by an overproduction of intracellular hydrogen peroxide (H_2O_2) and by a low expression of the major H_2O_2-detoxifying enzymes, catalase, and peroxiredoxin 3, compared to MCF-7 cells. Suppression of MnSOD expression by antisense RNA was associated with a decrease of H_2O_2 content and caused a stimulation of growth with a reduced cell doubling time but induced a decrease of colony formation. Furthermore, treatment of MDA-MB231 cells with H_2O_2 scavengers markedly reduced tumor cell growth and colony formation. In addition, MnSOD suppression or treatment with H_2O_2 scavengers reduced the invasive properties of MDA-MB231 cells up to 43%, with a concomitant decrease of metalloproteinase-9 activity. We conclude that MnSOD plays a role in regulating tumor cell growth and invasive properties of estrogen-independent metastatic breast cancer cells. These action are mediated by MnSOD-dependent H_2O_2 production. In addition, these results suggest that MnSOD up-regulation may be one mechanism that contributes to the development of metastatic breast cancers.

Keywords Manganese superoxide dismutase · Breast cancer · Cell growth · Invasiveness · Metastasis · Reactive oxygen species · Matrix metalloproteinases

Z. Kattan · V. Minig · M. Dauça · P. Becuwe (✉)
Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement, EA 3446-IFR111 (Proliférateurs de Peroxysomes), Université Henri Poincaré-Nancy I, Faculté des Sciences, B.P. 239, 54506 Vandoeure-les-Nancy, France
e-mail: Philippe.Becuwe@scbiol.uhp-nancy.fr

P. Leroy
Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, UMR 7564 CNRS Nancy-Université, Faculté de Pharmacie, B.P. 80403, 54001 Nancy, France

Introduction

Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is one of the major antioxidant enzymes that catalyses the dismutation of the superoxide radical ($O_2^{\bullet}$-) to hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxygen. H_2O_2 is further eliminated by major H_2O_2-detoxifying antioxidant enzymes such as catalase, glutathione peroxidase (GPx), and peroxiredoxins [1]. The human MnSOD protein is a mitochondrial tetrameric enzyme encoded by a nuclear gene located on chromosome 6q25. This antioxidant enzyme is cytoprotective and plays an antiapoptotic role against oxidative stress, inflammatory cytokines and ionizing radiations [2, 3]. This is illustrated by MnSOD knockout mice, which die just after birth [4].

Alteration of basal MnSOD expression and an imbalance of its activity with those of catalase and GPx may give rise to cancer development [5]. Low-basal MnSOD expression has been reported in numerous tumor cell lines compared to their nonmalignant counterparts. The restoration of MnSOD activity in these cancer cells has been shown to reduce their growth and proliferation, suggesting

that *MnSOD* could be considered as a tumor suppressor gene [6–10]. However, other recent studies report that thyroid tumors, central nervous system tumors, gastric and colorectal carcinomas, and acute leukemias exhibit high-MnSOD levels [11–14]. High-basal MnSOD expression is often correlated with increased invasive and metastatic properties of tumor cells [15, 16].

Previous works report that *MnSOD* is a tumor suppressor gene in human breast cancer. Transfection of *MnSOD* cDNA into the human estrogen-dependent breast cancer MCF-7 cell line reduced cell growth and suppressed the development of a malignant phenotype [17]. This study suggested that a low-expression of MnSOD led to an accumulation of $O_2^{\bullet}$- radicals, which act as second messenger molecules promoting cell proliferation [18]. On the other hand, a clinical investigation reported that the MnSOD level is positively correlated with the in vivo tumor grade in breast carcinomas, and, particularly with the invasive and metastatic phenotypes of advanced breast cancers [19].

The mechanism that induces breast cancer metastasis is still poorly understood. Advanced breast cancer cells are characterized by their nonexpression of estrogen receptor (ER), and by their invasive abilities compared to ER-positive tumors cells. These findings correlate with the poor initial prognostic value of ER-negative breast cancers compared to ER positive breast tumors noted in several clinical studies. Compared to the known tumor suppressive effect of MnSOD in estrogen-dependent human breast cancer cells, the role of this antioxidant enzyme in the growth of highly metastatic and estrogen-independent breast cancer cells has not yet been studied.

The aim of the present work was to investigate the level of the MnSOD and its role in growth and invasive properties of estrogen-independent breast cancer cells. Our results demonstrate for the first time that the basal MnSOD expression was higher in estrogen-independent breast cancer cells compared to estrogen-dependent tumor cells. We hypothesize that this increased level of MnSOD in estrogen-independent breast cancer cells leads to increased invasive properties.

Materials and methods

Cell culture and treatments

The human estrogen dependent (MCF-7 and T47D) and estrogen independent (MDA-MB231 and SKBR3) breast cancer cell lines were previously described for ER status and for their invasive and metastatic properties [20], and were kindly given by Prof. J. L. Merlin. Cancer cells were grown in RPMI 1,640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% (v/v) fetal calf serum and 5 μg/ml gentamicin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2. The culture medium was renewed every 2 days. Cells were detached weekly for transfer using 0.1% trypsin and 10 μM EDTA in phosphate buffer saline (PBS). MDA-MB231 cells were seeded at 1×10^4 cells/ml and treated either with one of two antioxidants, i.e., *N*-acetyl-*L*-cysteine (1 and 5 mM) and pyruvate (2 and 10 mM) (Sigma Co, St Louis, MO, USA) for 8 days, or with 2 μM Mn (III)tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) porphyrin pentachloride (MnTMPyP) (Biomol International, Plymouth, PA, USA), for 6 days. Absolute cell living rates were assayed by trypan blue exclusion.

RT-PCR analysis

Total RNA was isolated by Trizol (Invitrogen). The mRNA levels were analyzed by RT-PCR, using primers as already described in a previous report [21]. Ethidium bromide-stained PCR fragments were visualized by UV transillumination and the fluorescence intensity was quantified using a Gel Doc 2000 system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Protein assay

The human breast cancer cells were harvested and lysed in a 10 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 5 mM EDTA, 1% Triton X100 and a protease inhibitor cocktail, at 4°C for 30 min. After centrifugation at 17,000 × *g* for 20 min at 4°C, the total protein concentrations of supernatants were determined according to Lowry et al. [22], using bovine serum albumin as a standard (Bio-Rad).

Western blot analysis

A total protein (50 μg) was run on SDS-polyacrylamide gels (12%) according to Laemmli [23], and transferred onto a PVDF membrane as previously described [24]. Immunoblot analysis was then carried out using specific polyclonal anti-MnSOD (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), anti-Cu/ZnSOD (Biovalley, Marne la Vallée, France), anti-catalase [25], anti-GPx (LabFrontier, Seoul, South Korea), anti-peroxiredoxin 3 (PRDX3) (Sigma Co), anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and anti-cleaved PARP monoclonal (PharMingen Biosciences, Erembodegem, Belgium) antibodies at the optimized dilutions. Bands were detected using an anti-IgG polyclonal antibody conjugated to peroxidase (Sigma Co), after exposition to a chemiluminescent substrate. Band intensities were quantified by densitometry with a Gel Doc 2000 system (Bio-Rad). Equal

loading of protein in all experiments was confirmed by Coomassie blue staining of blots. Positive controls for detection of cleaved PARP were assayed according to the manufacturer PharMingen Biosciences with lysates from apoptotic Jurkat cells treated with 4 μM camptothecin for 4 h.

SOD gel activity

Cells were harvested and lysed in a 50 mM phosphate buffer, pH 7.8, containing a protease inhibitor cocktail, by 3 cycles of freezing/thawing. Proteins were quantified as described above. Equal amounts (50 μg) of protein from different samples were loaded onto a 8% polyacrylamide gels. Electrophoresis was performed in a nondenaturing running buffer, pH 8.3. The gels were stained for SOD activities by incubation with nitroblue-tetrazolium and riboflavin, as described by Beauchamp and Fridovich [26]. Band intensities corresponding to the MnSOD activity were quantified by densitometry with a Gel Doc 2000 system (Bio-Rad).

Enzyme assays

Cell lysates were prepared as described for SOD gel activity. Catalase activity was measured using a colorimetric assay purchased by Sigma Co, according to the method previously described [27]. This assay is based on the measurement of the H_2O_2 substrate remaining after the action of catalase. One unit of catalase was defined as 1 μmole of H_2O_2 degraded into O_2 and H_2O/min. GPx activity was determined by following the oxidation of NADPH at 340 nm as previously described [28], using *tert*-butylhydroperoxide as substrate. One unit of GPx activity was defined as 1 nmole NADPH consumed/min. The specific enzymatic activities (catalase and GPx) were expressed as units/mg protein in the breast cancer cell samples.

Measurements of intracellular peroxides

Measurements of intracellular peroxide production were based on the oxidation of the nonfluorescent dye 2′,7′-dichlorofluorescin-diacetate (DCFH-DA) (Sigma Co) to a fluorescent derivative, dichlorofluorescein (DCF). Cells (4×10^5) were grown in a 6-well dishes and treated for 24 h, in either the presence or the absence of antioxidants NAC (5 mM), pyruvate (10 mM), catalase-polyethylene glycol (PEG-CAT 200 U/ml) (Sigma Co) or 2 μM MnTMPyP. For the assays, the culture medium was replaced with PBS containing 50 μM DCFH-DA for 45 min at 37°C in the dark. Before analysis, cells were washed three times in PBS and scraped in a lysis buffer (10 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 5 mM EDTA, 1% Triton X100, 0.1% SDS and a protease inhibitor cocktail). After centrifugation for 5 min at 14,000 *g*, 200 μl of supernatant was used to record DCF fluorescence with a microplate reader (SAFAS, Monaco), at 485 nm excitation and 530 nm emission wavelengths. Relative fluorescence intensities were expressed as fold change of control (C) or untreated MDA-MB231 cells fixed at 1. Positive controls were cells treated with 0.5 mM H_2O_2 for 30 min after incubation with DCFH-DA. To show the specificity of intracellular peroxide measurement, cells were incubated with 50 μM DCF, the oxidation-insensitive fluorescent analogue of DCFH-DA (Sigma Co).

Measurements of reduced and total glutathione (GSH)

Cells (1×10^6) were grown in 6-well dishes and harvested with 300 μl perchloric acid (3.3%, w/v). After centrifugation at 12,000 *g* for 10 min at 4°C, intracellular content of GSH (total and reduced) was measured in supernatants, using HPLC system, as previously described [29]. Pellets containing the precipitated proteins were solubilized in 200 μl NaOH and quantified, according to Lowry et al. [22]. GSH level was expressed as nmol/mg protein. The oxidized GSH was calculated by subtracting the reduced GSH content from the total GSH.

Plasmid construction and transfection

Human MnSOD antisense cDNA was introduced into an expression vector in order to transfect MDA-MB231 cells and to examine the effect of decreased MnSOD expression on cell growth. The full-length human MnSOD cDNA containing its entire open reading frame (668 bp) was isolated from MDA-MB231 cells by RT-PCR using the Hi-fidelity Extensor PCR kit (AB Gene, Epsom, UK), the forward primer (5′-GGACTGGGTACCAGCATGTTGA GCCGGGCAG-3′) and the reverse primer (5′-CTG AGCTCTAGAGTTTACTTTTTGCAAGCCATG-3′) with *Kpn I* and *Xba I* ends, respectively, according to the manufacturer's instructions. The resulting MnSOD cDNA was inserted into the pcDNA3(-) mammalian expression vector (Invitrogen) between the *KpnI* and *XbaI* sites, driven by a cytomegalovirus promoter. The construction was verified by DNA sequence analysis, according to the dideoxy chain-termination method [30] to confirm the complete sequence of cDNA. The expression vector includes a Neo resistance gene driven by the SV40 promoter for clone selection. Four micrograms of the pcDNA3(-) plasmid, containing or not antisense human MnSOD cDNA, were used for stable transfection of

MDA-MB231 cells with TransPEI reagent (Eurogentec, Liege, Belgium) according to the manufacturer's instructions. The MDA-MB231 clones were selected with 800 μg/ml of G418 for 4 weeks. Single colonies were isolated and then screened for levels of MnSOD protein expression by Western blot analysis and SOD activity. Five days before the subsequent experiments, the cells were placed into the above described complete medium without G418 supplement.

Cell growth

Cells (1×10^4) were plated in 24-well dishes. The cell growth rate was determined by counting the number of cells with a hemocytometer as a function of time. Cell population doubling time (Td) was calculated from the growth rate during the exponential growth using the following formula: $Td = 0.693t/\ln(N_t/N_0)$, where t is time in days, N_t is the cell number at time, and N_0 is the cell number at the initial time.

Colony formation

Cells (5×10^2) were plated in 100-mm culture dishes and incubated for 12 days to allow colony formation. The colonies were then fixed in ethanol, stained with 0.1% crystal violet and scored when they contained more than 50 cells. Colony formation (%) was calculated as follows: colonies formed/cells seeded × 100%. Data were expressed as clonogenic survival fraction of Wt control or untreated MDA-MB231 cells fixed at 1.

Invasion assays

These were performed in modified Boyden Chambers with 8-μm pore filter inserts for 24-well plates coated with polycarbonate membrane (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA). MnSOD antisense-transfected MDA-MB231 cell clones 1 and 2, empty vector-transfected cells or parental MDA-MB231 cells either pretreated or not for 8 days with NAC (5 mM) or pyruvate (10 mM), were added at 2×10^5 per well to the upper chambers in 300 μl of serum free media. The lower chambers were filled with 500 μl of medium containing 10% fetal bovine serum. After a 24 h incubation at 37°C, noninvading cells were removed from the upper chambers with a cotton-tipped swab. Invading cells in the lower chambers were fixed, stained with 0.5% crystal violet, and then lysed using 10% SDS solution. One hundred microliters from each sample were transferred to a 96-well microtiter plate and the absorbance at 560 nm, representing the number of cells, was measured in a microplate reader (Labsystem, Cergy-Pontoise, France).

Gelatin zymography

MDA-MB231 cells, pretreated or not with NAC or pyruvate for 8 days, MnSOD antisense-transfected cell clones 1 and 2 or empty vector-transfected cells were cultured under normal conditions and then in a serum-free medium for 24 h. Thereafter, the conditioned medium was collected and equal aliquots were concentrated tenfold by using a Microcon centrifugal filter with a cut off for 10 kDa proteins (Millipore, St Quentin en Yvelines, France) and were then analyzed on gelatin substrate gels as described by Talhouk et al. [31]. Briefly, the concentrated conditioned medium (15 μl) was mixed with nonreducing Laemmli sample buffer and separated by electrophoresis on 10% polyacrylamide gels containing 1 mg/ml of gelatin (Sigma Co) as substrate. The gels were washed in 50 mM Tris–HCl (pH 8.0) containing 2.5% Triton X-100 for 3 h at room temperature, and were then incubated for 20 h in a developing buffer containing 50 mM Tris–HCl (pH 8.0), 10 mM $CaCl_2$, 50 mM NaCl, and sodium azide, before staining with 0.2% Coomassie blue in 25% isopropyl alcohol and 10% acetic acid for 30 min. The gels were destained with 10% methanol and 10% acetic acid. Gelatinase activities were visible as clear bands, indicative of proteolysis of the substrate protein. To determine equal protein loading in all experiments, 15 μl of conditioned medium from each sample were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis, followed by protein silver staining according to Merril et al. [32].

Statistical analysis

Measurements from DCF fluorescence, enzyme and GSH assays, cell growth and colony formation were expressed as means ± standard deviations (SD) from three independent experiments, each being replicated three times. Data from PCR reactions were determined as the ratio of the quantified fluorescence intensity of MnSOD or Cu/ZnSOD band to the GAPDH band from three independent experiments and were expressed as fold increases of values from MCF-7 cells ± SD. Results from Western blotting and SOD activities were expressed as fold increases of values from MCF-7 cells ± SD. Results from three separate experiments of the invasion assays were expressed as percentages ± SD over the control (parental and untreated cells) fixed at 100% invading cells. Evaluation of statistical significance was assessed using analyses of variance (ANOVA) and the Fisher protected least significant difference test. Statistical significance was indicated as $*P < 0.05$.

Results

MnSOD exhibits a high-basal expression in estrogen-independent breast cancer cells

Basal expression of MnSOD was assessed in both estrogen-independent (MDA-MB231 and SKBR3) and estrogen-dependent (MCF-7 and T47D) breast cancer cells, at both transcriptional and translational levels (Fig. 1). The MnSOD mRNA level estimated by RT-PCR analysis was 5.1-fold higher for MDA-MB231 and 3.1-fold higher for SKBR3 cell lines than for MCF-7 and T47D cell lines (Fig. 1a). These results correlated with the protein content and activity level. Western blot analysis showed that MDA-MB231 and SKBR3 cells had 16.3- and 13.5-fold higher levels of MnSOD protein, respectively, than MCF-7 and T47D cells (Fig. 1b). The MnSOD activity estimated on gel showed 5.2- and 3.5-fold higher levels for MDA-MB231 and SKBR3 cells, respectively, than for T47D and MCF-7 cells (Fig. 1c). No significant difference was observed for Cu/ZnSOD expression between all cancer cell lines.

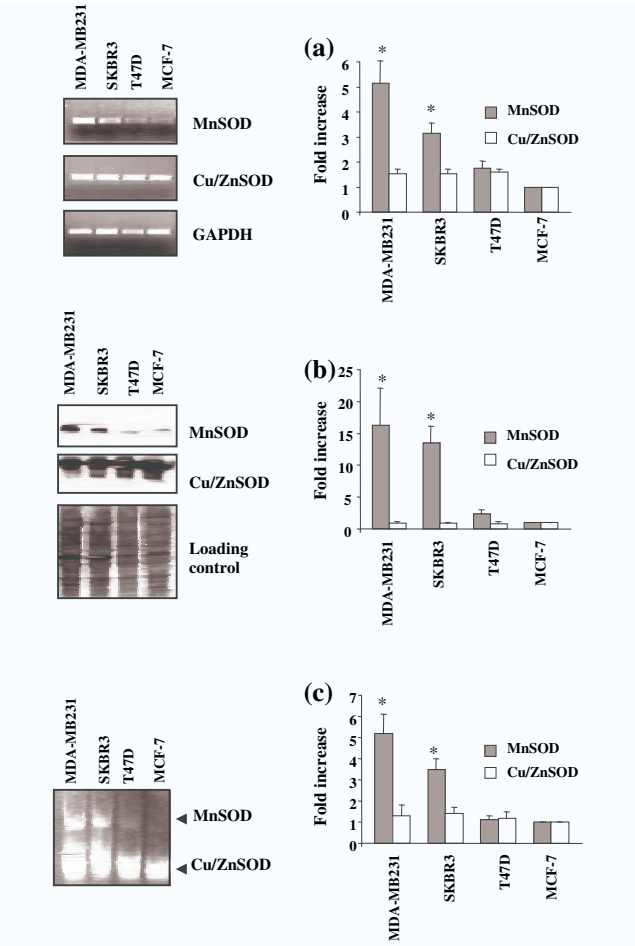


Fig. 1 MnSOD and Cu/ZnSOD expressions in human estrogen-independent and dependent breast cancer cells. (**a**) Total RNA was extracted from cells, then subjected to RT-PCR analysis. The relative levels of MnSOD and Cu/ZnSOD mRNAs were normalized to those of GAPDH mRNA. (**b**) MnSOD and Cu/ZnSOD proteins were analyzed in the total proteins (50 μg) extracted from cells by Western blotting, using polyclonal anti-MnSOD and anti-Cu/ZnSOD antibodies and chemiluminescent substrate. Coomassie blue membrane staining was used as the protein loading control. (**c**) MnSOD and Cu/ZnSOD activities were analyzed by nondenaturing electrophoresis and nitroblue-tetrazolium/riboflavin staining. Results are representative of the three independent experiments. Relative band intensities for RT-PCR, Western blot analysis and SOD gel activity were quantified by densitometry and data are expressed as fold increases over values for MCF-7 cells fixed at 1. Statistically significant differences from the MCF-7 values are indicated as $*P < 0.05$

H_2O_2-detoxifying enzymes exhibit a low-basal expression in estrogen-independent breast cancer cells

As with the MnSOD content, expression of the major H_2O_2-detoxifying enzymes, catalase, GPx, and PRDX3 were assessed at the protein level in both estrogen-independent (MDA-MB231 and SKBR3) and estrogen-dependent (MCF-7 and T47D) breast cancer cells (Fig. 2). Western blot analysis showed that estrogen-dependent breast cancer cells had higher level of catalase than MDA-MB231 and SKBR3 cells. Only MDA-MB231 cells exhibited a lower level of PRDX3 than the other cell lines (Fig. 2a). In accordance to Western blot analysis, catalase activities (units/mg) were significantly higher in MCF-7 (24.70 ± 2.74) and T47D (29.65 ± 1.34) than in MDA-MB231 (7.11 ± 1.31) and SKBR3 cells (4.78 ± 0.34), as shown in Fig. 2b. However, all breast cancer cell lines exhibited a very low-apoprotein level and activity of GPx (Fig. 2a, b), even if GPx activity in MCF-7 and T47D cells (2.12 ± 0.10 and 2.31 ± 0.22, respectively) was higher than in MDA-MB231 and SKBR3 cells (0.92 ± 0.19 and 1.13 ± 0.12, respectively).

High MnSOD content in MDA-MB231 cells is associated with high level of intracellular H_2O_2

MDA-MB231 cells expressing the highest MnSOD levels were used in the following experiments. Because of the imbalance found in basal antioxidant enzyme levels, the intracellular peroxide production was evaluated in MDA-MB231 cells, using the DCF fluorescence method. As shown in Fig. 3a, MDA-MB231 cells exhibited an ~2.6-fold higher intracellular peroxide production than MCF-7 cells, which expressed a low level of MnSOD. This basal production of peroxide was attenuated in MDA-MB231 cells treated for 24 h with the specific H_2O_2 scavengers NAC, pyruvate or PEG-CAT, whereas it was increased after 24 h-treatment with a cell permeable SOD mimetic MnTMPyP (Fig. 3b). In addition, these experiments were

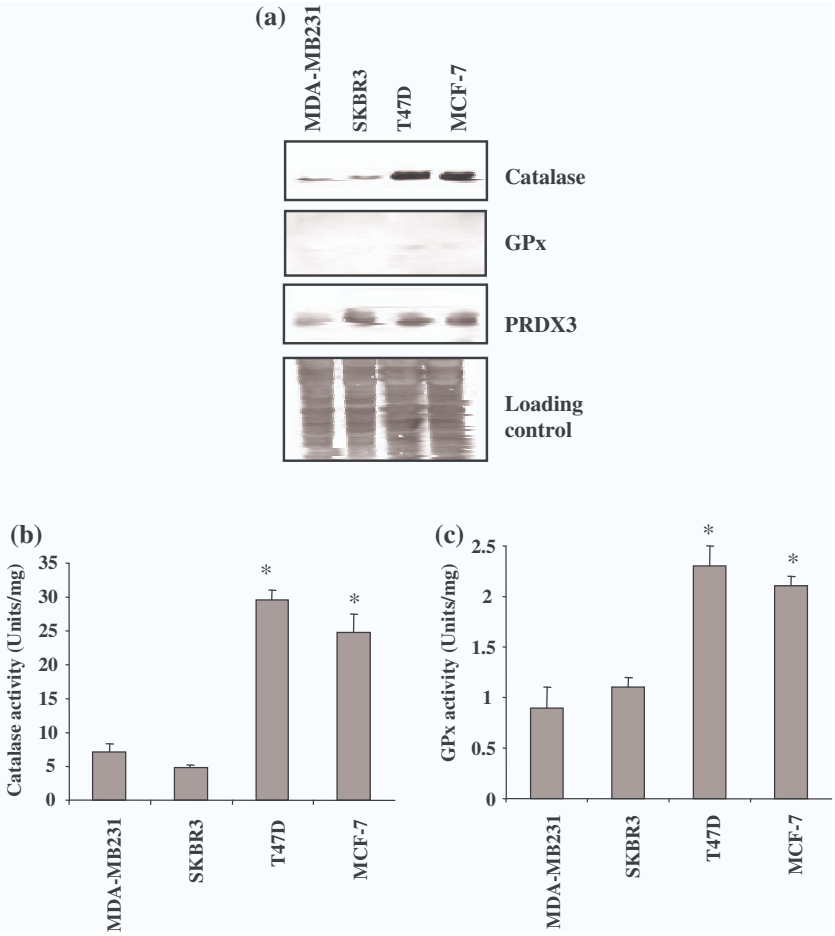


Fig. 2 Hydrogen peroxide-detoxifying enzyme levels in human estrogen-independent and dependent breast cancer cells. (**a**) The protein levels of the H_2O_2-detoxifying enzymes, catalase, GPx and PRDX3 were analyzed by Western blotting, with equal amounts of proteins (50 μg) extracted from cells, using specific polyclonal antibodies. Coomassie blue membrane staining was used as the protein loading control. (**b, c**) Catalase and GPx activities were determined in breast cancer cell lysates and were expressed as units/mg protein. Statistically significant differences from the MDA-MB231 and SKBR3 values are indicated as $*P < 0.05$

completed using DCF, the oxidation-insensitive fluorescent analogue of DCFH-DA to control possible changes in probe uptake, ester cleavage, or efflux. These data showed no difference in labeling between the MDA-MB231 and MCF-7 cells (Fig. 3c). Taken together, these results provide strong evidence that the intracellular peroxide level increased in MDA-MB231 cells was presumably H_2O_2.

MnSOD down-regulation modulates MDA-MB231 cell growth

The high-basal expression of MnSOD in human estrogen-independent breast carcinoma cells led us to further investigate the potential in vitro role of this antioxidant enzyme in the regulation in vitro of cell proliferation and colony formation. We used the MnSOD antisense technique to specifically down-regulate MnSOD expression in the MDA-MB231 cells that showed the highest levels of the antioxidant enzyme. The breast cancer cells were stably transfected with a pcDNA vector containing MnSOD cDNA antisense, and MnSOD protein and activity levels were measured in transfectant lysates. As shown in Fig. 4a, b, the levels of both MnSOD protein and activity were strongly decreased in the two isolated clones named cl.1 and cl.2, compared to those in parental (Wt) and empty vector-transfected cells (Neo). The expression of Cu/ZnSOD was not affected in transfected and control cells. As a result of MnSOD suppression, the basal H_2O_2 production decreased significantly by 1.7- and 2.0-fold, associated with an increased level of total and reduced GSH, but not oxidized GSH in MnSOD antisense-transfected cell clones 1 and 2, respectively (Fig. 4c, d). No significant difference was observed between control Wt and Neo cells.

Growth curves were assessed by seeding cells in 24-well tissue culture plates at 1×10^4 cells/well and then cells were counted every other day following the two initial culture days. As shown in Fig. 5, the two MnSOD antisense-transfected cell clones 1 and 2 showed an approximately similar growth rate and grew faster than the Wt and the Neo cells. At day 6 after plating, the clones 1 and 2 exhibited ~1.8 and 2.3-fold more cells than the control Wt cells, respectively. The difference between control Neo and Wt cells was only 1.2-fold (Fig. 5a). The increased cell growth rate for the MnSOD antisense-transfected cell clones 1 and 2 was associated with an increased level of the PCNA proliferation marker (Fig. 5b).

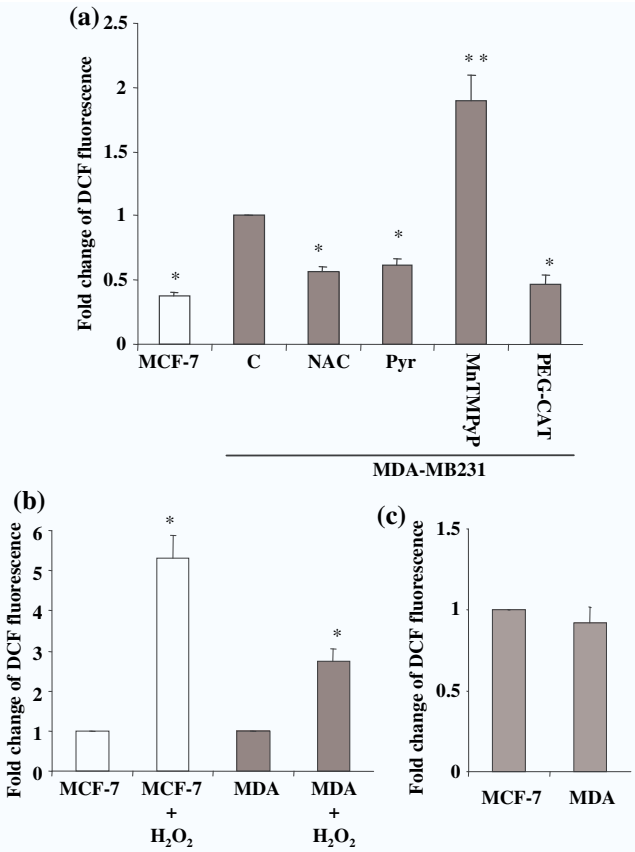


Fig. 3 Intracellular peroxide production in MDA-MB231 cells. (**a**) MDA-MB231 cells either treated or not for 24 h with 5 mM NAC, 10 mM pyruvate (Pyr), 2 μM MnTMPyP or 200 U/ml PEG-CAT and untreated MCF-7 cells were stained with the oxidation-sensitive fluorescent probe DCFH-DA. The DCF fluorescence intensities, corresponding to the levels of intracellular H_2O_2, were recorded with a microplate reader at 485 nm excitation and 530 nm emission wavelengths, and were expressed as fold change of control or untreated MDA-MB231 cells. Data from the three independent cell lysates showed a significant difference (*$P < 0.05$) between MCF-7 and MDA-MB231 cells, and between MDA-MB231 cells treated with NAC, Pyr, or PEG-CAT and untreated MDA-MB231 cells (*C*). A significant difference was observed between MDA-MB231 cells treated with MnTMPyP versus untreated cells (**$P < 0.05$). (**b**) MDA-MB231 or MCF-7 cells were treated with 0.5 mM H_2O_2 for 30 min and were used as positive controls for experiments with DCF fluorescence. Significant differences were observed between the MDA-MB231 and MCF-7 cells treated with H_2O_2 compared to both untreated cell lines (*$P < 0.05$). (**c**) MDA-MB231 and MCF-7 cells were stained with the oxidation-insensitive fluorescent probe DCF and fluorescence intensities were recorded as described above. No significant difference was observed between the both cell lines

Moreover, the cell growth rate of MnSOD antisense-transfected cell clone 2 was not affected by a 5 days treatment with the cell permeable SOD mimetic MnTMPyP (Fig. 5c), suggesting specific involvement of mitochondrial MnSOD in the regulation of the MDA-MB231 cell growth. Cell population Tds were calculated from cell growth curves (Fig. 5d). In accordance with the growth rate, the Tds of the MnSOD antisense-transfected cell clones 1 and 2 (31.7 and 29.3 h, respectively) were shorter than those observed for the control Wt and Neo cells (38.8 and 36.4 h, respectively).

Colony formation was carried out to determine the clonogenicity of the MnSOD antisense-transfected cell clones (Fig. 5e). The clonogenic survival fraction was significantly decreased in the MnSOD antisense-transfected cell clones 1 and 2 (2.2- and 4.0-fold, respectively) compared to the control Wt cells (colony formation value of 10.9 ± 1.2%). No significant difference was observed between control Wt and Neo cells (plating efficiency value of 13.5 ± 2.9%).

Hydrogen peroxide overproduction is involved in the MDA-MB231 cell growth

We investigated the role of H_2O_2 in MDA-MB231 cell growth, the major reactive oxygen species (ROS) derived from the high-MnSOD activity in MDA-MB231 cells. The growth rate and colony formation were investigated for parental cells cultured for 8 days in the presence of the antioxidants NAC and pyruvate, both at two different concentrations. The MDA-MB231 cells treated with NAC or pyruvate exhibited a slower growth rate than untreated cells. After 8 days of culture, the treatment with NAC (1 or 5 mM) or pyruvate (2 or 10 mM) led to a significant decrease in cell numbers, by 1.9 and 2.4-fold or 1.7- and 2.7-fold, respectively, in contrast to untreated cells (Fig. 6a). The cell population Td increased from 36.2 h for untreated cells to 46.8 and 45 h for 5 mM NAC and 10 mM pyruvate, respectively (Fig. 6b). These results were associated with a decrease in the PCNA protein level in antioxidant-treated cells (Fig. 6c). No apoptosis was observed as no cleaved PARP was detected (Fig. 6c) and no necrotic cells were counted by trypan blue exclusion test (data not shown). In addition, the clonogenic survival fraction (Fig. 6d) was significantly decreased by 3.6-fold for MDA-MB231 cells treated with the highest concentrations of NAC and pyruvate compared to untreated cells (colony formation value of 9.9 ± 1.5%). These results suggest that H_2O_2 plays an important role in MDA-MB231 cell growth.

MnSOD modulates the invasive properties of MDA-MB231 cells through H_2O_2 production

To investigate the effects of MnSOD down-regulation and of H_2O_2 scavenging on cell invasive properties, cells were plated in modified Boyden chambers. After 24 h, the number of migratory cells was measured in the lower chambers. No significant difference was observed between the control Wt and Neo cells. However, the invasive capacities of the MnSOD antisense-transfected cell clones

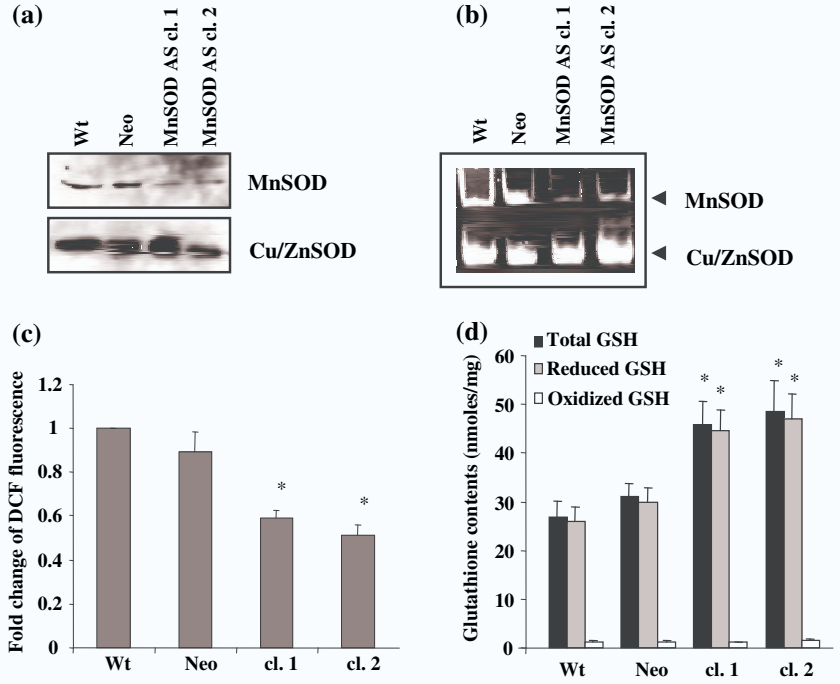


Fig. 4 MnSOD protein and activity levels and intracellular H_2O_2 and GSH contents in MnSOD antisense-transfected MDA-MB231 cells. (**a**) MnSOD protein level was assessed by Western blot analysis using equal amounts of protein (50 μg) extracted from parental cells (Wt), empty vector-transfected cells (*Neo*) and the two MnSOD antisense-transfected cell clones (*MnSOD AS cl*.1 and *cl*.2) using MnSOD polyclonal antibody. The Cu/ZnSOD protein level was probed with its polyclonal antibody as a control for protein loading. (**b**) MnSOD activity was analyzed on nondenaturing gel after nitroblue-tetrazolium/riboflavin staining and compared to Cu/ZnSOD activity. (**c**) Intracellular H_2O_2 production was quantified by DCF fluorescence method in parental cells (Wt), empty vector-transfected cells (*Neo*) and the two MnSOD antisense-transfected cell clones (*MnSOD AS cl*.1 and *cl*.2). Data were expressed as fold change of Wt control cells. (**d**) Intracellular level of GSH (total and reduced GSH) was quantified by HPLC in in control cells (Wt and Neo) and the two MnSOD AS cl.1 and cl.2. Oxidized GSH level was calculated by subtracting the reduced GSH content from the total GSH. Data were expressed as nmoles/mg protein. A significant difference was noted between both cl.1 and cl.2 versus Wt (*$P < 0.05$)

1 and 2 were markedly reduced, by 43.4 and 39.2%, respectively, in contrast to those of the control Neo cells (Fig. 7a). Furthermore, pretreatment of parental MDA-MB231 cells for 8 days with the antioxidants NAC (5 mM) or pyruvate (10 mM) reduced their invasive capacities, by 37.3 and 41.9%, respectively, in contrast to those of the control cells fixed at 100% (Fig. 7a). The reduced invasive properties of both MnSOD antisense-transfected cell clones 1 and 2 and of antioxidant-treated parental cells were associated with a reduced activity of matrix metalloproteinase (MMP), expressed abundantly in MDA-MB231 cells as gelatinase 82 kDa active MMP-9 secreted into the culture medium (Fig. 7b). These data indicate that high-basal MnSOD expression is partly involved in the invasive capacities of MDA-MB231 cells through H_2O_2 production and modulation of MMP-9 activity.

Discussion

Altered MnSOD levels have been found in many cancer cells. Depending on cancer type, increased or decreased levels of MnSOD have been reported in tumor cells, as compared to their normal counterparts [7–12, 14]. Our results show that estrogen-independent breast cancer cell lines such as MDA-MB231 and SKBR3 exhibit a high-basal MnSOD expression, when compared to those of T47D and MCF-7 estrogen-dependent cancer cell lines. This suggests that *MnSOD* may be either up-regulated or repressed depending on malignant phenotype. We postulate that MnSOD content could be related to the ER expression in breast cancers. Whereas, the reduced expression of MnSOD is due to either mutations in the promoter of the gene [33], to abnormal methylation [34] or to loss of heterozygosity [35] in some cancer cell types, MnSOD up-regulation in tumor cells is not well known. We hypothesize for the estrogen-independent cancer cells that MnSOD up-regulation could be dependent on the high-constitutive activation of the transcription factor NF-κB, which is known to regulate *MnSOD* expression [36, 37]. The high-MnSOD content correlates with the invasive and metastatic properties of MDA-MB231 and SKBR3 cells. Recent clinical studies have reported a correlation between high-MnSOD content and both tumor

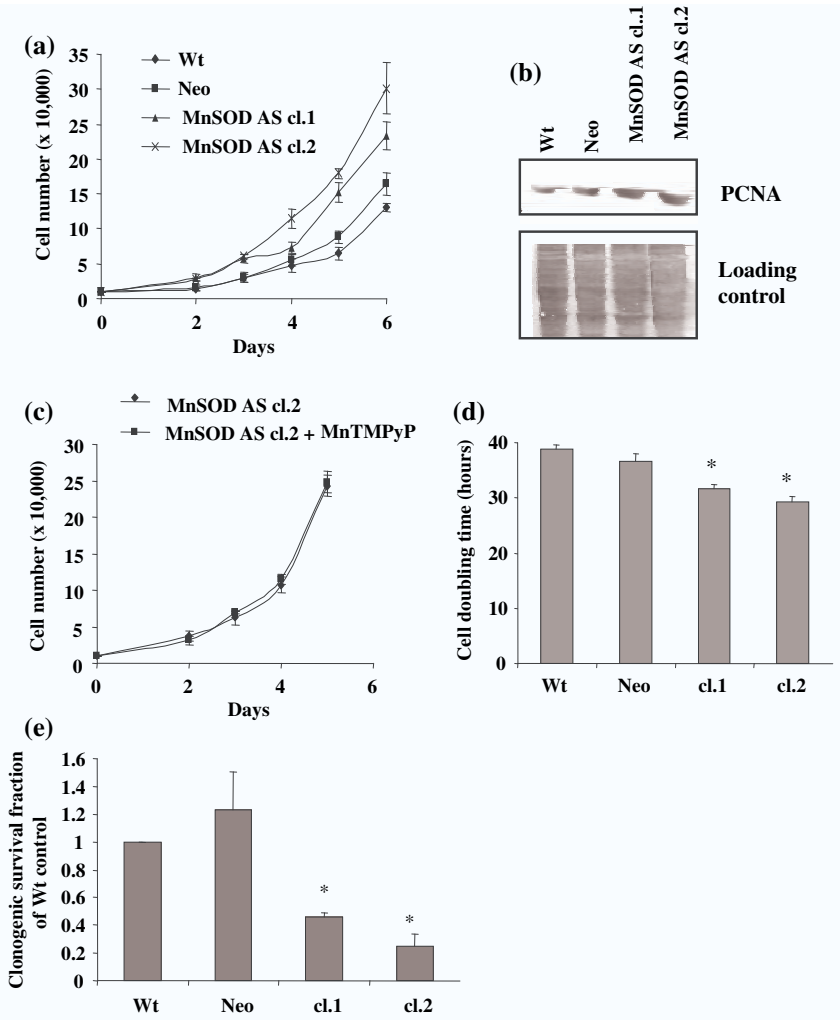


Fig. 5 Effect of MnSOD suppression on growth and colony formation of MDA-MB231 cells. (**a**) Parental cells (Wt), empty vector-transfected cells (*Neo*) and the two MnSOD antisense-transfected cell clones (*MnSOD AS cl*.1 and *cl*.2) were plated in 24-well dishes (1×10^4 per well) and cultured in complete medium. Cell numbers were counted on days 2, 3, 4, 5, and 6. Means are shown for the three experiments. (**b**) The protein level of PCNA was analyzed by Western blotting with equal amounts of proteins (50 μg) extracted from control Wt cells, Neo cells, and MnSOD AS cl.1 and cl.2, using PCNA polyclonal antibody. Coomassie blue membrane staining was used as the protein loading control. (**c**) The MnSOD antisense-transfected cell clone 2 (MnSOD AS cl.2) was treated for 5 days with 2 μM MnTMPyP and the cell growth was compared to that of the untreated MnSOD AS cl.2. (**d**) Cell population doubling time was calculated from the cell growth curve during the exponential growth phase. (**e**) Cells were seeded (500 cells) in 100-mm dishes and grown for 12 days. Colonies with more than 50 cells were counted and results from the three independent experiments were obtained as the % of colony formation = (colonies formed/cells seeded) × 100%. Data are represented as clonogenic survival fraction of Wt control fixed at 1. Statistically significant differences from the parental (Wt) cell value are indicated as $*P < 0.05$

grade and invasiveness of breast cancer [19] and of metastatic gastric and colorectal cancers [13, 15]. In addition, it has been reported a high-MnSOD level in primary prostate cancer at the invasive edge of the cancer [38]. So, it was thought to be important to investigate the role of MnSOD in the growth and invasiveness of breast tumor cells such as MDA-MB231 cells that express a high-MnSOD activity.

Up-regulation of MnSOD in estrogen-independent cancer cells was associated with an unexplained low expression of catalase and GPx. Moreover, catalase and GPx expressions were related to the ER status, as previously described [39]. An imbalance of these major antioxidant enzymes may lead to an aberrant regulation of ROS production and may be involved in the development of cancer [40]. An excessive production of ROS usually results in cytotoxic effects characterized by oxidative cell injuries, such as damages to DNA, protein and lipid membranes, and/or activates redox sensitive signaling molecules such as kinases and transcription factors. These effects may lead to malignant cell transformation and tumor progression [1]. Our study shows a higher intracellular peroxide level in MDA-MB231 cells than in MCF-7 cells, which is

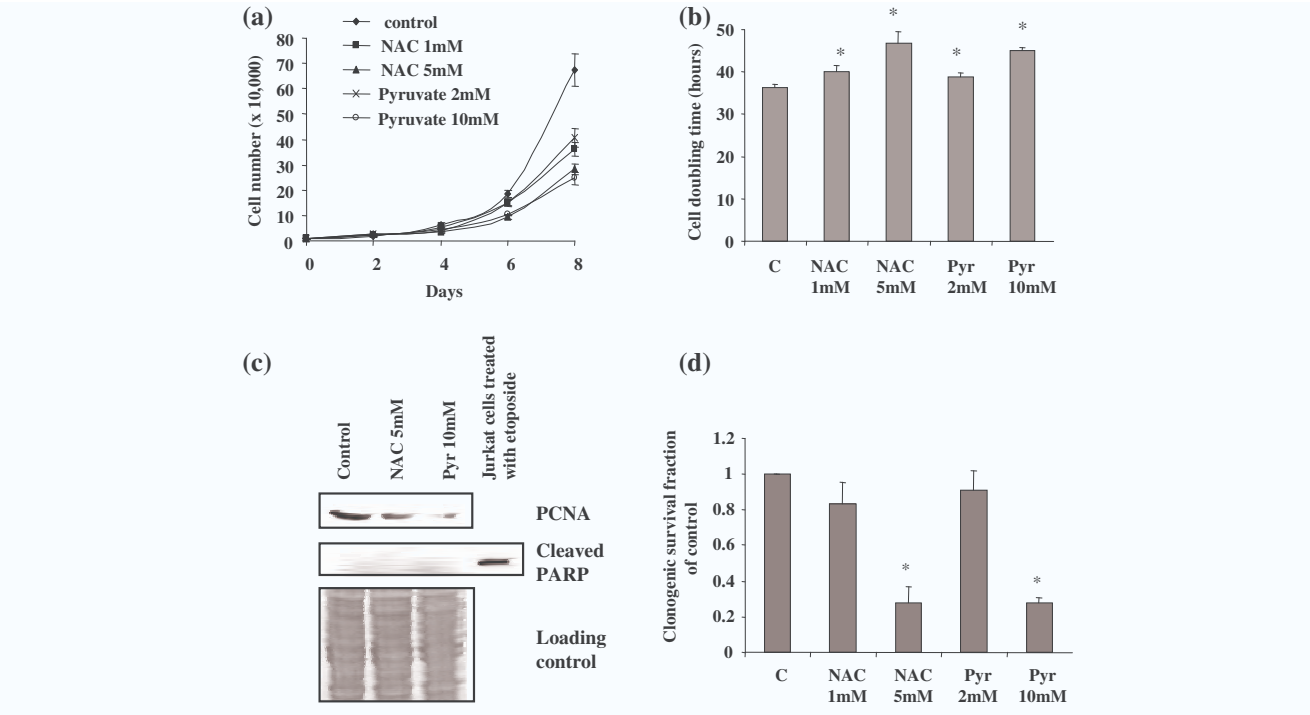


Fig. 6 Effect of H_2O_2 scavengers on growth and colony formation of MDA-MB231 cells. (**a**) MDA-MB231 cells were plated in 24-well dishes (1×10^4 per well) and cultured in complete medium containing H_2O_2 scavengers NAC (1 or 5 mM) or pyruvate (2 or 10 mM). Cell numbers were counted on days 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8. Means are shown for the three experiments. (**b**) Cell population doubling time was calculated from the cell growth curve during the exponential growth phase. (**c**) The protein levels of PCNA and cleaved PARP were analyzed by Western blotting, using equal amounts of protein (50 μg) extracted from untreated MDA-MB231 cells and MDA-MB231 cells treated with either 5 mM NAC or 10 mM pyruvate (*Pyr*) for 8 days. A positive control with camptothecin-treated Jurkat cells was done for cleaved PARP. Coomassie blue membrane staining was used as the protein loading control. (**d**) MDA-MB231 cells were seeded (500 cells) in 100-mm dishes and grown for 12 days with H_2O_2 scavengers NAC (1 or 5 mM) or pyruvate (2 or 10 mM). Colonies with more than 50 cells were counted and results from the three independent experiments were obtained as the % of colony formation = (colonies formed/cells seeded) × 100%. Data are represented as clonogenic survival fraction of control (*C*) fixed at 1. Statistically significant differences from the untreated cell (*C*) value are indicated as $*P < 0.05$

presumably H_2O_2. This is due to the imbalance of the antioxidant enzymes, as measured by a higher MnSOD content and a lower basal expression of catalase, and PRDX3 than in MCF-7 cells. The difference in H_2O_2 level between MDA-MB231 and MCF-7 cells was not dependent of the GPx level, because this H_2O_2–detoxifying enzyme was poorly expressed in breast cancer cells, as previously described [39]. However, these data suggest that H_2O_2 is mainly produced in mitochondria, given that MnSOD is strictly localized in this organelle, and GPx and PRDX3 are the major mitochondrial peroxidases [1, 41].

It is known that MnSOD plays a role in the regulation of cancer cell growth. Tumor cells with low-MnSOD levels present with a high-growth rate and a decreased cell Td but low-metastatic potential [18]. To investigate the role of this antioxidant enzyme in MDA-MB231 cells, suppression of its basal expression was carried out using the antisense RNA technique. Our results show that MnSOD suppression changes the characteristics of MDA-MB231 cell growth. Parental MDA-MB231 cells with the highest MnSOD activity exhibited a cell Td of 36 h, longer than the 20 h Td of MCF-7 cells (data not shown). This decreased Td in MnSOD down-regulated-MDA-MB231 cells, suggests an MnSOD-dependent stimulation of tumor cell growth. However, colony formation decreased in MnSOD suppressed-MDA-MB231 cells compared to parental cells, suggesting that MnSOD may also be involved in the clonogenic ability of MDA-MB231 cells. The formation of colonies is generally believed to be a characteristic of tumor cells compared to normal cells. It is also believed to relate to the metastatic potential of tumor cells depending on their invasive abilities.

The mechanism by which MnSOD plays a role in tumor growth is dependent on the overall balance of ROS and antioxidant levels, which varies among cancer cell types. It has been postulated that the low-MnSOD level may lead to an accumulation of intracellular $O_2^{\bullet}$-, which promotes proliferation of cancer cells, as has been shown in ovarian and breast cancer MCF-7 cells [17, 42]. ROS are known to promote the activation of the Ras-mediated signaling

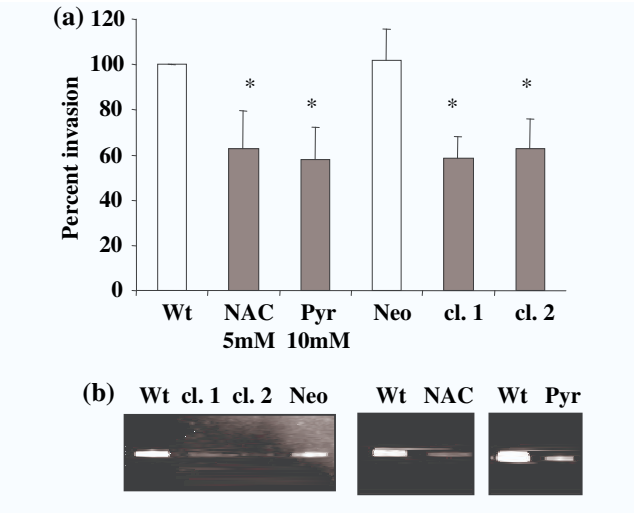


Fig. 7 Effect of MnSOD suppression and H_2O_2 scavengers on MDA-MB231 cell invasion and on MMP-9 activity. (**a**) Parental cells (Wt), empty vector-transfected cells (*Neo*), the two MnSOD antisense-transfected cell clones (MnSOD AS cl.1 and cl.2) and parental cells treated for 8 days with either 5 mM NAC or 10 mM pyruvate (*Pyr*) were assayed for invasion in modified Boyden Chambers. After 24 h, the invaded cells from the lower chambers were fixed and stained with crystal violet. Absorbance at 560 nm was measured and data from the three independent experiments were expressed as percentages of the control parental MDA-MB231 cells, defined as 100% invading cells. (**b**) Parental cells (Wt), empty vector-transfected cells (*Neo*), the two MnSOD antisense-transfected cell clones (MnSOD AS cl.1 and cl.2) and parental cells pretreated for 8 days with either 5 mM NAC or 10 mM pyruvate (*Pyr*) were cultured for 24 h with a serum-free medium. The conditioned media were then collected, concentrated and subjected to gelatin zymographic analyses to detect the MMP-9 gelatinase activity secreted by cells

pathway involved in cell proliferation [43]. Our study has shown that a high-MnSOD level coupled to a low-H_2O_2-detoxifying enzyme expression gives rise to an overproduction of H_2O_2 in MDA-MB231 cells. We postulate that the accumulation of H_2O_2 in these cells also plays a role in cell growth. We demonstrated this by experiments using the antioxidants NAC and pyruvate, specific H_2O_2 scavengers; these inhibited tumor cell growth. The cell permeable SOD mimetic MnTMPyP, which does not enter mitochondria, does not reverse the effect of MnSOD suppression, suggesting that the H_2O_2 produced in mitochondria is mainly involved in cell growth. Mitochondria are known to play a role in cancer cell growth and transformation through ROS-releasing metabolic activity [44]. It is not surprising that MnSOD-dependent H_2O_2 is an important mediator in cell proliferation, because this ROS activates the MAPK-dependent signaling pathway and transcription factors such as NF-κB and AP-1, which are required for cell cycle progression in cancer cells [45, 46]. On the other hand, it has been demonstrated that MnSOD-forced over-expression in tumor cells increases intracellular H_2O_2 levels, and leads to a decline in cell growth, and that this tumor suppressive effect of MnSOD was reversed with addition of H_2O_2 scavengers or by co-expression of GPx or catalase [5, 17]. This suggests a distinct sensitivity of cancer cells to H_2O_2, depending on their ability to detoxify the ROS or to activate the appropriate mitogenic signaling pathway [9, 47].

Another hypothesis in our study was that MnSOD up-regulation could affect the invasive abilities of MDA-MB231 cells. A previous study indicated that an elevated MnSOD level was associated with an increased frequency of tumor invasion and metastasis in certain cancers [48], such as breast cancers [19]. MDA-MB231 cells exhibit high invasive and metastatic properties and MnSOD suppression reduced their invasive capacity. These results suggest that MnSOD plays a role in the regulation of the invasiveness of breast cancer cells. This could explain the decrease in colony formation observed for MnSOD down-regulated-MDA-MB231 cells compared to parental cells. Reduction of the invasive capacity by MnSOD suppression was associated with a reduced MMP-9 activity. This enzyme is the major MMP gelatinase secreted by aggressive breast cancer cells, such as MDA-MB231 cells, and plays a critical role in breast tumor cell invasion and metastasis [49]. Our findings suggest that MnSOD may regulate the MMP-9 activity in metastatic breast cancer cells. Invasiveness of MDA-MB231 cells was also reduced after treatment of parental cells with NAC or pyruvate. Our results suggest that MnSOD-dependent production of H_2O_2 is involved in the regulation of the invasive capacity of breast tumor cells. This ROS may contribute to the signaling pathway that modulates the MMP-9 gelatinase activity as already reported for MMP-1 and -2 [50, 51]. In addition, MMP-9 is known to be activated by H_2O_2 in a conditioned medium of cultured smooth muscle cells and macrophages [52]. It is likely that H_2O_2 modulates the MMP-9 activity in MDA-MB231 cells through the MAPK and transcription factors AP-1 and NF-κB signaling pathways, which are constitutively activated in MDA-MB231 cells [33, 53].

In summary of the above, some studies have already shown that tumor cells with elevated levels of MnSOD and increased MMP-1 and -2 activities are more invasive and are associated with slow tumor growth [51]. It is known that MCF-7 cells, with a low-MnSOD level are poorly invasive and nonmetastatic, despite a high-growth rate [17, 20]. MnSOD-forced overexpression in these cancer cells regulates the activation of MMP-2, suggesting a potential modulation of their invasiveness, despite a slower growth rate [50]. Also, these observations associated with the present study suggest that an elevated levels of MnSOD may reflect tumor progression to a metastatic phenotype in breast cancer cells. The increase of MnSOD expression in breast cancer cells may represent a mechanism by which,

by boosting the intracellular concentration of H_2O_2, they reduce their proliferation rate and increase their invasive capacity. In this case, we postulate that MnSOD up-regulation would be associated with a poor prognosis in advanced breast cancer. However, the molecular mechanism by which the metastatic breast cancer cells up-regulate MnSOD expression and the factors influencing MnSOD expression, have not yet been elucidated and will need to be defined.

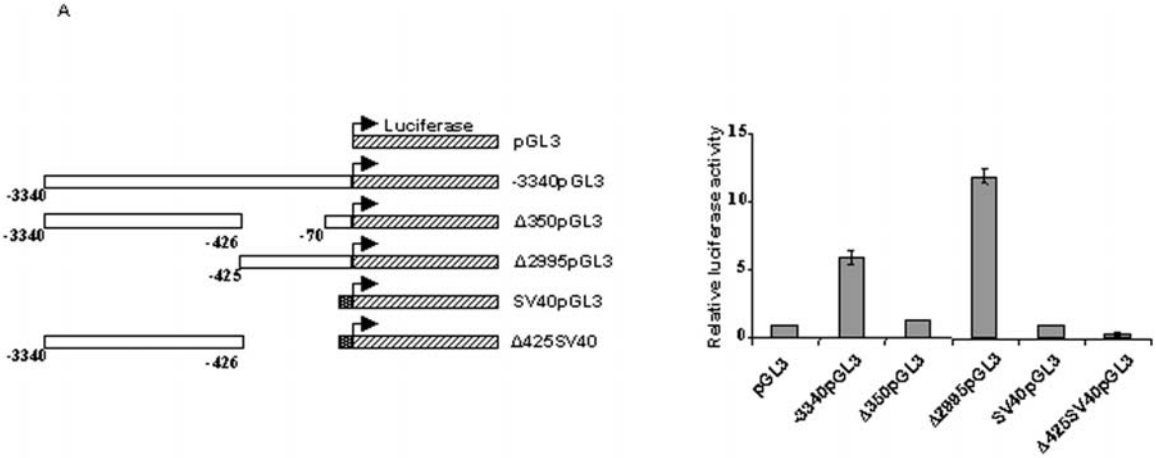
In conclusion, the present study provides evidence that basal MnSOD expression in human estrogen-independent breast cancer cells is high compared to that in estrogen-dependent breast cancer cells and normal mammary cells, and plays a H_2O_2-mediated role in cell growth and tumor metastasis. These findings suggest that the assessment of MnSOD status in breast cancers might be useful during treatment. Elevated levels of MnSOD may influence the effectiveness of both radiation therapy and ROS-forming anticancer drugs. This has already been suggested for oesophageal, colorectal and gastric cancers [13, 15, 16]. Finally, effects of H_2O_2 scavengers on growth and invasiveness of breast cancer cells suggest that these molecules may prove useful in anticancer treatment when combined with chemotherapeutic drugs.

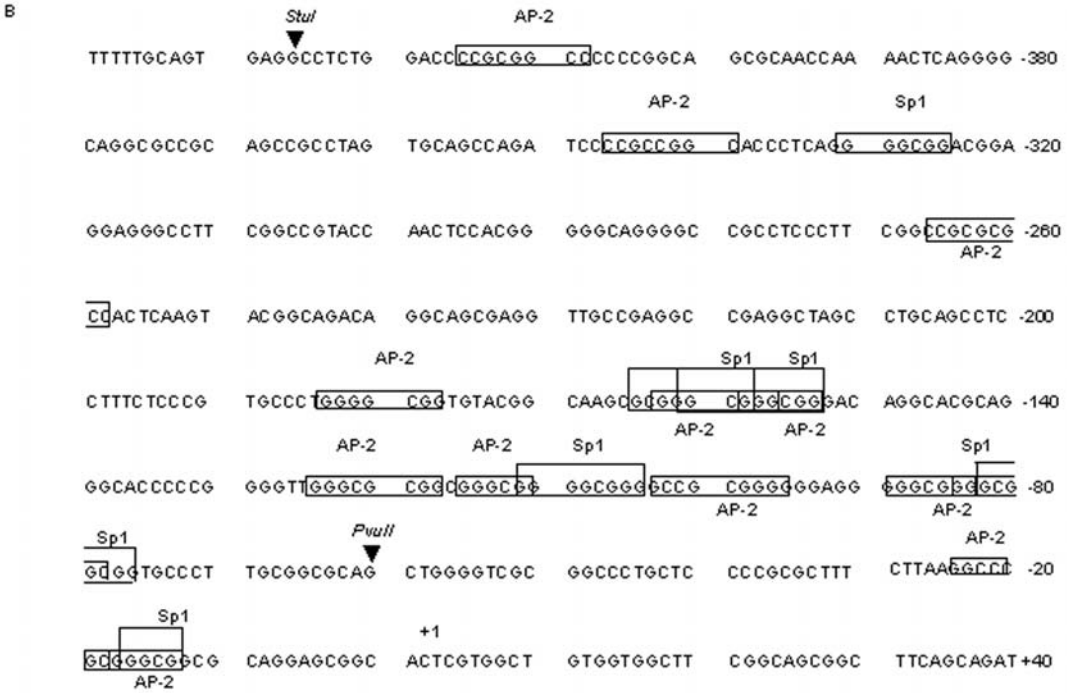
Acknowledgments The authors are grateful to E. Brunner and L. Tirand for their skillful technical assistance, to Professor J. L. Merlin (Centre Alexis Vautrin, Vandoeuvre lès Nancy, France) for the gift of breast cancer cell lines, and to Dr. A. Taube for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (Comité de Meuse), Association pour la Recherche sur le Cancer and the Université Henri Poincaré-Nancy I. Z. Kattan and V. Minig have a fellowship from Syrian Government and the Ligue contre le Cancer (Comité de Meurthe et Moselle), respectively. Z. Kattan and V. Minig contributed equally to this work.

References

1. Matés JM (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 153:83–104
2. St Clair DK, Wan XS, Oberley TD, Muse KE, St Clair WH (1992) Suppression of radiation-induced neoplastic transformation by overexpression of mitochondrial superoxide dismutase. Mol Carcinog 6:238–242
3. Kiningham KK, Oberley TD, Lin S, Mattingly CA, St Clair DK (1999) Overexpression of manganese superoxide dismutase protects against mitochondrial-initiated poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell death. FASEB J 13:1601–1610
4. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 93:9782–9787
5. Ridnour LA, Oberley TD, Oberley LW (2004) Tumor suppressive effects of MnSOD overexpression may involve imbalance in peroxide generation versus peroxide removal. Antioxid Redox Signal 6:501–512
6. Bravard A, Sabatier L, Hoffschir F, Ricoul M, Luccioni C, Dutrillaux B (1992) SOD2: a new type of tumor-suppressor gene? Int J Cancer 51:476–480
7. Church SL, Grant JW, Ridnour LA, Oberley LW, Swanson PE, Meltzer PS, Trent JM (1993) Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 90:3113–3117
8. Li N, Oberley TD, Oberley LW, Zhong W (1998) Overexpression of manganese superoxide dismutase in DU145 human prostate carcinoma cells has multiple effects on cell phenotype. Prostate 35:221–233
9. Kim KH, Rodriguez AM, Carrico PM, Melendez JA (2001) Potential mechanisms for the inhibition of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. Antiox Redox Signal 3:361–373
10. Cullen JJ, Weydert C, Hinkhouse MM, Ritchie J, Domann FE, Spitz D, Oberley LW (2003) The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res 63:1297–1303
11. Nishida S, Akai F, Iwasaki H, Hosokawa K, Kusunoki T, Suzuki K, Taniguchi N, Hashimoto S, Tamura TT (1993) Manganese superoxide dismutase content and localization in human thyroid tumours. J Pathol 169:341–345
12. Cobbs CS, Levi DS, Aldape K, Israel MA (1996) Manganese superoxide dismutase expression in human central nervous system tumors. Cancer Res 56:3192–3195
13. Janssen AM, Bosman CB, van Duijn W, Oostendorp-van de Ruit MM, Kubben FJ, Griffioen G, Lamers CB, van Krieken JH, van de Velde CJ, Verspaget HW (2000) Superoxide dismutases in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer. Clin Cancer Res 6:3183–3192
14. Nishiura T, Suzuki K, Kawaguchi T, Nakao H, Kawamura N, Taniguchi M, Kanayama Y, Yonezawa T, Iizuka S, Taniguchi N (1992) Elevated serum manganese superoxide dismutase in acute leukemias. Cancer Lett 62:211–215
15. Malafa M, Margenthaler J, Webb B, Neitzel L, Christophersen M (2000) MnSOD expression is increased in metastatic gastric cancer. J Surg Res 88:130–134
16. Toh Y, Kuninaka S, Oshiro T, Ikeda Y, Nakashima H, Baba H, Kohnoe S, Okamura T, Mori M, Sugimachi K (2000) Overexpression of manganese superoxide dismutase mRNA may correlate with aggressiveness in gastric and colorectal adenocarcinomas. Int J Oncol 17:107–112
17. Li JJ, Oberley LW, St Clair DK, Ridnour LA, Oberley TD (1995) Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. Oncogene 10:1989–2000
18. Oberley LW (2005) Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. Biomed Pharmacother 59:143–148
19. Tsanou E, Ioachim E, Briasoulis E, Damala K, Charchanti A, Karavasilis V, Pavlidis N, Agnantis NJ (2004) Immunohistochemical expression of superoxide dismutase (MnSOD) antioxidant enzyme in invasive breast carcinoma. Histol Histopathol 19:807–813
20. De Bortoli M, Dati C, Antoniotti S, Maggiora P, Sapei ML (1992) Hormonal regulation of c-erbB-2 oncogene expression in breast cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol 43:21–25
21. Bianchi A, Becuwe P, Franck P, Dauca M (2002) Induction of MnSOD gene by arachidonic acid is mediated by reactive oxygen species and p38 MAPK signaling pathway in human HepG2 hepatoma cells. Free Radic Biol Med 32:1132–1142
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275
23. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685
24. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:

procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350–4354
25. El Bouhtoury F, Keller JM, Colin S, Parache RM, Dauça M (1992) Peroxisomal enzymes in normal and tumoral human breast. J Pathol 166:27–35
26. Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem 44:276–287
27. Fossati P, Prencipe L, Berti G (1980) Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clin Chem 26:227–231
28. Flohe L, Gunzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol 105:114–121
29. Leroy P, Nicolas A, Thioudellet C, Oster T, Wellman M, Siest G (1993) Rapid liquid chromatographic assay of glutathione in cultured cells. Biomed Chromatogr 7:86–89
30. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463–5467
31. Talhouk RS, Chin JR, Unemori EN, Werb Z, Bissell MJ (1991) Proteinases of the mammary gland: developmental regulation in vivo and vectorial secretion in culture. Development 112:439–449
32. Merril CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science 211:1437–1438
33. Xu Y, Krishnan A, Wan XS, Majima H, Yeh CC, Ludewig G, Kasarskis EJ, St Clair DK (1999) Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. Oncogene 18:93–102
34. Huang Y, He T, Domann FE (1999) Decreased expression of manganese superoxide dismutase in transformed cells is associated with increased cytosine methylation of the SOD2 gene. DNA Cell Biol 18:643–652
35. Millikin D, Meese E, Vogelstein B, Witkowski C, Trent J (1991) Loss of heterozygosity for loci on the long arm of chromosome 6 in human malignant melanoma. Cancer Res 51:5449–5453
36. Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ Jr, Sledge GW Jr (1998) Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. Mol Cell Biol 17:3629–3639
37. Bernard D, Quatannens B, Begue A, Vandenbunder B, Abbadie C (2001) Antiproliferative and antiapoptotic effects of crel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. Cancer Res 61:2656–2664
38. Oberley TD, Zhong W, Szweda LI, Oberley LW (2000) Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium. Prostate 44:144–155
39. Esworthy RS, Baker MA, Chu FF (1995) Expression of selenium-dependent glutathione peroxidase in human breast tumor cell lines. Cancer Res 55:957–962
40. Cerutti PA (1985) Prooxidant states and tumor promotion. Science 227:375–381
41. Chang TS, Cho CS, Park S, Yu S, Kang SW, Rhee SG (2004) Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. J Biol Chem 279:41975–41984
42. Hu Y, Rosen DG, Zhou Y, Feng L, Yang G, Liu J, Huang P (2005) Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. J Biol Chem 280:39485–39492
43. Yang JQ, Li S, Domann FE, Buettner GR, Oberley LW (1999) Superoxide generation in v-Ha-ras-transduced human keratinocyte HaCaT cells. Mol Carcinog 26:180–188
44. Grandemange S, Seyer P, Carazo A, Becuwe P, Pessemesse L, Busson M, Marsac C, Roger P, Casas F, Cabello G, Wrutniak-Cabello C (2005) Stimulation of mitochondrial activity by p43 overexpression induces human dermal fibroblast transformation. Cancer Res 65:4282–4291
45. Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 410:37–40
46. Karin M, Shaulian E (2001) AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death. IUBMB Life 52:17–24
47. Li N, Zhai Y, Oberley TD (1999) Two distinct mechanisms for inhibition of cell growth in human prostate carcinoma cells with antioxidant enzyme imbalance. Free Radic Biol Med 26:1554–1568
48. Lam EW, Zwacka R, Seftor EA, Nieva DR, Davidson BL, Engelhardt JF, Hendrix MJ, Oberley LW (1999) Effects of antioxidant enzyme overexpression on the invasive phenotype of hamster cheek pouch carcinoma cells. Free Radic Biol Med 27:572–579
49. Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Sipley J, Nagase H, French DL, Quigley JP (1999) Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. J Biol Chem 274:13066–13076
50. Zhang HJ, Zhao W, Venkataraman S, Robbins ME, Buettner GR, Kregel KC, Oberley LW (2002) Activation of matrix metalloproteinase-2 by overexpression of manganese superoxide dismutase in human breast cancer MCF-7 cells involves reactive oxygen species. J Biol Chem 277:20919–20926
51. Nelson KK, Ranganathan AC, Mansouri J, Rodriguez AM, Providence KM, Rutter JL, Pumiglia K, Bennett JA, Melendez JA (2003) Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. Clin Cancer Res 9:424–432
52. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS (1996) Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. J Clin Invest 98:2572–2579
53. Sato H, Seiki M (1993) Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. Oncogene 8:395–405





<u>Figure 12</u>: Analyse fonctionnelle de la région promotrice du gène *SOD2* dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB231.

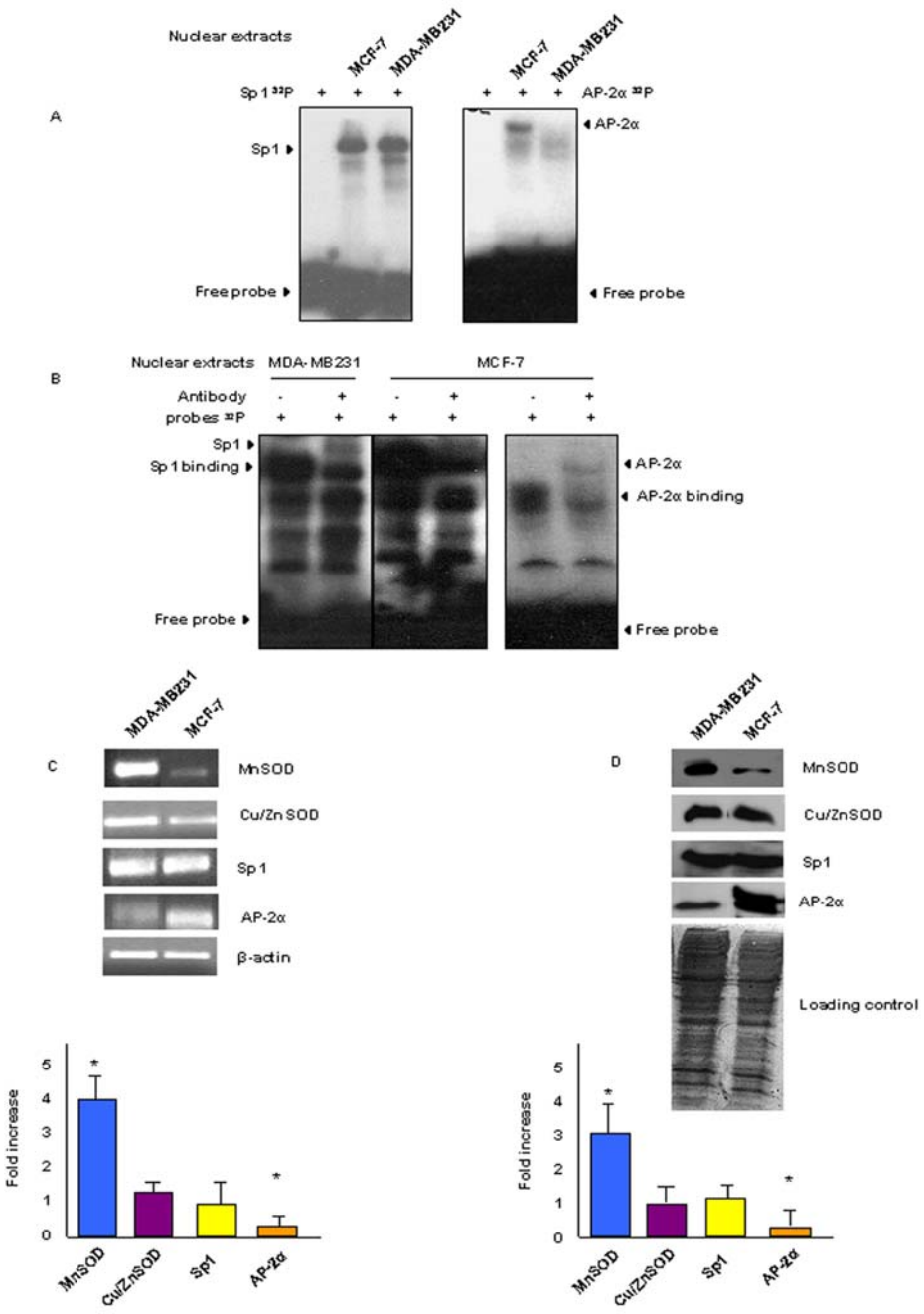
A. Les cellules MDA-MB231 ont été co-transfectées de manière transitoire avec un plasmide contrôle appelé pSV40/SEAP, qui contient un gène codant la phosphatase alcaline placentaire (SEAP), et avec différentes constructions plasmidiques pGL3 contenant le gène rapporteur, la luciférase ainsi qu'une région de clonage pour la région 5' flanquante du gène de la SOD Mn (-3340pGL3), ou pour différents fragments digérés de cette région (Δ350pGL3 ; Δ2995pGL3). Les résultats sont exprimés en activité relative de la luciférase, qui correspond au nombre d'Unité Relative de Lumière (URL) de luciférase divisé par celui de la SEAP pour chaque construction plasmidique, et sont présentés comme la moyenne ± écart-type des valeurs de trois expériences indépendantes. Chaque expérience a été répétée 3 fois minimum. **B.** Séquence de la région 5' du gène de la SOD Mn allant des nucléotides –440 à +40. Plusieurs sites de restriction enzymatiques sont indiqués et les sites de fixation des facteurs de transcription Sp1- et AP-2α sont encadrés.

4. Données complémentaires : Etude de la régulation de l'expression constitutive du gène *SOD2* dans les cellules tumorales mammaires humaines oestrogènes-indépendantes

Les cellules tumorales mammaires oestrogènes-indépendantes, qui présentent des propriétés invasives, ont une expression constitutive élevée de la SOD Mn. Les observations précédentes ont montré que ces cellules n'expriment pas ou très peu la DDB2, qui agit négativement sur l'expression constitutive de l'enzyme antioxydante. Nous nous sommes donc intéressés à rechercher le mécanisme impliqué dans l'expression soutenue de la SOD Mn particulièrement dans les cellules MDA-MB231, au niveau de la région promotrice du gène.

A partir de différentes constructions plasmidiques, l'analyse fonctionnelle de la région promotrice du gène de la SOD Mn , placée en amont du gène luciférase, a été réalisée dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB231. Les résultats montrent que seule la partie proximale est responsable de l'expression constitutive de la SOD Mn dépendante de son promoteur (**Figure 12**). La plupart des éléments de réponse présents dans la partie proximale du promoteur sont ceux de Sp1, AP-2α et DDB2. DDB2 n'étant pas exprimée dans les cellules MDA-MB231, nous avons donc étudié l'expression de Sp1 et d'AP-2α, à la fois aux niveaux transcriptionnel par RT-PCR et traductionnel par Western blot et gel retard. Tandis qu'AP-2α est très faiblement exprimé dans les cellules MDA-MB231, comparativement aux cellules MCF-7, l'expression de Sp1 est similaire dans les deux types de lignées cellulaires (**Figure 13**).

Dans le but de connaître l'implication éventuelle de Sp1 dans l'expression constitutive dépendante de la partie proximale, les cellules MDA-MB231 sont transfectées transitoirement avec un ARN interférant spécifique du facteur de transcription (**Figure 14**). En conséquence, l'expression de la SOD Mn est très fortement inhibée. De même, le traitement durant 6 h des cellules tumorales avec l'acide okadaïque (500 nM), un inhibiteur de l'activité de la protéine phosphatase 2A, qui maintient ainsi la protéine Sp1 sous sa forme phosphorylée et dépourvue d'activité transcriptionnelle, entraîne une diminution importante de l'expression de la SOD Mn (**Figure 14**). Ces résultats complémentaires mettent en évidence l'implication du facteur de transcription Sp1 dans la régulation de l'expression constitutive du gène de la SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires oestrogènes-indépendantes. Une expérience complémentaire, consistant à traiter les cellules MDA-MB231 avec la 5-azacytidine



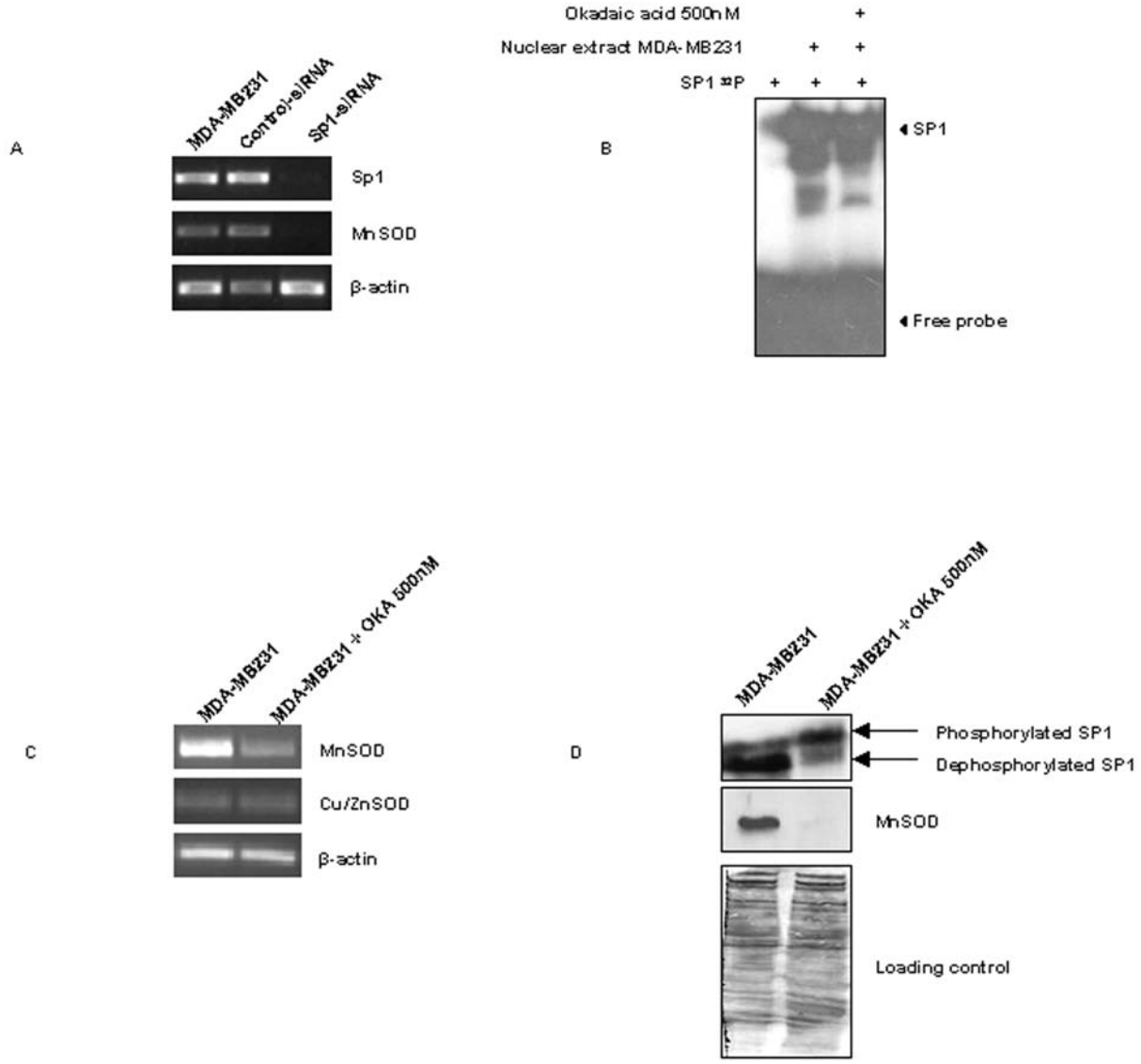
<u>Figure 13</u>: Expression de Sp1, d'AP-2α, de la SOD Mn et de la SOD Cu/Zn dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB231 et MCF-7.

A. L'activité de fixation des facteurs de transcription Sp1 et AP-2α est analysée par gel retard, en utilisant des oligonucléotides radiomarqués correspondant à leur élément de réponse, et incubés avec 5 µg de protéines nucléaires extraites des cellules MCF-7 et MDA-MB231. Les flèches pointent le complexe ADN/protéines. **B.** La spécificité de fixation est vérifiée par des expériences de super retard sur gel avec des anticorps spécifiques anti-Sp1 et anti-AP-2α, préalablement incubés avec les extraits protéiques des cellules MCF-7 et MDA-MB231. **C.** Les ARNs totaux sont extraits des cellules MCF-7 et MDA-MB231. 2 µg sont ensuite soumis à une analyse par RT-PCR, avec les amorces spécifiques des gènes correspondant à Sp1, AP-2α, SOD Mn, SOD Cu/Zn et β-actine. **D.** Les taux de protéines Sp1, AP-2α, SOD Mn et SOD Cu/Zn sont analysés par immunoréplique avec leurs anticorps polyclonaux spécifiques, dans 50 µg de protéines totales extraites des cellules MCF-7 et MDA-MB231. La membrane est ensuite colorée au bleu de Coomassie afin de montrer la quantité équivalente de protéines déposées. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. L'intensité relative des bandes de RT-PCR et d'immunoréplique est quantifiée par densitométrie dans les cellules MDA-MB231, et les données sont exprimées selon les valeurs obtenues pour les cellules MCF-7, fixées à 1. Les différences sont significatives par rapport aux MCF-7 pour *p<0,05.

(10 et 20 µM) durant 48 et 72 h, révèle cependant une diminution significative de l'expression constitutive de la SOD Mn, associée à une induction importante de l'expression d'AP-2α (**Figure 15**). Ce dernier est connu pour réguler négativement l'expression de la SOD Mn [Zhu *et al*. 2001 ; Xu *et al*. 2002].

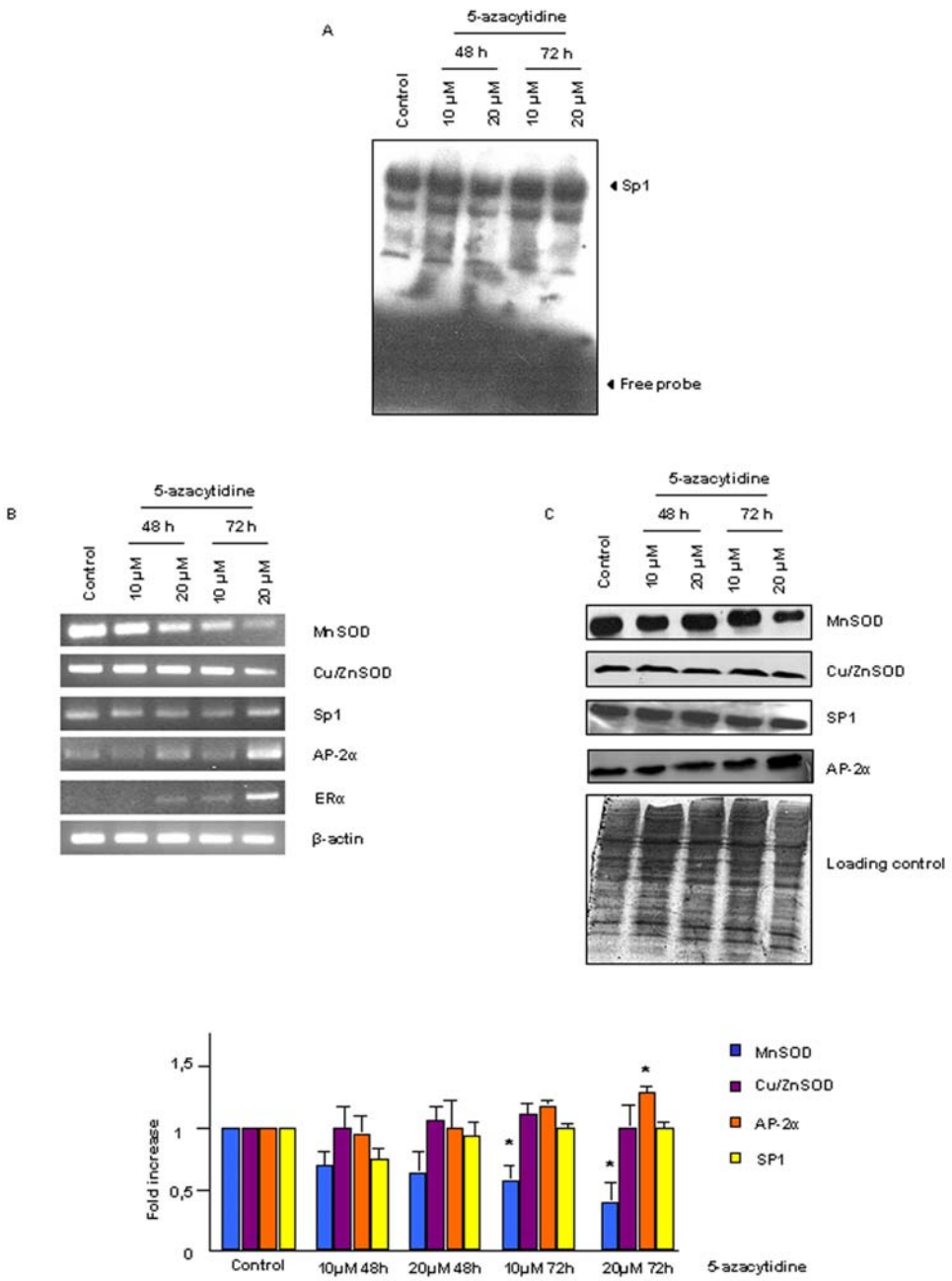
L'ensemble des données semble donc indiquer que l'expression constitutive élevée de la SOD Mn dans les cellules MDA-MB231 serait dépendante à la fois de l'action positive de Sp1, mais également de l'absence d'expression de DDB2 et d'un mécanisme épigénétique maintenant une expression très faible de AP-2α.

Ces données complémentaires font l'objet d'un article en préparation.



<u>Figure 14</u> : Rôle du facteur de transcription Sp1 sur l'expression de la SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB231.

A. Les ARNs totaux (2 µg) sont extraits de cellules MDA-MB231 préalablement transfectées de manière transitoire avec 50 nM d'un ARN interférent spécifique de Sp1 (Sp1-siRNA) et avec un ARN interférent non spécifique (siRNA-control), puis soumis à une analyse par RT-PCR. Le gel d'électrophorèse montre les taux des transcrits Sp1, SOD Mn et β-actine. **B.** L'activité de fixation de Sp1 est analysée par gel retard, en utilisant une sonde oligonucléotidique radiomarquée correspondant à son élément de réponse, incubée avec 5 µg de protéines nucléaires extraites des cellules MDA-MB231 préalablement traitées avec 500 nM d'acide okadaique pendant 6 heures. Les flèches pointent le complexe ADN/protéines. **C.** Analyse par RT-PCR des ARNs totaux (2 µg) extraits de cellules MDA-MB231 traitées avec 500 nM d'acide okadaique pendant 6 heures. Le gel d'électrophorèse montre les taux des transcrits SOD Mn, SOD Cu/Zn et β-actine. **D.** Les taux de protéines SOD Mn et SOD Cu/Zn sont analysés par immunoréplique avec leurs anticorps polyclonaux spécifiques, dans 50 µg de protéines totales extraites des cellules MDA-MB231 traitées avec 500 nM d'acide okadaique pendant 6 heures. La membrane est ensuite colorée au bleu de Coomassie afin de montrer la quantité équivalente de protéines déposées.



<u>Figure 15</u> : Effets de la 5-azacytidine sur l'expression de la SOD Mn, de Sp1 et d'AP-2α dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB231.

A. Analyse par gel retard de la fixation de Sp1 sur son élément de réponse dans les cellules MDA-MB231 traitées avec 10 ou 20 µM de 5-azacytidine pendant 48 et 72 heures. **B.** Les ARNs totaux sont extraits des cellules MDA-MB231 traitées avec 10 ou 20 µM de 5-azacytidine pendant 48 et 72 heures. 2 µg sont ensuite soumis à une analyse par RT-PCR avec les amorces spécifiques des gènes correspondant à la SOD Mn, Sp1, AP-2α, SOD Cu/Zn, ERα et β-actine. **C.** Les taux de protéines SOD Mn, Sp1, AP-2α et SOD Cu/Zn sont analysés par immunoréplique avec leurs anticorps polyclonaux spécifiques, dans 50 µg de protéines totales extraites des cellules MDA-MB231, préalablement traitées avec 10 ou 20 µM de 5-azacytidine pendant 48 et 72 heures. La membrane est ensuite colorée au bleu de Coomassie afin de montrer la quantité équivalente de protéines déposées. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. L'intensité relative des bandes de RT-PCR est quantifiée par densitométrie, et les données sont exprimées selon les valeurs obtenues pour la β-actine, fixées à 1. Les différences sont significatives par rapport à la β-actine pour *p<0,05.

CHAPITRE 4

* * *

DISCUSSION

GENERALE

DISCUSSION GENERALE

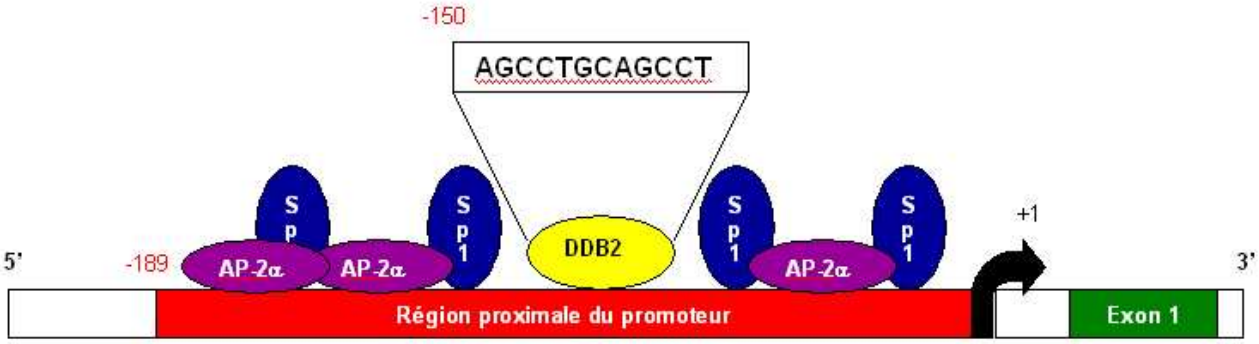
* * *

L'expression constitutive de la SOD Mn augmente au cours du développement embryonnaire, et dans les cellules qui se différencient [St Clair *et al*. 1994]. Cependant, des altérations de son niveau d'expression sont décrites dans de nombreux types de tumeurs. Selon l'origine de ces dernières, une surexpression ou au contraire, une diminution de l'expression de l'enzyme antioxydante est observée dans les cellules tumorales, comparativement aux cellules normales ayant la même origine tissulaire [Church *et al*. 1993 ; Nishida *et al*. 1993 ; Cobbs *et al*. 1996 ; Li *et al*. 1998 ; Kim *et al*. 2001 ; Cullen *et al*. 2003 ; Kato *et al*. 2003]. Ces différences suggèrent qu'il existe des mécanismes distincts de régulation du gène de la SOD Mn selon les types de cancers. Dans le cas du cancer du sein, nos travaux montrent que l'expression constitutive de la SOD Mn est inversement corrélée avec l'expression du récepteur aux œstrogènes. L'existence d'un mécanisme distinct de la régulation du gène *SOD2* entre les cellules tumorales mammaires, nous a conduit à entreprendre la recherche des protéines impliquées. De plus, l'expression distincte de la SOD Mn entre les cellules tumorales mammaires nous a également conduit à étudier l'implication de cette enzyme antioxydante dans la croissance cellulaire.

I ETUDE DE LA REGULATION DE L'EXPRESSION CONSTITUTIVE DE LA SOD MN DANS LES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES

1. Mise en évidence d'un nouveau régulateur transcriptionnel du gène SOD2: la protéine DDB2

L'analyse systématique de la région proximale du promoteur, connue pour son implication majeure dans l'expression constitutive de la SOD Mn a permis d'identifier à la fois *in vitro* et *in vivo*, d'une part, la protéine DDB2, connue jusque là comme étant impliquée



<u>Figure 14</u> : Structure de la région proximale du promoteur du gène codant la SOD Mn humaine, contenant l'élément de réponse reconnu par la protéine DDB2.

principalement dans la réparation des lésions de l'ADN par excision des nucléotides [Tang et Chu 2002], et d'autre part une séquence nucléotidique localisée entre les sites de fixation des facteurs de transcription Sp1 ou AP-2α [St Clair *et al*. 2002]. Ces derniers ont été caractérisés précédemment pour leur rôle dans la régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn dans d'autres modèles cellulaires [Xu *et al*. 2002].

A. Structure de la séquence de fixation de la DDB2

La structure de la séquence d'ADN, fixant la DDB2 n'a jamais été décrite jusqu'à présent et semble ne pas posséder d'équivalent pour d'autres facteurs de transcription, d'après l'analyse des bases de données actuelles. Nos expériences ont démontré l'importance des deux répétitions pentanucléotidiques pour la reconnaissance de la protéine DDB2. Il est à noter cependant, que nos résultats montrent un complexe retardé plus petit lorsque la deuxième répétition est mutée (séquence mutée 8), alors que cette diminution de l'activité de fixation n'a pas été relevée en présence d'un compétiteur spécifique. Ceci laisse supposer que la première répétition de l'élément de réponse est plus importante dans la fixation de la DDB2, et que la fixation d'un complexe protéique inconnu et non spécifique dans la deuxième répétition AGCCT n'est pas exclue. De plus, les deux nucléotides charnières semblent impliqués dans la fixation de DDB2 sur la séquence cible d'ADN. En effet, la mutation de ces deux nucléotides (séquence mutée 7) diminue l'activité de fixation de la protéine. Enfin, les résultats obtenus par southwestern-blotting et par UV-crosslinking, suggèrent que cette séquence oligonucléotidique est capable de fixer seulement une molécule de DDB2, car seul un complexe protéique de 43 kDa est détecté dans les deux cas. Cette séquence cible d'ADN de DDB2 se révèlera très utile dans l'identification d'autres gènes cibles de la protéine (**Figure 14**).

B. Conséquence de la fixation de la DDB2 sur l'expression du gène SOD2

L'implication de la protéine DDB2 dans la transcription du gène *SOD2* a été évaluée dans les cellules tumorales mammaires MCF-7 (ER positives), qui surexpriment cette protéine. Nos résultats montrent que la protéine DDB2, lorsqu'elle est fixée sur sa séquence, maintient une transcription constitutive faible du gène *SOD2* dans cette lignée de cellules tumorales mammaires, puisque la mutation du site de fixation ou une inhibition de

l'expression de la protéine augmente la transcription du gène codant l'enzyme antioxydante. Ces résultats sont confirmés lorsque le gène de la DDB2 est introduit dans les cellules MDA-MB231 ne l'exprimant pas naturellement, ce qui entraîne une diminution de la transcription constitutive du gène codant la SOD Mn, naturellement élevée dans ces cellules tumorales mammaires (ER négatives). Ces résultats sont en accord avec l'observation faite précédemment dans ce travail et par une doctorante du laboratoire, qui décrit la corrélation inverse existante entre l'expression de la SOD Mn et celle de DDB2, et ce entre les lignées de cellules tumorales mammaires MCF-7 et MDA-MB231 [Kattan *et al*. 2008a]. Aucune activité de fixation de la DDB2 sur sa séquence cible d'ADN n'est d'ailleurs observée dans les cellules tumorales MDA-MB231 sauvages.

Lorsque l'expression de la DDB2 est inhibée ou lorsque son site de fixation est muté, l'augmentation conséquente de la transcription du gène *SOD2* est probablement dépendante du facteur de transcription Sp1 dans les cellules MCF-7. En effet, l'expression constitutive du gène de la SOD Mn dépend principalement de son promoteur proximal. De plus, il a été démontré par l'équipe de St Clair que la fixation de Sp1 est suffisante pour activer la transcription constitutive du gène *SOD2* [Xu *et al*. 2002]. Dans ce travail, nous avons montré, par la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine, que Sp1 est capable de se fixer *in vivo*, en même temps que la DDB2, sur le promoteur proximal du gène codant l'enzyme antioxydante. Dans ce cas, l'activité de Sp1 serait favorisée lorsque la DDB2 n'est pas présente sur la région proximale du promoteur du gène de la SOD Mn. En effet, dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB231 qui n'expriment pas naturellement la DDB2, nous avons montré, par des expériences d'interférence à l'ARN sur Sp1, que la transcription constitutive élevée de la SOD Mn est principalement dépendante de ce facteur de transcription.

C. Relation structure et fonction de la DDB2 comme régulateur de la transcription

C'est la première fois qu'il est montré que DDB2 possède une activité biologique, comme régulateur transcriptionnel, et ceci nous conduit à se demander quelles sont les propriétés structurales de la DDB2 qui la rendent capable de se fixer spécifiquement sur une séquence cible d'ADN, que nous avons déterminée dans la région promotrice du gène *SOD2*. La protéine DDB2 est connue pour son rôle dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides, en participant à la reconnaissance des lésions provoquées par une exposition aux

UV [Tang et Chu 2002]. Cette protéine possède plusieurs domaines structuraux, impliqués dans cette activité biologique, en particulier les domaines répétés de type WD40 (les domaines I, II et III) [Rapic-Otrin *et al*. 2003], que l'on retrouve dans de nombreuses protéines jouant un rôle dans le remodelage de la chromatine. De plus, la DDB2 est capable d'interagir avec d'autres protéines, comme la DDB1 lors de la réparation des lésions induites par l'ADN [Tang et Chu 2002], mais également avec d'autres protéines, comme E2F1 [Hayes *et al*. 1998, Shiyanov *et al*. 1999b], la protéine CBP/p300 et le complexe STAGA [Otrin *et al*. 1997 ; Martinez *et al*. 2001 ; Datta *et al*. 2001]. Les deux derniers complexes protéiques appartiennent à la famille des histones acétyltransférases.

L'ensemble de ces interactions suggèrerait que la DDB2 pourrait participer à la régulation de la transcription de gènes, car son interaction avec le domaine d'activation d'E2F1 augmente l'activité transcriptionnelle sur les gènes cibles de ce dernier, qui sont impliqués dans la réplication de l'ADN et l'entrée en phase S [Nag *et al*. 2001 ; Nichols *et al*. 2003 ; Prost *et al*. 2007]. De même, son interaction avec la famille des histones acétyltransférases, faciliterait le remodelage de la chromatine, indispensable pour faciliter l'accès des protéines de réparation au niveau des lésions de l'ADN [Kapetenaki *et al*. 2006 ; Wang *et al*. 2006], mais également pour la transcription des gènes en absence de lésions induites par les UV [Otrin *et al*. 1997 ; Martinez *et al*. 2001 ; Datta *et al*. 2001]. La détermination exacte du ou des domaine(s) réellement impliqué(s) dans la reconnaissance de l'élément de réponse, puis dans le contrôle de la transcription du gène *SOD2* semble nécessaire pour comprendre cette nouvelle activité biologique de la DDB2 que nous venons de décrire. Une étude récente rapporte également le rôle de DDB1 dans la régulation de la transcription constitutive du gène de la fibromoduline [Bevilacqua *et al*. 2005], ce qui suggère une similitude probable de fonctionnement entre cette protéine et la DDB2.

2. Importance de la DDB2 parmi les autres mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de la SOD Mn

Notre étude, décrivant la protéine DDB2 comme un nouveau régulateur négatif de la transcription constitutive du gène *SOD2*, diffère des mécanismes de régulation du gène de la SOD Mn précédemment décrits. Dans des cellules tumorales autres que mammaires, la faible expression de la SOD Mn est due, soit à des mutations localisées dans le promoteur du gène et modifiant des sites de fixation de facteurs de transcription [Xu *et al*. 1999b], soit à des

méthylations anormales du promoteur proximal [Huang *et al*. 1999], soit encore à une perte d'hétérozygotie [Millikin *et al*. 1991]. Il a également été décrit aussi bien dans des cellules normales que dans certaines cellules tumorales, que le facteur de transcription AP-2α réprime la transcription du gène *SOD2* [Yeh *et al*. 1998 ; Zhu *et al*. 2001 ; Xu *et al*. 2002], en interférant avec l'activation de Sp1. Cependant, nous n'avons observé aucune variation de l'expression et de l'activité d'AP-2α dans les cellules MCF-7 ayant une expression de la DDB2 inhibée, alors qu'AP-2α se fixe *in vivo* sur le promoteur proximal du gène, et que la transcription du gène *SOD2* est tout de même activée dans ces cellules. De plus, l'introduction de la DDB2 dans les cellules MDA-MB231, réprime l'expression constitutive de la SOD Mn, alors que ces cellules tumorales n'expriment pas AP-2α. De même, aucune mutation du promoteur proximal du gène *SOD2* n'a été décrite dans les lignées cellulaires tumorales mammaires que nous avons étudiées [Xu *et al*. 1999b]. Même si une méthylation du promoteur du gène *SOD2* est responsable de la faible expression de la SOD Mn dans la lignée de cellules tumorales mammaires MDA-MB435 [Huang *et al*. 1999 ; Hodge *et al*. 2005 ; Hitchler *et al*. 2006], nous avons exclu cette possibilité dans notre étude, puisque des traitements des cellules MCF-7 avec un inhibiteur spécifique de méthyltransférases, la 5-azacytidine, ne montrent aucune variation de l'expression constitutive de la SOD Mn.

Une récente étude a cependant révélée que dans les cellules tumorales mammaires, telles que les MCF-7, la modification des histones entraîne un remaniement structural de la chromatine, qui rend moins accessible les sites de fixation des facteurs de transcription présents dans la région proximale du gène *SOD2*. Mais ces événements épigénétiques semblent se produire en dehors de la région précise où est localisée le site de fixation de DDB2 [Hitchler *et al*. 2008]. Néanmoins, il apparait indispensable de préciser très prochainement si la DDB2 interfère réellement avec la machinerie de la transcription ou est associée avec une modification des histones, qui entraîne ainsi une transcription diminuée du gène *SOD2*.

L'interférence de la DDB2 avec la machinerie de la transcription ou d'autres facteurs de transcription constitue une hypothèse intéressante avec les résultats que nous avons obtenus dans les expériences d'induction du gène de la SOD Mn par le TNFα ou encore par le PMA. Il est connu que le TNFα agit sur le gène *SOD2* via le TNF-RE ou « Tumor Necrosis Factor Response Element », sur lequel se fixe le facteur de transcription NF-κB, sous la forme d'un hétérodimère p50/p65 et p50/RelB [Bernard *et al*. 2001 ; Josson *et al*. 2006]. Le fait qu'en absence de la DDB2, l'expression élevée de la SOD Mn dans les cellules MCF-7 DDB2-siRNA n'est pas augmentée en présence des deux inducteurs, soulève l'idée que

DDB2 libèrerait la machinerie transcriptionnelle et permettrait l'interaction entre facteurs de transcription, tels que Sp1 et NF-kB, via la Nucléophosmine, comme le rapporte l'équipe de St Clair [Dhar *et al*. 2004 ; Dhar *et al*. 2006 ; Xu *et al*. 2007] et ce qui reste à démontrer dans le présent travail.

3. Régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn en absence de DDB2

L'expression constitutive de la SOD Mn est élevée dans les cellules tumorales mammaires ER-, comme cela a été observé dans les cellules tumorales gastriques, ovariennes, thyroïdiennes, provenant de mésothéliomes, ou encore d'origine neuroépithéliale [Izutani *et al*. 1996 et 1998 ; Janssen *et al*. 1998; Nakata *et al*. 1992; Nishida *et al*. 1993; Cobbs *et al*. 1996 ; Kinnula *et al*. 1996 ; Landriscina *et al*. 1996 ; Kahlos *et al*. 1998 et 2000; Ria *et al*. 2001]. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de cette expression constitutive élevée de l'enzyme antioxydante ne sont pas connus.

Le présent travail montre que l'expression constitutive du gène *SOD2*, dépendante de sa région proximale, fait intervenir essentiellement le facteur de transcription Sp1, comme cela a été montré dans d'autres types cellulaires [Xu *et al*. 1999b ; Xu *et al*. 2002]. Il n'est pas exclu la participation de NF-kB dans l'expression constitutive élevée de l'enzyme antioxydante, car ces cellules tumorales présentent une activation constitutive de ce facteur de transcription [Bhat-Nakshatri *et al*. 1998]. De plus, la faible expression des régulateurs négatifs de la transcription de son gène, la DDB2 et AP-2α, favorise également cette expression constitutive élevée de la SOD Mn dans ces cellules tumorales mammaires [Kattan *et al*. 2008b]. Dans le cas d'AP-2α, de nombreuses méthylations ont été observées dans le promoteur de son gène dans les cellules MDA-MB231 [Douglas *et al*. 2004 ; Wajapeyee *et al*. 2005], expliquant sa très faible expression. De plus, nous avons montré dans ce présent travail qu'un inhibiteur des méthylases, en restaurant l'expression d'AP-2α, entraîne une diminution de celle de la SOD Mn. Il est connu qu'AP-2α exerce un rôle répresseur sur l'expression constitutive du gène *SOD2* en interférant avec Sp1, dans les cellules normales et certaines cellules tumorales [Yeh *et al*. 1998 ; Zhu *et al*. 2001 ; Xu *et al*. 2002]. Dans le cas de DDB2, l'inhibition de méthylases n'entraîne pas de variation de l'expression de cette protéine, excluant ainsi un mécanisme épigénétique dans la régulation de son gène dans les cellules MDA-MB231 (Données non montrées).

II LE ROLE DE LA SOD MN DANS LA CROISSANCE TUMORALE MAMMAIRE

Après avoir étudié la régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn, nous nous sommes intéressés à l'implication de cette enzyme antioxydante dans la croissance des cellules tumorales. Il est connu que cette implication semble dépendre de son expression constitutive, et donc essentiellement de l'action de l'$O_2°$- et de l'H_2O_2, dont la SOD Mn contrôle le niveau intracellulaire, mais également du déséquilibre entre son expression et celle des autres enzymes antioxydantes, en particulier celles éliminant l'H_2O_2 [Ridnour *et al*. 2004].

1. Implication de la SOD Mn dans la prolifération des cellules tumorales mammaires

Nous avons montré dans ce travail que les cellules tumorales mammaires ER négatives (MDA-MB231 et SK-BR-3) ont une expression constitutive de la SOD Mn élevée, comparativement aux cellules ER positives (MCF-7 et T-47D) et aux cellules épithéliales normales. Lorsque l'expression de la SOD Mn est élevée, celle de la catalase et la GPX est faible dans les cellules tumorales mammaires ER négatives, comme cela a déjà été décrit précédemment [Esworthy *et al*. 1995]. Il semble clair dans la littérature, que la dérégulation à l'origine de ce déséquilibre dans l'expression entre les principales enzymes antioxydantes favorise le développement de tumeurs [Cerutti 1985]. D'ailleurs, une production chronique et importante d'EAO, associée à une diminution des défenses antioxydantes, se traduit par l'apparition d'effets délétères, comme des lésions irréversibles de l'ADN, des protéines et des lipides membranaires, et/ou l'activation de facteurs de transcription ou de protéines kinases, qui, en s'accumulant, définissent un état de stress oxydant en partie à l'origine de la transformation cellulaire, puis de la prolifération des cellules tumorales [Matès et Sanchez-Jimenez 2000].

Il est aujourd'hui bien décrit dans la littérature que la SOD Mn joue un rôle dans la régulation de la croissance des cellules tumorales. Les cellules tumorales ayant une faible expression de la SOD Mn présentent généralement une forte prolifération, associée à un temps de doublement diminué ainsi qu'un faible potentiel métastatique [Oberley 2005],

comme cela a été montré pour les cellules tumorales mammaires MCF-7 [Li *et al*. 1995], ovariennes [Hu *et al*. 2005], ou provenant d'un mésothéliome [Kahlos *et al*. 1999]. De même, la surexpression de la SOD Mn, après introduction expérimentale de son gène, entraîne un ralentissement de la prolifération de fibroblastes embryonnaires de souris, avec une accumulation de cellules en phase G2 du cycle cellulaire [Sarsour *et al*. 2008]. Nous pouvons associer ces données de la littérature avec nos résultats, concernant les cellules MDA-MB231, qui surexpriment naturellement la SOD Mn et qui présentent un taux de doublement cellulaire d'environ 36 heures, comparativement aux 20 heures des cellules MCF-7. De même, la diminution de l'expression de l'enzyme antioxydante par la stratégie d'ARN antisens, accélère ainsi la croissance de nos cellules MDA-MB231, comme le montre la diminution significative de leur temps de doublement et l'expression augmentée du marqueur de prolifération, la PCNA. Cependant, à l'inverse de ce que l'on peut observer pour les cellules MCF-7, la faible expression induite expérimentalement de la SOD Mn entraîne une diminution de la capacité des cellules MDA-MB231 à former des colonies.

Le mécanisme par lequel la SOD Mn joue un rôle dans la croissance des cellules tumorales semble dépendre de la production des EAO [Kim *et al*. 2001 ; Li *et al*. 1999]. D'après la littérature, une expression constitutive faible de la SOD Mn entraîne l'accumulation d'$O_2°$- intracellulaire, une EAO qui stimule la prolifération cellulaire, en activant préférentiellement la voie de signalisation dépendante de la protéine Ras [Yang *et al*. 1999], comme cela a été démontré dans les cellules tumorales ovariennes et mammaires MCF-7 [Hu *et al*. 2005 ; Li *et al*. 1995]. D'après nos résultats, nous avons montré au contraire une forte production d'H_2O_2 intracellulaire dans les cellules MDA-MB231, comparativement aux cellules MCF-7, qui résulte à la fois de l'expression élevée de la SOD Mn et d'une déficience dans l'expression des enzymes éliminant cette EAO. Cette différence du taux d'H_2O_2 intracellulaire entre les deux lignées ne semble pas être dépendante du taux de GPX, car cette enzyme antioxydante est très faiblement exprimée dans les deux types de cellules tumorales mammaires [Esworthy *et al*. 1995]. L'H_2O_2 joue un rôle dans la prolifération des cellules MDA-MB231. En effet, le traitement de ces dernières avec des antioxydants, tels que la NAC et le pyruvate, qui réagissent spécifiquement avec cette EAO, entraîne une diminution significative, correspondant à une augmentation du temps de doublement des cellules tumorales mammaires MDA-MB231 et accompagnée d'une diminution de l'expression du marqueur PCNA. La surproduction d'H_2O_2 observée dans les cellules MDA-MB231, proviendrait principalement des mitochondries, puisque d'une part le déséquilibre entre la

SOD Mn, la GPX et la PRX3 concerne donc des enzymes antioxydantes strictement mitochondriales [Matès et Sanchez-Jimenez 2000 ; Chang *et al*. 2004], d'autre part les conséquences biologiques sur la croissance cellulaire dont la SOD Mn est responsable, ne changent pas lorsque l'on traite les cellules tumorales avec le MnTMPyP, un mimétique des SOD qui se localise uniquement dans le cytosol des cellules et non dans les mitochondries [Liochev et Fridovich 1995]. L'H_2O_2 produit par l'activité soutenue de la SOD Mn, jouerait ainsi le rôle de médiateur de la SOD Mn dans la prolifération cellulaire. Cette EAO est capable d'activer à la fois des facteurs de transcription comme AP-1 et NF-κB, eux même impliqués dans la prolifération et la voie de survie des cellules tumorales [Hsu *et al*. 2000 ; Ozanne *et al*. 2007 ; Kucharczak *et al*. 2003], mais également des sérine/thréonines kinases de la famille des MAPK, qui jouent un rôle central dans la transduction du signal conduisant à la prolifération [Thannickal et Fanburg 2000 ; Allen et Tresini 2000].

L'équipe d'Oberley a montré que la surexpression de la GPX dans des cellules d'adénocarcinome du pancréas inhibait leur prolifération. Cette inhibition était plus importante lorsque la GPX et la SOD Mn étaient surexprimées ensemble, montrant l'importance des EAO dans la prolifération des cellules tumorales [Liu *et al*. 2004]. Cependant, la même équipe a montré que l'H_2O_2 était responsable de l'inhibition de la croissance des cellules tumorales d'origine gliale, lorsque celles-ci surexpriment la SOD Mn, et que la surexpression de la GPX neutralise cet effet [Li *et al*. 2000]. A ce moment de notre travail, l'hypothèse que nous avons émise était que l'H_2O_2 jouait un rôle dans la prolifération des cellules tumorales, en activant comme l'$O_2°$-, certaines cibles intracellulaires, mais dont certaines étaient probablement différentes, pouvant ainsi expliquer la différence de vitesse de prolifération entre les cellules MDA-MB231 et les MCF-7. Cette hypothèse nous a conduit à rechercher si la SOD Mn, *via* l'H_2O_2 qu'elle produit, n'interviendrait pas dans le processus de migration des cellules tumorales MDA-MB231.

2. Implication de la SOD Mn dans la migration des cellules tumorales mammaires

Selon la littérature, une expression élevée de la SOD Mn est associée à une augmentation des capacités invasives et métastatiques de certaines tumeurs de la thyroïde , d'origine gastrique et colorectale, ou encore de la prostate [Nakata *et al*. 1992; Nishida *et al*. 1993; Janssen *et al*. 1998; Kahlos *et al*. 1998; Oberley 2000 ; Toh *et al*. 2000b ; Ria *et al*.

2001 Janssen *et al*. 2000 ; Malafa *et al*. 2000]. Cette observation a été récemment faite dans des carcinomes mammaires, dans lesquelles le niveau d'expression de la SOD Mn est corrélée avec la malignité et le pouvoir métastatique des tumeurs, comparativement au tissu normal [Mukhopadhyay *et al*. 2004 ; Tsanou *et al*. 2004].

Les lignées de cellules tumorales mammaires que nous avons utilisées dans nos études, se distinguent par leurs propriétés invasives et métastatiques, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Alors que les lignées de cellules tumorales mammaires ER négatives (MDA-MB231 et SK-BR-3) sont hautement invasives et métastatiques mais prolifèrent lentement, alors que les lignées cellulaires ER positives (MCF-7 et T-47D) prolifèrent rapidement mais ne présentent pas de propriétés invasives. La surexpression de la SOD Mn que nous avons mis en évidence dans les lignées ER négatives comparativement aux cellules ER positives, est ainsi corrélée avec les propriétés invasives et métastatiques de ces cellules. Ces propriétés invasives *in vitro* sont significativement diminuées dans les cellules MDA-MB231, à la fois lorsque l'expression de la SOD Mn est inhibée ou lorsque l'H_2O_2 qu'elle produit, est neutralisé. Ces résultats suggèrent donc que la SOD Mn exprimée constitutivement à un niveau élevé, en produisant de l'H_2O_2, participent en partie aux propriétés invasives des cellules tumorales mammaires ER négatives. Ces résultats apportent également une réponse au sujet de la diminution des capacités des cellules MDA-MB231 à former des colonies lorsque l'expression de la SOD Mn est inhibée. En effet, cette capacité à former des colonies dépend en partie des capacités migratrices de ces cellules, qui favorisent ainsi leur association, puis leur prolifération, pour former les colonies.

La réduction de la capacité invasive des cellules MDA-MB231 lorsque l'expression de la SOD Mn est diminuée, est également associée à une réduction de l'activité enzymatique de la MMP-9. Cette gélatinase est une des principales MMP sécrétées par les cellules tumorales mammaires invasives, qui joue un rôle central dans les processus invasifs et métastatiques des cellules MDA-MB231 [Ramos-DeSimone *et al*. 1999]. Notre étude suggère que la SOD Mn, *via* l'H_2O_2 qu'elle produit, intervient dans le contrôle de l'activité de la MMP-9 dans les cellules tumorales mammaires métastatiques. En effet, cette MMP est également réduite fortement lorsque les cellules MDA-MB231 sauvages sont traitées avec les antioxydants, NAC ou pyruvate. L'H_2O_2 pourrait activer directement la MMP-9, ou par l'intermédiaire d'une voie de signalisation. Il est décrit dans la littérature que l'H_2O_2, ajouté dans un milieu de culture de cellules musculaires lisses et de macrophages active directement la MMP-9 sécrétée par ces cellules [Rajagopalan *et al*. 1996]. Nous pouvons émettre également l'hypothèse que l'H_2O_2, en activant une voie de signalisation, modulerait l'activité gélatinase

de la MMP-9. Cette voie de signalisation dépendrait des MAP Kinases et des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB, qui sont constitutivement activés dans les cellules MDA-MB231 [Xu *et al*. 1999b ; Sato et Seiki 1993]. Ce mécanisme a déjà été montré pour les MMP-1 et 2 dans les cellules de fibrosarcomes. Ces dernières présentent également une expression constitutive naturellement élevée de la SOD Mn, qui conduit à de fortes activités des MMP-1 et 2 *via* l'activation du facteur de transcription AP-1, et donc à des capacités invasives importantes [Nelson *et al*. 2003 ; Connor *et al*. 2007]. Contrairement à ces deux études, nous n'avons pas vérifié si l'H_2O_2 diminuait l'expression de la MMP-9 au niveau transcriptionnel dans les cellules MDA-MB231. Nos observations suggèrent donc que l'H_2O_2, en activant les capacités invasives des cellules *via* l'activation de la MMP-9, entraînerait ainsi une prolifération plus lente. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la migration sont différents de ceux impliqués dans la prolifération, et les cellules invasives ont un temps de doublement plus long que les cellules non invasives. Dans le cas des cellules tumorales mammaires MCF-7, qui expriment faiblement la SOD Mn, sont peu invasives et non métastatiques mais prolifèrent très rapidement [Li *et al*. 1995], l'introduction expérimentale du gène *SOD2* dans ces cellules entraîne une diminution de leur prolifération, suivie d'une activation de la MMP-2, pouvant être à l'origine de l'acquisition de capacités invasives qui n'ont pas été étudiées par l'équipe d'Oberley [Zhang *et al*. 2002b].

L'ensemble des données actuelles dans la littérature, ajouté à nos résultats suggère donc que l'augmentation de l'expression de la SOD Mn représente un événement qui entraînerait les cellules vers un état plus invasif et métastatique, suggérant ainsi que l'enzyme antioxydante serait un facteur prédictif de l'invasion et de la progression tumorales dans le cancer du sein. Ceci nécessite une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de cette expression constitutive élevée de la SOD Mn. Dans ce sens, notre travail montre que l'expression constitutive élevée de la SOD Mn dans les cellules MDA-MB231 dépend de l'activation constitutive du facteur de transcription Sp1 et d'une expression faible d'AP-2α, liée à une hyperméthylation de son gène. Il a d'ailleurs été récemment observé que l'expression de ce facteur de transcription est souvent altérée, lorsque les cellules tumorales mammaires acquièrent des propriétés invasives [Pellikainen et Kosma 2007]. Une autre étude récente, réalisée sur les cellules MDA-MB231, montre que l'altération de l'expression d'AP-2α entraîne une perte de l'expression du facteur suppresseur du développement des métastases, appelé Kiss-1 [Mitchell *et al*. 2006]. Ces observations, sans exclure la protéine DDB2, comme nous allons le voir, suggèrent donc qu'une altération dans les mécanismes de

régulation de l'expression de la SOD Mn est en partie à l'origine des capacités invasives des cellules tumorales mammaires MDA-MB231.

III RELATION ENTRE LA DDB2, L'EXPRESSION DE LA SOD MN ET LA CROISSANCE TUMORALE MAMMAIRE

L'altération dans les mécanismes de régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn est certainement l'événement précoce dans l'implication de l'enzyme antioxydante, à la fois dans les capacités prolifératives, mais également dans la mise en place des capacités invasives des cellules tumorales mammaires. Parmi les protéines régulant l'expression constitutive de la SOD Mn comme Sp1 et AP-2α, nous avons montré dans ce travail, que la protéine DDB2 possède une activité de régulateur de la transcription du gène *SOD2*, en maintenant un niveau d'expression basale faible de l'enzyme antioxydante dans les cellules tumorales mammaires MCF-7. Nous avons également montré que la DDB2 est impliquée dans la prolifération de ces cellules tumorales, en exerçant son contrôle négatif sur l'expression de la SOD Mn. En effet, l'augmentation de l'expression constitutive de la SOD Mn, suite à l'inhibition de l'expression de la DDB2 par ARN interférence, entraîne une prolifération ralentie des cellules MCF-7. Celle-ci est ensuite accélérée lorsque l'augmentation de l'expression de la SOD Mn observée dans ces conditions est inhibée par la stratégie d'ARN antisens. Ces résultats précisent ceux récemment publiés par le laboratoire, qui montrent que la protéine DDB2 active la prolifération des cellules tumorales mammaires, en agissant positivement sur l'entrée de ces cellules dans la phase de transition G1/S et dans la progression en phase S du cycle cellulaire [Kattan *et al*. 2008a]. Ces résultats sont corrélés avec l'expression de marqueurs de l'entrée en phase S tels que la cycline E, PCNA et la DHFR. Nous supposons que la difficulté à entrer en phase S des cellules tumorales ayant une expression de DDB2 inhibée vient en partie de l'augmentation conséquente de la SOD Mn. En effet, une étude récente révèle que la surexpression de la SOD Mn qui suit l'introduction de son gène, entraîne une accumulation en phase G1 et une diminution des capacités à entrer en phase S de fibroblastes normaux humains [Sarsour *et al*. 2005].

Dans les cellules MDA-MB231, l'introduction du gène de la DDB2 entraîne non seulement une diminution de l'expression constitutive de la SOD Mn, mais également, comme le rapporte le travail précédent réalisé au laboratoire, une stimulation de la prolifération cellulaire [Kattan *et al*. 2008a]. De plus, l'inhibition de cette expression constitutive élevée de la SOD Mn entraîne également une accélération de la prolifération des cellules MDA-MB231. Nos résultats révèlent ainsi une nouvelle facette de la protéine DDB2, qui se distingue de celle mise en évidence par d'autres équipes, comme suppresseur de tumeur dans les cellules normales, et qui tendent à la définir comme une protéine « ying-yang », d'une façon similaire au facteur de transcription E2F1 [Hallstrom *et al*. 2008].

Dans les cellules tumorales mammaires, l'expression de la DDB2 est ainsi inversement corrélée non seulement avec celle de la SOD Mn, mais également avec l'invasivité tumorale. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la DDB2 puisse être impliquée dans le contrôle négatif du processus d'invasion des cellules tumorales, au travers de sa capacité à réguler négativement l'expression constitutive de la SOD Mn, mais aussi d'autres gènes cibles qui restera à identifier. Dans ce nouveau mécanisme que ce travail met en évidence, la protéine DDB2 représente l'événement le plus précoce dans l'implication de la SOD Mn dans la croissance tumorale mammaire. Nous sommes ainsi amenés à nous demander comment l'expression et l'activité de cette protéine DDB2 sont régulées dans les cellules tumorales mammaires. D'après la littérature, la régulation du gène codant la protéine DDB2 dépend des facteurs de transcription, comme NF-1, Sp1 ou encore E2F, dont les éléments de réponse respectifs ont été identifiés dans la région promotrice [Nichols *et al*. 2003]. Nous avons montré dans ce travail, que l'absence de son expression n'est pas liée à une hyperméthylation de son gène, contrairement à AP-2α. Sa surexpression est par contre, corrélée avec celle du récepteur aux œstrogènes, à la fois dans les cellules tumorales mammaires mais également dans les tumeurs provenant de patientes atteintes d'un cancer du sein [Kattan *et al*. 2008a]. De cette observation, une éventuelle implication de l'ER dans la régulation du gène DDB2 n'est donc pas exclue dans les cellules tumorales mammaires exprimant ce récepteur nucléaire, et constitue même une perspective intéressante. Elle permettra peut être de définir la protéine DDB2 comme un marqueur diagnostic des tumeurs ER positives.

Enfin, nous pouvons également émettre l'hypothèse qu'il puisse exister une relation entre l'expression de la DDB2 et la réponse des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux. En effet, elle intervient, d'une part dans la régulation de l'expression de la SOD Mn, qui est elle-même impliquée dans la modulation de la réponse à plusieurs agents anticancéreux [Izutani *et al*. 2002 ; Murley *et al*. 2002; Suresh *et al*. 2003 ; Martin *et al*. 2007 ; Hirose *et al*. 1993 ; Suresh *et al*. 2003], d'autre part elle influence la prolifération des cellules tumorales mammaires [Kattan *et al*. 2008a].

CHAPITRE 5

* * *

CONCLUSIONS

&

PERSPECTIVES

CONCLUSIONS

* * *

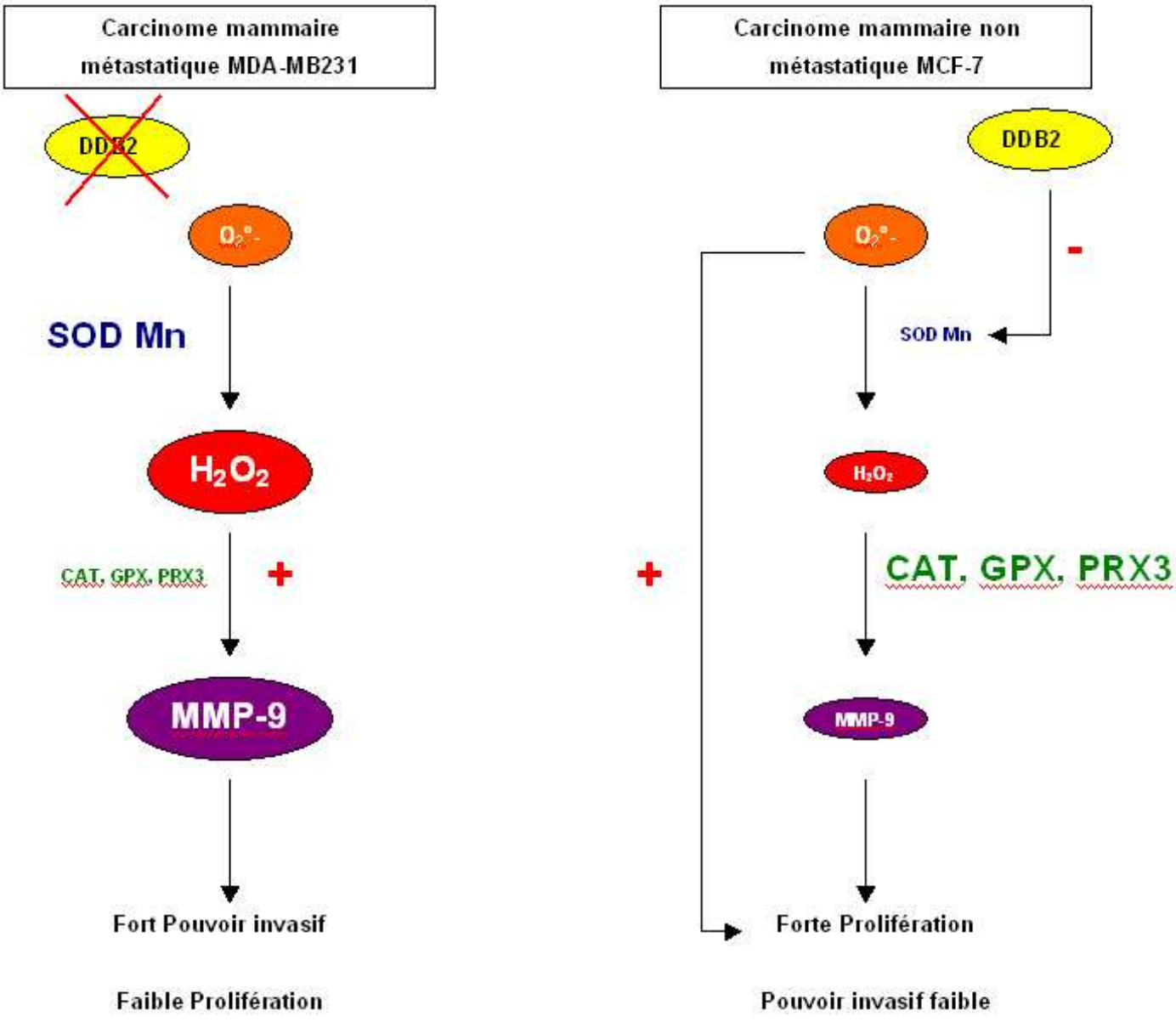
L'ensemble de ce travail met en évidence un nouveau mécanisme de régulation de la SOD Mn, qui permet de mieux comprendre le rôle de cette enzyme antioxydante dans la croissance des cellules tumorales mammaires.

Pour la première fois, nous avons mis en évidence et caractérisé une nouvelle fonction biologique de la protéine DDB2, qui exerce une régulation négative sur l'expression de la SOD Mn dans les cellules tumorales exprimant le récepteur aux œstrogènes. La protéine DDB2, se fixe sur un élément de réponse spécifique, qui est particulier et qui servira de base pour la recherche d'autres gènes cibles de la protéine.

Nous avons également démontré que la régulation du gène de l'enzyme antioxydante est différente entre les cellules tumorales mammaires ER positives et ER négatives :

- la présence de deux régulateurs négatifs de la transcription du gène *SOD2*, tels qu'AP-2α et la DDB2, maintiennent ainsi une expression constitutive faible de l'enzyme antioxydante dans les cellules tumorales œstrogènes-dépendantes
- une faible expression d'AP-2α due à une hyperméthylation de son gène et l'absence d'expression de la DDB2 dans les cellules tumorales mammaires œstrogènes-indépendantes, entraînent ainsi une expression constitutive élevée de la SOD Mn.

Ce travail montre également que ce nouveau mécanisme de régulation du gène *SOD2* par la DDB2 joue un rôle dans la croissance et dans l'invasion des cellules tumorales mammaires *via* le contrôle qu'exerce la SOD Mn sur la concentration intracellulaire d'H_2O_2, suggérant que la SOD Mn soit un facteur prédictif d'invasion tumorale. C'est la première fois que nous montrons la participation de l'H_2O_2, produit lors d'une expression constitutive élevée de la SOD Mn, dans les capacités invasives des cellules tumorales mammaires métastatiques, en ayant pour cible la gélatinase MMP-9. Ces résultats expliquent en partie pourquoi les cellules tumorales mammaires non métastatiques, dont l'expression constitutive de la SOD Mn est faible, présentent au contraire une vitesse élevée de leur prolifération sous la dépendance de l'accumulation d'$O_2°$-.



<u>Figure 15</u> : Relation entre la DDB2, l'expression de la SOD Mn et la croissance tumorale mammaire.

L'ensemble de nos résultats nous permet de proposer un schéma du mécanisme impliquant à la fois la protéine DDB2 et la SOD Mn dans la croissance des cellules tumorales mammaires ER négatives métastatiques et ER positives non métastatiques (**Figure 15**). Les résultats de ce travail présentent une avancée intéressante en cancérologie mammaire et nous conduisent à espérer que la DDB2 et la SOD Mn puissent avoir un intérêt clinique important dans l'avenir comme facteur pronostic de la progression tumorale mammaire.

PERSPECTIVES

* * *

Les perspectives qu'offre ce travail de thèse sont nombreuses à la fois sur le plan fondamental et médical. La caractérisation nouvelle de l'activité de la DDB2 comme régulateur de la transcription du gène *SOD2*, représente l'une des grandes originalités de nos résultats et constitue actuellement l'orientation scientifique principale du laboratoire d'accueil.

Cette nouvelle activité biologique de la DDB2 laisse en effet entrevoir l'existence d'autres gènes cibles. L'implication de la DDB2 dans le passage des cellules tumorales dans la phase G1/S du cycle cellulaire laisse à penser que certains gènes clés de cette transition soient régulés par cette protéine. De même, la relation que nous venons de mettre en évidence entre la SOD Mn et la DDB2 permet d'envisager que le gène codant d'autres enzymes antioxydantes soient régulées par cette protéine. Une meilleure connaissance du transcriptome modulé par la DDB2 permettra, d'une part de mieux comprendre comment cette protéine est impliquée dans la croissance des cellules tumorales mammaires, et en conséquence mieux comprendre le mode de fonctionnement de ces cellules dans le développement de tumeur mammaire, d'autre part de révéler l'existence de nouveaux marqueurs moléculaires utiles en recherche clinique dans le cancer du sein.

Il conviendra également de rechercher la ou les voies de signalisation, ainsi que d'éventuels partenaires protéiques, qui régule(nt) l'activité de la DDB2. Afin de comprendre pourquoi la DDB2 est capable à la fois de participer à la réparation de l'ADN lésé au sein du complexe UV-DDB, et de réguler l'expression de gènes cibles, il sera intéressant de rechercher en particulier le(s) domaine(s) de la protéine qui est ou sont impliqué(s) dans ces activités biologiques très différentes.

Le mécanisme de régulation de l'expression constitutive du gène *SOD2* par la protéine DDB2 a été mis en évidence dans les cancers du sein œstrogènes-dépendants. Dans le futur, il sera ainsi nécessaire de vérifier s'il existe une relation étroite entre le récepteur aux œstrogènes et l'expression de DDB2, ce qui présenterait un intérêt clinique important,

notamment par le fait que la protéine DDB2 pourrait être considérée comme un marqueur pronostic de l'évolution des cancers du sein.

Il sera également important d'évaluer l'importance de la relation existante entre la DDB2 et la SOD Mn, à la fois dans les capacités invasives des cellules tumorales mammaires métastatiques, mais également dans la réponse aux agents anticancéreux. L'importance de ces deux protéines pourra être par la suite estimée en recherche clinique, mais également étendue à d'autres types de cancers.

CHAPITRE 6

* * *

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

* * *

A

Agnoletto, M.H., Guecheva, T.N., Donde, F., de Oliveira, A.F., Franke, F., Cassini, C., Salvador, M., Henriques, J.A., and Saffi, J. (2007). Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. Clin Biochem *40*, 1252-1258.

Ahn, J., Gammon, M.D., Santella, R.M., Gaudet, M.M., Britton, J.A., Teitelbaum, S.L., Terry, M.B., Neugut, A.I., Eng, S.M., Zhang, Y., *et al.* (2006). Effects of glutathione S-transferase A1 (GSTA1) genotype and potential modifiers on breast cancer risk. Carcinogenesis *27*, 1876-1882.

Ahn, J., Schatzkin, A., Lacey, J.V., Jr., Albanes, D., Ballard-Barbash, R., Adams, K.F., Kipnis, V., Mouw, T., Hollenbeck, A.R., and Leitzmann, M.F. (2007). Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. Arch Intern Med *167*, 2091-2102.

Aida, Y., Maeyama, S., Takakuwa, T., Uchikoshi, T., Endo, Y., Suzuki, K., and Taniguchi, N. (1994). Immunohistochemical expression of manganese superoxide dismutase in hepatocellular carcinoma, using a specific monoclonal antibody. J Gastroenterol *29*, 443-449.

Akman, S.A., Forrest, G., Chu, F.F., Esworthy, R.S., and Doroshow, J.H. (1990). Antioxidant and xenobiotic-metabolizing enzyme gene expression in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. Cancer Res *50*, 1397-1402.

Alekseev, S., Kool, H., Rebel, H., Fousteri, M., Moser, J., Backendorf, C., de Gruijl, F.R., Vrieling, H., and Mullenders, L.H. (2005). Enhanced DDB2 expression protects mice from carcinogenic effects of chronic UV-B irradiation. Cancer Res *65*, 10298-10306.

Allen, R.G., and Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. Free Radic Biol Med *28*, 463-499.

Ambrosone, C.B. (2000). Oxidants and antioxidants in breast cancer. Antioxid Redox Signal *2*, 903-917.

Ambrosone, C.B., Coles, B.F., Freudenheim, J.L., and Shields, P.G. (1999a). Glutathione-S-transferase (GSTM1) genetic polymorphisms do not affect human breast cancer risk, regardless of dietary antioxidants. J Nutr *129*, 565S-568S.

Ambrosone, C.B., Freudenheim, J.L., Thompson, P.A., Bowman, E., Vena, J.E., Marshall, J.R., Graham, S., Laughlin, R., Nemoto, T., and Shields, P.G. (1999b). Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. Cancer Res *59*, 602-606.

Angers, S., Li, T., Yi, X., MacCoss, M.J., Moon, R.T., and Zheng, N. (2006). Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. Nature *443*, 590-593.

Antoniou, A., Pharoah, P.D., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.E., Hopper, J.L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., *et al.* (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. Am J Hum Genet *72*, 1117-1130.

Arsova-Sarafinovska, Z., Matevska, N., Petrovski, D., Banev, S., Dzikova, S., Georgiev, V., Sikole, A., Sayal, A., Aydin, A., Suturkova, L., *et al.* (2008). Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphism is associated with risk of early-onset prostate cancer. Cell Biochem Funct *26*, 771-777.

B

Babior, B.M., Kipnes, R.S., and Curnutte, J.T. (1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. J Clin Invest *52*, 741-744.

Bachman, K.E., Argani, P., Samuels, Y., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Konishi, H., Karakas, B., Blair, B.G., Lin, C., *et al.* (2004). The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. Cancer Biol Ther *3*, 772-775.

Badache, A., and Goncalves, A. (2006). The ErbB2 signaling network as a target for breast cancer therapy. J Mammary Gland Biol Neoplasia *11*, 13-25.

Baldwin, A.S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. J Clin Invest *107*, 241-246.

Banci, L., Benedetto, M., Bertini, I., Del Conte, R., Piccioli, M., and Viezzoli, M.S. (1998). Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? Biochemistry *37*, 11780-11791.

Banks, D., Wu, M., Higa, L.A., Gavrilova, N., Quan, J., Ye, T., Kobayashi, R., Sun, H., and Zhang, H. (2006). L2DTL/CDT2 and PCNA interact with p53 and regulate p53 polyubiquitination and protein stability through MDM2 and CUL4A/DDB1 complexes. Cell Cycle *5*, 1719-1729.

Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem *44*, 276-287.

Benedetti, A., Comporti, M., and Esterbauer, H. (1980). Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. Biochim Biophys Acta *620*, 281-296.

Benlloch, M., Mena, S., Ferrer, P., Obrador, E., Asensi, M., Pellicer, J.A., Carretero, J., Ortega, A., and Estrela, J.M. (2006). Bcl-2 and Mn-SOD antisense oligodeoxynucleotides and a glutamine-enriched diet facilitate elimination of highly resistant B16 melanoma cells by tumor necrosis factor-alpha and chemotherapy. J Biol Chem *281*, 69-79.

Beral, V. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. Lancet *362*, 419-427.

Bernard, D., Quatannens, B., Begue, A., Vandenbunder, B., and Abbadie, C. (2001). Antiproliferative and antiapoptotic effects of crel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. Cancer Res *61*, 2656-2664.

Bevilacqua, M.A., Iovine, B., Zambrano, N., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Russo, T., and Cimino, F. (2005). Fibromodulin gene transcription is induced by ultraviolet irradiation, and its regulation is impaired in senescent human fibroblasts. J Biol Chem *280*, 31809-31817.

Bhat-Nakshatri, P., Newton, T.R., Goulet, R., Jr., and Nakshatri, H. (1998). NF-kappaB activation and interleukin 6 production in fibroblasts by estrogen receptor-negative breast cancer cell-derived interleukin 1alpha. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 6971-6976.

Bianchi, A., Becuwe, P., Franck, P., and Dauca, M. (2002). Induction of MnSOD gene by arachidonic acid is mediated by reactive oxygen species and p38 MAPK signaling pathway in human HepG2 hepatoma cells. Free Radic Biol Med *32*, 1132-1142.

Bica, C.G., de Moura da Silva, L.L., Toscani, N.V., da Cruz, I.B., Sa, G., Graudenz, M.S., and Zettler, C.G. (2008). MnSOD Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer. Pathol Oncol Res.

Bidlack, W.R., and Tappel, A.L. (1973). Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation. Lipids *8*, 203-207.

Birgisdottir, V., Stefansson, O.A., Bodvarsdottir, S.K., Hilmarsdottir, H., Jonasson, J.G., and Eyfjord, J.E. (2006). Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. Breast Cancer Res *8*, R38.

Bohr, V.A., and Dianov, G.L. (1999). Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. Biochimie *81*, 155-160.

Bondar, T., Kalinina, A., Khair, L., Kopanja, D., Nag, A., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. (2006). Cul4A and DDB1 associate with Skp2 to target p27Kip1 for proteolysis involving the COP9 signalosome. Mol Cell Biol *26*, 2531-2539.

Borrello, S., De Leo, M.E., and Galeotti, T. (1993). Defective gene expression of MnSOD in cancer cells. Mol Aspects Med *14*, 253-258.

Bours, V., Bentires-Alj, M., Hellin, A.C., Viatour, P., Robe, P., Delhalle, S., Benoit, V., and Merville, M.P. (2000). Nuclear factor-kappa B, cancer, and apoptosis. Biochem Pharmacol *60*, 1085-1089.

Bravard, A., Sabatier, L., Hoffschir, F., Ricoul, M., Luccioni, C., and Dutrillaux, B. (1992). SOD2: a new type of tumor-suppressor gene? Int J Cancer *51*, 476-480.

Brinton, L.A., Schairer, C., Hoover, R.N., and Fraumeni, J.F., Jr. (1988). Menstrual factors and risk of breast cancer. Cancer Invest *6*, 245-254.

Brooks, S.C., Locke, E.R., and Soule, H.D. (1973). Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. J Biol Chem *248*, 6251-6253.

Brown, K.M., and Arthur, J.R. (2001). Selenium, selenoproteins and human health: a review. Public Health Nutr *4*, 593-599.

Brown, N.S., and Bicknell, R. (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. Breast Cancer Res *3*, 323-327.

Brown, N.S., Jones, A., Fujiyama, C., Harris, A.L., and Bicknell, R. (2000). Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors. Cancer Res *60*, 6298-6302.

Buettner, R., Mora, L.B., and Jove, R. (2002). Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. Clin Cancer Res *8*, 945-954.

C

Cailleau, R., Olive, M., and Cruciger, Q.V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. In Vitro *14*, 911-915.

Campbell, R.A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N.M., Constantinidou, D., Ali, S., and Nakshatri, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. J Biol Chem *276*, 9817-9824.

Cang, Y., Zhang, J., Nicholas, S.A., Kim, A.L., Zhou, P., and Goff, S.P. (2007). DDB1 is essential for genomic stability in developing epidermis. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 2733-2737.

Carrière, A., Galinier, A, Fernandez, Y., Carmona, MC., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2006). Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie (Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species). *Médecine Science* **22** : 1.

Carew, J.S., and Huang, P. (2002). Mitochondrial defects in cancer. Mol Cancer *1*, 9.

Cavalieri, E., and Rogan, E. (2006). Catechol quinones of estrogens in the initiation of breast, prostate, and other human cancers: keynote lecture. Ann N Y Acad Sci *1089*, 286-301.

Cepa, M., Correia-da-Silva, G., da Silva, E.J., Roleira, F.M., Borges, M., and Teixeira, N.A. (2008). New steroidal aromatase inhibitors: suppression of estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and induction of cell death. BMC Cell Biol *9*, 41.

Cerutti, P.A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. Science *227*, 375-381.

Chae, H.Z., Chung, S.J., and Rhee, S.G. (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. J Biol Chem *269*, 27670-27678.

Chang, J.W., Jeon, H.B., Lee, J.H., Yoo, J.S., Chun, J.S., Kim, J.H., and Yoo, Y.J. (2001). Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer. Biochem Biophys Res Commun *289*, 507-512.

Chang, T.S., Cho, C.S., Park, S., Yu, S., Kang, S.W., and Rhee, S.G. (2004). Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. J Biol Chem *279*, 41975-41984.

Chen, X., Zhang, J., Lee, J., Lin, P.S., Ford, J.M., Zheng, N., and Zhou, P. (2006). A kinase-independent function of c-Abl in promoting proteolytic destruction of damaged DNA binding proteins. Mol Cell *22*, 489-499.

Chio, K.S., and Tappel, A.L. (1969). Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. Biochemistry *8*, 2821-2826.

Cho, J.S., Chang, M.S., and Rho, H.M. (2001). Transcriptional activation of the human Cu/Zn superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through the xenobiotic-responsive element. Mol Genet Genomics *266*, 133-141.

Cho, L.C., and Hsu, Y.H. (2008). Expression of androgen, estrogen and progesterone receptors in mucinous carcinoma of the breast. Kaohsiung J Med Sci *24*, 227-232.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem *162*, 156-159.

Chu, G., and Chang, E. (1988). Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. Science *242*, 564-567.

Chuang, T.C., Liu, J.Y., Lin, C.T., Tang, Y.T., Yeh, M.H., Chang, S.C., Li, J.W., and Kao, M.C. (2007). Human manganese superoxide dismutase suppresses HER2/neu-mediated breast cancer malignancy. FEBS Lett *581*, 4443-4449.

Chung-man Ho, J., Zheng, S., Comhair, S.A., Farver, C., and Erzurum, S.C. (2001). Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. Cancer Res *61*, 8578-8585.

Church, S.L., Grant, J.W., Ridnour, L.A., Oberley, L.W., Swanson, P.E., Meltzer, P.S., and Trent, J.M. (1993). Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 3113-3117.

Clavel-Chapelon, F. (2002). Cumulative number of menstrual cycles and breast cancer risk: results from the E3N cohort study of French women. Cancer Causes Control *13*, 831-838.

Cobbs, C.S., Levi, D.S., Aldape, K., and Israel, M.A. (1996). Manganese superoxide dismutase expression in human central nervous system tumors. Cancer Res *56*, 3192-3195.

Collins, K.A., and White, W.L. (1995). Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and bcl-2 are differentially expressed in early evolving malignant melanoma. Am J Dermatopathol *17*, 429-438.

Conklin, K.A. (2004). Cancer chemotherapy and antioxidants. J Nutr *134*, 3201S-3204S.

Connor, K.M., Hempel, N., Nelson, K.K., Dabiri, G., Gamarra, A., Belarmino, J., Van De Water, L., Mian, B.M., and Melendez, J.A. (2007). Manganese superoxide dismutase enhances the invasive and migratory activity of tumor cells. Cancer Res *67*, 10260-10267.

Connor, K.M., Subbaram, S., Regan, K.J., Nelson, K.K., Mazurkiewicz, J.E., Bartholomew, P.J., Aplin, A.E., Tai, Y.T., Aguirre-Ghiso, J., Flores, S.C.*, et al.* (2005). Mitochondrial H2O2 regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation. J Biol Chem *280*, 16916-16924.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J *17*, 1195-1214.

Costa, R.M., Chigancas, V., Galhardo Rda, S., Carvalho, H., and Menck, C.F. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. Biochimie *85*, 1083-1099.

Coursin, D.B., and Cihla, H.P. (1996). Pulmonary effects of short term selenium deficiency. Thorax *51*, 479-483.

Cox, D.G., Tamimi, R.M., and Hunter, D.J. (2006). Gene x Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study. BMC Cancer *6*, 217.

Cullen, J.J., and Kelly, K.A. (1993). Gastric motor physiology and pathophysiology. Surg Clin North Am *73*, 1145-1160.

Cullen, J.J., Weydert, C., Hinkhouse, M.M., Ritchie, J., Domann, F.E., Spitz, D., and Oberley, L.W. (2003). The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res *63*, 1297-1303.

D - E

Dalton, T.P., Shertzer, H.G., and Puga, A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. Annu Rev Pharmacol Toxicol *39*, 67-101.

Daosukho, C., Ittarat, W., Lin, S.M., Sawyer, D.B., Kiningham, K., Lien, Y.C., and St Clair, D.K. (2005). Induction of manganese superoxide dismutase (MnSOD) mediates cardioprotective effect of tamoxifen (TAM). J Mol Cell Cardiol *39*, 792-803.

Darville, M.I., Ho, Y.S., and Eizirik, D.L. (2000). NF-kappaB is required for cytokine-induced manganese superoxide dismutase expression in insulin-producing cells. Endocrinology *141*, 153-162.

Das, K.C., Guo, X.L., and White, C.W. (1998). Protein kinase Cdelta-dependent induction of manganese superoxide dismutase gene expression by microtubule-active anticancer drugs. J Biol Chem *273*, 34639-34645.

Datta, A., Bagchi, S., Nag, A., Shiyanov, P., Adami, G.R., Yoon, T., and Raychaudhuri, P. (2001). The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase. Mutat Res *486*, 89-97.

Davis, C.A., Monnier, J.M., and Nick, H.S. (2001). A coding region determinant of instability regulates levels of manganese superoxide dismutase mRNA. J Biol Chem *276*, 37317-37326.

de Haan, J.B., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., O'Shea, R.D., Cheung, N.S., Bronson, R.T., Silvestro, M.J., Wild, S., Zheng, S.S.*, et al.* (1998). Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. J Biol Chem *273*, 22528-22536.

DeNardo, D.G., Kim, H.T., Hilsenbeck, S., Cuba, V., Tsimelzon, A., and Brown, P.H. (2005). Global gene expression analysis of estrogen receptor transcription factor cross talk in breast cancer: identification of estrogen-induced/activator protein-1-dependent genes. Mol Endocrinol *19*, 362-378.

Desouki, M.M., Kulawiec, M., Bansal, S., Das, G.M., and Singh, K.K. (2005). Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors. Cancer Biol Ther *4*, 1367-1373.

Dhar, S.K., Lynn, B.C., Daosukho, C., and St Clair, D.K. (2004). Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene. J Biol Chem *279*, 28209-28219.

Dhar, S.K., Xu, Y., Chen, Y., and St Clair, D.K. (2006). Specificity protein 1-dependent p53-mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene expression. J Biol Chem *281*, 21698-21709.

Doroshow, J.H., Akman, S., Esworthy, S., Chu, F.F., and Burke, T. (1991). Doxorubicin resistance conferred by selective enhancement of intracellular glutathione peroxidase or superoxide dismutase content in human MCF-7 breast cancer cells. Free Radic Res Commun *12-13 Pt 2*, 779-781.

Douglas, D.B., Akiyama, Y., Carraway, H., Belinsky, S.A., Esteller, M., Gabrielson, E., Weitzman, S., Williams, T., Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2004). Hypermethylation of a small CpGuanine-rich region correlates with loss of activator protein-2alpha expression during progression of breast cancer. Cancer Res *64*, 1611-1620.

Dualan, R., Brody, T., Keeney, S., Nichols, A.F., Admon, A., and Linn, S. (1995). Chromosomal localization and cDNA cloning of the genes (DDB1 and DDB2) for the p127 and p48 subunits of a human damage-specific DNA binding protein. Genomics *29*, 62-69.

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

Dunning, A.M., Healey, C.S., Pharoah, P.D., Teare, M.D., Ponder, B.A., and Easton, D.F. (1999). A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev *8*, 843-854.

Eisenstein, R.S., and Blemings, K.P. (1998). Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. J Nutr *128*, 2295-2298.

El-Mahdy, M.A., Zhu, Q., Wang, Q.E., Wani, G., Praetorius-Ibba, M., and Wani, A.A. (2006). Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC. J Biol Chem *281*, 13404-13411.

Ellis, M.J., Jenkins, S., Hanfelt, J., Redington, M.E., Taylor, M., Leek, R., Siddle, K., and Harris, A. (1998). Insulin-like growth factors in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat *52*, 175-184.

Er, T.K., Tsai, S.M., Wu, S.H., Chiang, W., Lin, H.C., Lin, S.F., Tsai, L.Y., and Liu, T.Z. (2007). Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. Clin Biochem *40*, 1015-1019.

Esterbauer, H., Benedetti, A., Lang, J., Fulceri, R., Fauler, G., and Comporti, M. (1986). Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation. Biochim Biophys Acta *876*, 154-166.

Esworthy, R.S., Baker, M.A., and Chu, F.F. (1995). Expression of selenium-dependent glutathione peroxidase in human breast tumor cell lines. Cancer Res *55*, 957-962.

F

Feldberg, R.S., and Grossman, L. (1976). A DNA binding protein from human placenta specific for ultraviolet damaged DNA. Biochemistry *15*, 2402-2408.

Feldberg, R.S., Lucas, J.L., and Dannenberg, A. (1982). A damage-specific DNA binding protein. Large scale purification from human placenta and characterization. J Biol Chem *257*, 6394-6401.

Fitch, M.E., Cross, I.V., Turner, S.J., Adimoolam, S., Lin, C.X., Williams, K.G., and Ford, J.M. (2003a). The DDB2 nucleotide excision repair gene product p48 enhances global genomic repair in p53 deficient human fibroblasts. DNA Repair (Amst) *2*, 819-826.

Fitch, M.E., Nakajima, S., Yasui, A., and Ford, J.M. (2003b). In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. J Biol Chem *278*, 46906-46910.

Flohe, L., and Gunzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol *105*, 114-121.

Fossati, P., Prencipe, L., and Berti, G. (1980). Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clin Chem *26*, 227-231.

Frankel, E.N., Neff, W.E., Brooks, D.D., and Fujimoto, K. (1987). Fluorescence formation from the interaction of DNA with lipid oxidation degradation products. Biochim Biophys Acta *919*, 239-244.

Fresno, M., Wu, W., Rodriguez, J.M., and Nadji, M. (1993). Localization of metallothionein in breast carcinomas. An immunohistochemical study. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol *423*, 215-219.

Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O2-.), superoxide dismutases, and related matters. J Biol Chem *272*, 18515-18517.

Fukuyama, M., Rokutan, K., Sano, T., Miyake, H., Shimada, M., and Tashiro, S. (2005). Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon. Cancer Lett *221*, 97-104.

G

Gabelman, B.M., and Emerman, J.T. (1992). Effects of estrogen, epidermal growth factor, and transforming growth factor-alpha on the growth of human breast epithelial cells in primary culture. Exp Cell Res *201*, 113-118.

Galeotti, T., Pani, G., Capone, C., Bedogni, B., Borrello, S., Mancuso, C., and Eboli, M.L. (2005). Protective role of MnSOD and redox regulation of neuronal cell survival. Biomed Pharmacother *59*, 197-203.

Gao, N., Jiang, B.H., Leonard, S.S., Corum, L., Zhang, Z., Roberts, J.R., Antonini, J., Zheng, J.Z., Flynn, D.C., Castranova, V.*, et al.* (2002). p38 Signaling-mediated hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor induction by Cr(VI) in DU145 human prostate carcinoma cells. J Biol Chem *277*, 45041-45048.

Gasparini, G., Toi, M., Gion, M., Verderio, P., Dittadi, R., Hanatani, M., Matsubara, I., Vinante, O., Bonoldi, E., Boracchi, P.*, et al.* (1997). Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. J Natl Cancer Inst *89*, 139-147.

Getzoff, E.D., Tainer, J.A., Weiner, P.K., Kollman, P.A., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (1983). Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. Nature *306*, 287-290.

Giangrande, P.H., Pollio, G., and McDonnell, D.P. (1997). Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. J Biol Chem *272*, 32889-32900.

Giudice, A., and Montella, M. (2006). Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. Bioessays *28*, 169-181.

Goetz, M.E., and Luch, A. (2008). Reactive species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. Cancer Lett *266*, 73-83.

Gogun, Y., Sakurada, S., Kimura, Y., and Nagumo, M. (1990). Enhancement of superoxide dismutase activity in cancer cell lines by anticancer drugs. J Clin Biochem Nutr *8*, 85-92.

Golden, T.R., and Melov, S. (2001). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and aging. Mech Ageing Dev *122*, 1577-1589.

Gopalakrishna, R., and Jaken, S. (2000). Protein kinase C signaling and oxidative stress. Free Radic Biol Med *28*, 1349-1361.

Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K., and Nakatani, Y. (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. Cell *113*, 357-367.

Grzelak, A., Soszynski, M., and Bartosz, G. (2000). Inactivation of antioxidant enzymes by peroxynitrite. Scand J Clin Lab Invest *60*, 253-258.

Grzenkowicz-Wydra, J., Cisowski, J., Nakonieczna, J., Zarebski, A., Udilova, N., Nohl, H., Jozkowicz, A., Podhajska, A., and Dulak, J. (2004). Gene transfer of CuZn superoxide dismutase enhances the synthesis of vascular endothelial growth factor. Mol Cell Biochem *264*, 169-181.

Guerrero-Santoro, J., Kapetanaki, M.G., Hsieh, C.L., Gorbachinsky, I., Levine, A.S., and Rapic-Otrin, V. (2008). The cullin 4B-based UV-damaged DNA-binding protein ligase binds to UV-damaged chromatin and ubiquitinates histone H2A. Cancer Res *68*, 5014-5022.

Guo, G., Yan-Sanders, Y., Lyn-Cook, B.D., Wang, T., Tamae, D., Ogi, J., Khaletskiy, A., Li, Z., Weydert, C., Longmate, J.A., *et al.* (2003a). Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. Mol Cell Biol *23*, 2362-2378.

Guo, Z., Boekhoudt, G.H., and Boss, J.M. (2003b). Role of the intronic enhancer in tumor necrosis factor-mediated induction of manganous superoxide dismutase. J Biol Chem *278*, 23570-23578.

Gutierrez, P.L. (2000). The role of NAD(P)H oxidoreductase (DT-Diaphorase) in the bioactivation of quinone-containing antitumor agents: a review. Free Radic Biol Med *29*, 263-275.

Gutteridge, J.M., Quinlan, G.J., and Kovacic, P. (1998). Phagomimetic action of antimicrobial agents. Free Radic Res *28*, 1-14.

H

Hallstrom, T.C., Mori, S., and Nevins, J.R. (2008). An E2F1-dependent gene expression program that determines the balance between proliferation and cell death. Cancer Cell *13*, 11-22.

Harris, C.A., Derbin, K.S., Hunte-McDonough, B., Krauss, M.R., Chen, K.T., Smith, D.M., and Epstein, L.B. (1991). Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. J Immunol *147*, 149-154.

Hartman, A.R., and Ford, J.M. (2003). BRCA1 and p53: compensatory roles in DNA repair. J Mol Med *81*, 700-707.

Hassan, H.M. (1989). Microbial superoxide dismutases. Adv Genet *26*, 65-97.

Hayes, S., Shiyanov, P., Chen, X., and Raychaudhuri, P. (1998). DDB, a putative DNA repair protein, can function as a transcriptional partner of E2F1. Mol Cell Biol *18*, 240-249.

Hercberg, S., Czernichow, S., and Galan, P. (2006). Antioxidant vitamins and minerals in prevention of cancers: lessons from the SU.VI.MAX study. Br J Nutr *96 Suppl 1*, S28-30.

Higa, L.A., Wu, M., Ye, T., Kobayashi, R., Sun, H., and Zhang, H. (2006). CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. Nat Cell Biol *8*, 1277-1283.

Hirose, K., Longo, D.L., Oppenheim, J.J., and Matsushima, K. (1993). Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. FASEB J *7*, 361-368.

Hitchler, M.J., Oberley, L.W., and Domann, F.E. (2008). Epigenetic silencing of SOD2 by histone modifications in human breast cancer cells. Free Radic Biol Med *45*, 1573-1580.

Hitchler, M.J., Wikainapakul, K., Yu, L., Powers, K., Attatippaholkun, W., and Domann, F.E. (2006). Epigenetic regulation of manganese superoxide dismutase expression in human breast cancer cells. Epigenetics *1*, 163-171.

Hodge, D.R., Peng, B., Pompeia, C., Thomas, S., Cho, E., Clausen, P.A., Marquez, V.E., and Farrar, W.L. (2005). Epigenetic silencing of manganese superoxide dismutase (SOD-2) in KAS 6/1 human multiple myeloma cells increases cell proliferation. Cancer Biol Ther *4*, 585-592.

Hsu, T.C., Young, M.R., Cmarik, J., and Colburn, N.H. (2000). Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. Free Radic Biol Med *28*, 1338-1348.

Hu, Y., Rosen, D.G., Zhou, Y., Feng, L., Yang, G., Liu, J., and Huang, P. (2005). Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. J Biol Chem *280*, 39485-39492.

Hu, Z., Shao, M., Yuan, J., Xu, L., Wang, F., Wang, Y., Yuan, W., Qian, J., Ma, H., Liu, H., *et al.* (2006). Polymorphisms in DNA damage binding protein 2 (DDB2) and susceptibility of primary lung cancer in the Chinese: a case-control study. Carcinogenesis *27*, 1475-1480.

Huang, Y., He, T., and Domann, F.E. (1999). Decreased expression of manganese superoxide dismutase in transformed cells is associated with increased cytosine methylation of the SOD2 gene. DNA Cell Biol *18*, 643-652.

Huang, Y., Peng, J., Oberley, L.W., and Domann, F.E. (1997). Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. Free Radic Biol Med *23*, 314-320.

Hur, G.C., Cho, S.J., Kim, C.H., Kim, M.K., Bae, S.I., Nam, S.Y., Park, J.W., Kim, W.H., and Lee, B.L. (2003). Manganese superoxide dismutase expression correlates with chemosensitivity in human gastric cancer cell lines. Clin Cancer Res *9*, 5768-5775.

Hurt, E.M., Thomas, S.B., Peng, B., and Farrar, W.L. (2007). Molecular consequences of SOD2 expression in epigenetically silenced pancreatic carcinoma cell lines. Br J Cancer *97*, 1116-1123.

Hurt, J., Hsu, J.L., Dougall, W.C., Visner, G.A., Burr, I.M., and Nick, H.S. (1992). Multiple mRNA species generated by alternate polyadenylation from the rat manganese superoxide dismutase gene. Nucleic Acids Res *20*, 2985-2990.

Hussain, S.P., Amstad, P., He, P., Robles, A., Lupold, S., Kaneko, I., Ichimiya, M., Sengupta, S., Mechanic, L., Okamura, S., *et al.* (2004). p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. Cancer Res *64*, 2350-2356.

Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., and Chu, G. (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 424-428.

Hynes, N.E., and Stern, D.F. (1994). The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. Biochim Biophys Acta *1198*, 165-184.

I - J

Iglehart, J.D., Kraus, M.H., Langton, B.C., Huper, G., Kerns, B.J., and Marks, J.R. (1990). Increased erbB-2 gene copies and expression in multiple stages of breast cancer. Cancer Res *50*, 6701-6707.

Inoki, T., Yamagami, S., Inoki, Y., Tsuru, T., Hamamoto, T., Kagawa, Y., Mori, T., and Endo, H. (2004). Human DDB2 splicing variants are dominant negative inhibitors of UV-damaged DNA repair. Biochem Biophys Res Commun *314*, 1036-1043.

Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. Science *275*, 1649-1652.

Ishii, K., Zhen, L.X., Wang, D.H., Funamori, Y., Ogawa, K., and Taketa, K. (1996). Prevention of mammary tumorigenesis in acatalasemic mice by vitamin E supplementation. Jpn J Cancer Res *87*, 680-684.

Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., Nakada, K., Honma, Y., and Hayashi, J. (2008). ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. Science *320*, 661-664.

Itoh, T. (2006). Xeroderma pigmentosum group E and DDB2, a smaller subunit of damage-specific DNA binding protein: proposed classification of xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and ultraviolet-sensitive syndrome. J Dermatol Sci *41*, 87-96.

Itoh, T., Cado, D., Kamide, R., and Linn, S. (2004). DDB2 gene disruption leads to skin tumors and resistance to apoptosis after exposure to ultraviolet light but not a chemical carcinogen. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 2052-2057.

Itoh, T., Iwashita, S., Cohen, M.B., Meyerholz, D.K., and Linn, S. (2007). Ddb2 is a haploinsufficient tumor suppressor and controls spontaneous germ cell apoptosis. Hum Mol Genet *16*, 1578-1586.

Itoh, T., Mori, T., Ohkubo, H., and Yamaizumi, M. (1999). A newly identified patient with clinical xeroderma pigmentosum phenotype has a non-sense mutation in the DDB2 gene and incomplete repair in (6-4) photoproducts. J Invest Dermatol *113*, 251-257.

Izutani, R., Asano, S., Imano, M., Kuroda, D., Kato, M., and Ohyanagi, H. (1998). Expression of manganese superoxide dismutase in esophageal and gastric cancers. J Gastroenterol *33*, 816-822.

Izutani, R., Kato, M., Asano, S., Imano, M., and Ohyanagi, H. (2002). Expression of manganese superoxide disumutase influences chemosensitivity in esophageal and gastric cancers. Cancer Detect Prev *26*, 213-221.

Izutani, R., Katoh, M., Asano, S., Ohyanagi, H., and Hirose, K. (1996). Enhanced expression of manganese superoxide dismutase mRNA and increased TNFalpha mRNA expression by gastric mucosa in gastric cancer. World J Surg *20*, 228-233.

Jacobsen, B.M., Richer, J.K., Schittone, S.A., and Horwitz, K.B. (2002). New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation. J Biol Chem *277*, 27793-27800.

Jaiswal, A.K. (2000). Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. Free Radic Biol Med *29*, 254-262.

Janssen, A.M., Bosman, C.B., Sier, C.F., Griffioen, G., Kubben, F.J., Lamers, C.B., van Krieken, J.H., van de Velde, C.J., and Verspaget, H.W. (1998). Superoxide dismutases in relation to the overall survival of colorectal cancer patients. Br J Cancer *78*, 1051-1057.

Jaruga, P., Zastawny, T.H., Skokowski, J., Dizdaroglu, M., and Olinski, R. (1994). Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. FEBS Lett *341*, 59-64.

Jarvinen, T.A., Pelto-Huikko, M., Holli, K., and Isola, J. (2000). Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. Am J Pathol *156*, 29-35.

Josson, S., Xu, Y., Fang, F., Dhar, S.K., St Clair, D.K., and St Clair, W.H. (2006). RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells. Oncogene *25*, 1554-1559.

K

Kaaks, R., Bellati, C., Venturelli, E., Rinaldi, S., Secreto, G., Biessy, C., Pala, V., Sieri, S., and Berrino, F. (2003). Effects of dietary intervention on IGF-I and IGF-binding proteins, and related alterations in sex steroid metabolism: the Diet and Androgens (DIANA) Randomised Trial. Eur J Clin Nutr *57*, 1079-1088.

Kaewpila, S., Venkataraman, S., Buettner, G.R., and Oberley, L.W. (2008). Manganese superoxide dismutase modulates hypoxia-inducible factor-1 alpha induction via superoxide. Cancer Res *68*, 2781-2788.

Kahlos, K., Anttila, S., Asikainen, T., Kinnula, K., Raivio, K.O., Mattson, K., Linnainmaa, K., and Kinnula, V.L. (1998). Manganese superoxide dismutase in healthy human pleural mesothelium and in malignant pleural mesothelioma. Am J Respir Cell Mol Biol *18*, 570-580.

Kahlos, K., Pitkanen, S., Hassinen, I., Linnainmaa, K., and Kinnula, V.L. (1999). Generation of reactive oxygen species by human mesothelioma cells. Br J Cancer *80*, 25-31.

Kahlos, K., Paakko, P., Kurttila, E., Soini, Y., and Kinnula, V.L. (2000). Manganese superoxide dismutase as a diagnostic marker for malignant pleural mesothelioma. Br J Cancer *82*, 1022-1029.

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

Karihtala, P., Mantyniemi, A., Kang, S.W., Kinnula, V.L., and Soini, Y. (2003). Peroxiredoxins in breast carcinoma. Clin Cancer Res *9*, 3418-3424.

Karihtala, P., Winqvist, R., Syvaoja, J.E., Kinnula, V.L., and Soini, Y. (2006). Increasing oxidative damage and loss of mismatch repair enzymes during breast carcinogenesis. Eur J Cancer *42*, 2653-2659.

Kato, M., Minakami, H., Kuroiwa, M., Kobayashi, Y., Oshima, S., Kozawa, K., Morikawa, A., and Kimura, H. (2003). Superoxide radical generation and Mn- and Cu-Zn superoxide dismutases activities in human leukemic cells. Hematol Oncol *21*, 11-16.

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

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

Keele, B.B., Jr., McCord, J.M., and Fridovich, I. (1970). Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganese-containing enzyme. J Biol Chem *245*, 6176-6181.

Keeney, S., Chang, G.J., and Linn, S. (1993). Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E. J Biol Chem *268*, 21293-21300.

Keeney, S., Eker, A.P., Brody, T., Vermeulen, W., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H., and Linn, S. (1994). Correction of the DNA repair defect in xeroderma pigmentosum group E by injection of a DNA damage-binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 4053-4056.

Keller, J.N., Kindy, M.S., Holtsberg, F.W., St Clair, D.K., Yen, H.C., Germeyer, A., Steiner, S.M., Bruce-Keller, A.J., Hutchins, J.B., and Mattson, M.P. (1998). Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. J Neurosci *18*, 687-697.

Kerangueven, F., Noguchi, T., Coulier, F., Allione, F., Wargniez, V., Simony-Lafontaine, J., Longy, M., Jacquemier, J., Sobol, H., Eisinger, F., *et al.* (1997). Genome-wide search for loss of heterozygosity shows extensive genetic diversity of human breast carcinomas. Cancer Res *57*, 5469-5474.

Keydar, I., Chen, L., Karby, S., Weiss, F.R., Delarea, J., Radu, M., Chaitcik, S., and Brenner, H.J. (1979). Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. Eur J Cancer *15*, 659-670.

Khalkhali-Ellis, Z. (2006). Maspin: the new frontier. Clin Cancer Res *12*, 7279-7283.

Khan, S., Kumagai, T., Vora, J., Bose, N., Sehgal, I., Koeffler, P.H., and Bose, S. (2004). PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. Int J Cancer *112*, 407-410.

Kijima, I., Itoh, T., and Chen, S. (2005). Growth inhibition of estrogen receptor-positive and aromatase-positive human breast cancer cells in monolayer and spheroid cultures by letrozole, anastrozole, and tamoxifen. J Steroid Biochem Mol Biol *97*, 360-368.

Kikugawa, K., and Beppu, M. (1987). Involvement of lipid oxidation products in the formation of fluorescent and cross-linked proteins. Chem Phys Lipids *44*, 277-296.

Kim, H.P., Roe, J.H., Chock, P.B., and Yim, M.B. (1999). Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate. J Biol Chem *274*, 37455-37460.

Kim, H.T., Kim, Y.H., Nam, J.W., Lee, H.J., Rho, H.M., and Jung, G. (1994). Study of 5'-flanking region of human Cu/Zn superoxide dismutase. Biochem Biophys Res Commun *201*, 1526-1533.

Kim, I., Moon, S.O., Kim, S.H., Kim, H.J., Koh, Y.S., and Koh, G.Y. (2001a). Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. J Biol Chem *276*, 7614-7620.

Kim, K.H., Rodriguez, A.M., Carrico, P.M., and Melendez, J.A. (2001b). Potential mechanisms for the inhibition of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. Antioxid Redox Signal *3*, 361-373.

Kim, Y., and Kipreos, E.T. (2007). Cdt1 degradation to prevent DNA re-replication: conserved and non-conserved pathways. Cell Div *2*, 18.

Kiningham, K.K., Daosukho, C., and St Clair, D.K. (2004). IkappaBalpha (inhibitory kappaBalpha) identified as labile repressor of MnSOD (manganese superoxide dismutase) expression. Biochem J *384*, 543-549.

Kiningham, K.K., Oberley, T.D., Lin, S., Mattingly, C.A., and St Clair, D.K. (1999). Overexpression of manganese superoxide dismutase protects against mitochondrial-initiated poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell death. FASEB J *13*, 1601-1610.

Kiningham, K.K., and St Clair, D.K. (1997). Overexpression of manganese superoxide dismutase selectively modulates the activity of Jun-associated transcription factors in fibrosarcoma cells. Cancer Res *57*, 5265-5271.

Kinnula, K., Linnainmaa, K., Raivio, K.O., and Kinnula, V.L. (1998). Endogenous antioxidant enzymes and glutathione S-transferase in protection of mesothelioma cells against hydrogen peroxide and epirubicin toxicity. Br J Cancer *77*, 1097-1102.

Kinnula, V.L., and Crapo, J.D. (2004). Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. Free Radic Biol Med *36*, 718-744.

Kinnula, V.L., Pietarinen-Runtti, P., Raivio, K., Kahlos, K., Pelin, K., Mattson, K., and Linnainmaa, K. (1996). Manganese superoxide dismutase in human pleural mesothelioma cell lines. Free Radic Biol Med *21*, 527-532.

Knirsch, L., and Clerch, L.B. (2000). A region in the 3' UTR of MnSOD RNA enhances translation of a heterologous RNA. Biochem Biophys Res Commun *272*, 164-168.

Knirsch, L., and Clerch, L.B. (2001). Tyrosine phosphorylation regulates manganese superoxide dismutase (MnSOD) RNA-binding protein activity and MnSOD protein expression. Biochemistry *40*, 7890-7895.

Kobayashi, D., Watanabe, N., Sasaki, H., Okamoto, T., Tsuji, N., Sato, T., Yamauchi, N., and Niitsu, Y. (1998). Suppression of intracellular resistance factors by adriamycin augments heat-induced apoptosis via interleukin-1beta-converting enzyme activation in pancreatic carcinoma cells. Int J Cancer *76*, 552-555.

Kobayashi, D., Watanabe, N., Yamauchi, N., Tsuji, N., Sato, T., and Niitsu, Y. (1997). Endogenous tumor necrosis factor as a predictor of doxorubicin sensitivity in leukemic patients. Blood *89*, 2472-2479.

Koistinen, P., Ruuska, S., Saily, M., Kakko, S., Siitonen, P., Siitonen, T., Savolainen, M.J., Kinnula, V.L., and Savolainen, E.R. (2006). An association between manganese superoxide dismutase polymorphism and outcome of chemotherapy in acute myeloid leukemia. Haematologica *91*, 829-832.

Kops, G.J., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W., Coffer, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H., and Burgering, B.M. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. Nature *419*, 316-321.

Korenaga, D., Yasuda, M., Honda, M., Nozoe, T., and Inutsuka, S. (2003). MnSOD expression within tumor cells is closely related to mode of invasion in human gastric cancer. Oncol Rep *10*, 27-30.

Kucharczak, J., Simmons, M.J., Fan, Y., and Gelinas, C. (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. Oncogene *22*, 8961-8982.

Kvale, G., and Heuch, I. (1988). Menstrual factors and breast cancer risk. Cancer *62*, 1625-1631.

Kwon, J., Lee, S.R., Yang, K.S., Ahn, Y., Kim, Y.J., Stadtman, E.R., and Rhee, S.G. (2004). Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 16419-16424.

L

LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G., and MacKenzie, A.E. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. Oncogene *17*, 3247-3259.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

Landriscina, M., Remiddi, F., Ria, F., Palazzotti, B., De Leo, M.E., Iacoangeli, M., Rosselli, R., Scerrati, M., and Galeotti, T. (1996). The level of MnSOD is directly correlated with grade of brain tumours of neuroepithelial origin. Br J Cancer *74*, 1877-1885.

Lebovitz, R.M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Jr., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., and Matzuk, M.M. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 9782-9787.

Lee, Y.J., Cho, H.N., Jeoung, D.I., Soh, J.W., Cho, C.K., Bae, S., Chung, H.Y., Lee, S.J., and Lee, Y.S. (2004). HSP25 overexpression attenuates oxidative stress-induced apoptosis: roles of ERK1/2 signaling and manganese superoxide dismutase. Free Radic Biol Med *36*, 429-444.

Lemire, B.D., Fankhauser, C., Baker, A., and Schatz, G. (1989). The mitochondrial targeting function of randomly generated peptide sequences correlates with predicted helical amphiphilicity. J Biol Chem *264*, 20206-20215.

Leroy, P., Nicolas, A., Thioudellet, C., Oster, T., Wellman, M., and Siest, G. (1993). Rapid liquid chromatographic assay of glutathione in cultured cells. Biomed Chromatogr *7*, 86-89.

Leslie, N.R., Bennett, D., Lindsay, Y.E., Stewart, H., Gray, A., and Downes, C.P. (2003). Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. EMBO J *22*, 5501-5510.

Li, J., Wang, Q.E., Zhu, Q., El-Mahdy, M.A., Wani, G., Praetorius-Ibba, M., and Wani, A.A. (2006a). DNA damage binding protein component DDB1 participates in nucleotide excision repair through DDB2 DNA-binding and cullin 4A ubiquitin ligase activity. Cancer Res *66*, 8590-8597.

Li, J.J., and Oberley, L.W. (1997). Overexpression of manganese-containing superoxide dismutase confers resistance to the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha and/or hyperthermia. Cancer Res *57*, 1991-1998.

Li, J.J., Oberley, L.W., St Clair, D.K., Ridnour, L.A., and Oberley, T.D. (1995). Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. Oncogene *10*, 1989-2000.

Li, M., Chiu, J.F., Mossman, B.T., and Fukagawa, N.K. (2006b). Down-regulation of manganese-superoxide dismutase through phosphorylation of FOXO3a by Akt in explanted vascular smooth muscle cells from old rats. J Biol Chem *281*, 40429-40439.

Li, N., Oberley, T.D., Oberley, L.W., and Zhong, W. (1998a). Overexpression of manganese superoxide dismutase in DU145 human prostate carcinoma cells has multiple effects on cell phenotype. Prostate *35*, 221-233.

Li, N., Zhai, Y., and Oberley, T.D. (1999). Two distinct mechanisms for inhibition of cell growth in human prostate carcinoma cells with antioxidant enzyme imbalance. Free Radic Biol Med *26*, 1554-1568.

Li, S., Ku, C.Y., Farmer, A.A., Cong, Y.S., Chen, C.F., and Lee, W.H. (1998b). Identification of a novel cytoplasmic protein that specifically binds to nuclear localization signal motifs. J Biol Chem *273*, 6183-6189.

Li, S., Yan, T., Yang, J.Q., Oberley, T.D., and Oberley, L.W. (2000). The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. Cancer Res *60*, 3927-3939.

Li, Z., Khaletskiy, A., Wang, J., Wong, J.Y., Oberley, L.W., and Li, J.J. (2001). Genes regulated in human breast cancer cells overexpressing manganese-containing superoxide dismutase. Free Radic Biol Med *30*, 260-267.

Liaw, D., Marsh, D.J., Li, J., Dahia, P.L., Wang, S.I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K.M., Tsou, H.C., Peacocke, M.*, et al.* (1997a). Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. Nat Genet *16*, 64-67.

Liaw, K.Y., Lee, P.H., Wu, F.C., Tsai, J.S., and Lin-Shiau, S.Y. (1997b). Zinc, copper, and superoxide dismutase in hepatocellular carcinoma. Am J Gastroenterol *92*, 2260-2263.

Lin, P.S., Ho, K.C., Sung, S.J., and Tsai, S. (1993). Cytotoxicity and manganese superoxide dismutase induction by tumor necrosis factor-alpha and ionizing radiation in MCF-7 human breast carcinoma cells. Lymphokine Cytokine Res *12*, 303-308.

Liochev, S.I., and Fridovich, I. (1995). A cationic manganic porphyrin inhibits uptake of paraquat by Escherichia coli. Arch Biochem Biophys *321*, 271-275.

Liu, J., Hinkhouse, M.M., Sun, W., Weydert, C.J., Ritchie, J.M., Oberley, L.W., and Cullen, J.J. (2004). Redox regulation of pancreatic cancer cell growth: role of glutathione peroxidase in the suppression of the malignant phenotype. Hum Gene Ther *15*, 239-250.

Liu, R., Buettner, G.R., and Oberley, L.W. (2000a). Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide dismutase gene expression by TNF-alpha. Free Radic Biol Med *28*, 1197-1205.

Liu, W., Nichols, A.F., Graham, J.A., Dualan, R., Abbas, A., and Linn, S. (2000b). Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. J Biol Chem *275*, 21429-21434.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem *193*, 265-275.

Lupu, R., Cardillo, M., Harris, L., Hijazi, M., and Rosenberg, K. (1995). Interaction between erbB-receptors and heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance. Semin Cancer Biol *6*, 135-145.

M

Macleod, U., Ross, S., Gillis, C., McConnachie, A., Twelves, C., and Watt, G.C. (2000). Socio-economic deprivation and stage of disease at presentation in women with breast cancer. Ann Oncol *11*, 105-107.

MacMahon, B., Cole, P., Lin, T.M., Lowe, C.R., Mirra, A.P., Ravnihar, B., Salber, E.J., Valaoras, V.G., and Yuasa, S. (1970). Age at first birth and breast cancer risk. Bull World Health Organ *43*, 209-221.

Maeda, H., Uozumi, T., Kurisu, K., Matsuoka, T., Kawamoto, K., Kiya, K., Ogasawara, H., Sugiyama, K., Mikami, T., Monden, S*., et al.* (1994). Combined antitumor effects of TNF and G-CSF on a human medulloblastoma xenograft line. J Neurooncol *21*, 203-213.

Maehara, K., Hasegawa, T., Xiao, H., Takeuchi, A., Abe, R., and Isobe, K. (1999). Cooperative interaction of NF-kappaB and C/EBP binding sites is necessary for manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by lipopolysaccharide and interferon-gamma. FEBS Lett *449*, 115-119.

Maehara, K., Uekawa, N., and Isobe, K. (2002). Effects of histone acetylation on transcriptional regulation of manganese superoxide dismutase gene. Biochem Biophys Res Commun *295*, 187-192.

Malafa, M., Margenthaler, J., Webb, B., Neitzel, L., and Christophersen, M. (2000). MnSOD expression is increased in metastatic gastric cancer. J Surg Res *88*, 130-134.

Manna, S.K., Zhang, H.J., Yan, T., Oberley, L.W., and Aggarwal, B.B. (1998). Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. J Biol Chem *273*, 13245-13254.

Mantymaa, P., Siitonen, T., Guttorm, T., Saily, M., Kinnula, V., Savolainen, E.R., and Koistinen, P. (2000). Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells exposed to etoposide. Br J Haematol *108*, 574-581.

Maritim, A.C., Sanders, R.A., and Watkins, J.B., 3rd (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol *17*, 24-38.

Marklund, S.L., Holme, E., and Hellner, L. (1982a). Superoxide dismutase in extracellular fluids. Clin Chim Acta *126*, 41-51.

Marklund, S.L., Westman, N.G., Lundgren, E., and Roos, G. (1982b). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. Cancer Res *42*, 1955-1961.

Marnett, L.J. (1994). Generation of mutagens during arachidonic acid metabolism. Cancer Metastasis Rev *13*, 303-308.

Marnett, L.J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutat Res *424*, 83-95.

Marnett, L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis *21*, 361-370.

Martin, R.C., Ahn, J., Nowell, S.A., Hein, D.W., Doll, M.A., Martini, B.D., and Ambrosone, C.B. (2006). Association between manganese superoxide dismutase promoter gene polymorphism and breast cancer survival. Breast Cancer Res *8*, R45.

Martin, R.C., Liu, Q., Wo, J.M., Ray, M.B., and Li, Y. (2007). Chemoprevention of carcinogenic progression to esophageal adenocarcinoma by the manganese superoxide dismutase supplementation. Clin Cancer Res *13*, 5176-5182.

Martinez, E., Palhan, V.B., Tjernberg, A., Lymar, E.S., Gamper, A.M., Kundu, T.K., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2001). Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. Mol Cell Biol *21*, 6782-6795.

Masuda, A., Longo, D.L., Kobayashi, Y., Appella, E., Oppenheim, J.J., and Matsushima, K. (1988). Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. FASEB J *2*, 3087-3091.

Masuda, H., Tanaka, T., and Takahama, U. (1994). Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. Biochem Biophys Res Commun *203*, 1175-1180.

Mates, J.M., and Sanchez-Jimenez, F.M. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. Int J Biochem Cell Biol *32*, 157-170.

Matsuda, N., Azuma, K., Saijo, M., Iemura, S., Hioki, Y., Natsume, T., Chiba, T., and Tanaka, K. (2005). DDB2, the xeroderma pigmentosum group E gene product, is directly ubiquitylated by Cullin 4A-based ubiquitin ligase complex. DNA Repair (Amst) *4*, 537-545.

Mauriac, L., Durand, M., Bonichon, F., and Chauvergne, J. (1986). [Hormonotherapy of metastatic breast cancer with tamoxifen and medroxyprogesterone acetate. Randomized trial comparing alternating sequences with successive applications]. Bull Cancer *73*, 148-154.

McCord, J.M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med *312*, 159-163.

McGowan, E.M., and Clarke, C.L. (1999). Effect of overexpression of progesterone receptor A on endogenous progestin-sensitive endpoints in breast cancer cells. Mol Endocrinol *13*, 1657-1671.

McGowan, E.M., Saad, S., Bendall, L.J., Bradstock, K.F., and Clarke, C.L. (2004). Effect of progesterone receptor a predominance on breast cancer cell migration into bone marrow fibroblasts. Breast Cancer Res Treat *83*, 211-220.

McSherry, E.A., Donatello, S., Hopkins, A.M., and McDonnell, S. (2007). Molecular basis of invasion in breast cancer. Cell Mol Life Sci *64*, 3201-3218.

Meijers-Heijboer, H., van den Ouweland, A., Klijn, J., Wasielewski, M., de Snoo, A., Oldenburg, R., Hollestelle, A., Houben, M., Crepin, E., van Veghel-Plandsoen, M.*, et al.* (2002). Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. Nat Genet *31*, 55-59.

Millikan, R.C., Player, J., de Cotret, A.R., Moorman, P., Pittman, G., Vannappagari, V., Tse, C.K., and Keku, T. (2004). Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism and risk of breast cancer in a population-based case-control study of African Americans and whites. Breast Cancer Res *6*, R264-274.

Millikin, D., Meese, E., Vogelstein, B., Witkowski, C., and Trent, J. (1991). Loss of heterozygosity for loci on the long arm of chromosome 6 in human malignant melanoma. Cancer Res *51*, 5449-5453.

Minc, E., de Coppet, P., Masson, P., Thiery, L., Dutertre, S., Amor-Gueret, M., and Jaulin, C. (1999). The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. J Biol Chem *274*, 503-509.

Mintz, P.J., Habib, N.A., Jones, L.J., Giamas, G., Lewis, J.S., Bowen, R.L., Coombes, R.C., and Stebbing, J. (2008). The phosphorylated membrane estrogen receptor and cytoplasmic signaling and apoptosis proteins in human breast cancer. Cancer *113*, 1489-1495.

Mitchell, D.C., Abdelrahim, M., Weng, J., Stafford, L.J., Safe, S., Bar-Eli, M., and Liu, M. (2006). Regulation of KiSS-1 metastasis suppressor gene expression in breast cancer cells by direct interaction of transcription factors activator protein-2alpha and specificity protein-1. J Biol Chem *281*, 51-58.

Mitrunen, K., and Hirvonen, A. (2003). Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. Mutat Res *544*, 9-41.

Mitrunen, K., Sillanpaa, P., Kataja, V., Eskelinen, M., Kosma, V.M., Benhamou, S., Uusitupa, M., and Hirvonen, A. (2001). Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. Carcinogenesis *22*, 827-829.

Moasser, M.M. (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Oncogene *26*, 6469-6487.

Moffatt, P., and Denizeau, F. (1997). Metallothionein in physiological and physiopathological processes. Drug Metab Rev *29*, 261-307.

Moscow, J.A., Morrow, C.S., He, R., Mullenbach, G.T., and Cowan, K.H. (1992). Structure and function of the 5'-flanking sequence of the human cytosolic selenium-dependent glutathione peroxidase gene (hgpx1). J Biol Chem *267*, 5949-5958.

Moser, J., Volker, M., Kool, H., Alekseev, S., Vrieling, H., Yasui, A., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H. (2005). The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions. DNA Repair (Amst) *4*, 571-582.

Motoori, S., Majima, H.J., Ebara, M., Kato, H., Hirai, F., Kakinuma, S., Yamaguchi, C., Ozawa, T., Nagano, T., Tsujii, H., *et al.* (2001). Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase protects against radiation-induced cell death in the human hepatocellular carcinoma cell line HLE. Cancer Res *61*, 5382-5388.

Mukhopadhyay, S., Das, S.K., and Mukherjee, S. (2004). Expression of Mn-Superoxide Dismutase Gene in Nontumorigenic and Tumorigenic Human Mammary Epithelial Cells. J Biomed Biotechnol *2004*, 195-202.

Murley, J.S., Kataoka, Y., Cao, D., Li, J.J., Oberley, L.W., and Grdina, D.J. (2004). Delayed radioprotection by NFkappaB-mediated induction of Sod2 (MnSOD) in SA-NH tumor cells after exposure to clinically used thiol-containing drugs. Radiat Res *162*, 536-546.

Murley, J.S., Kataoka, Y., Weydert, C.J., Oberley, L.W., and Grdina, D.J. (2002). Delayed cytoprotection after enhancement of Sod2 (MnSOD) gene expression in SA-NH mouse sarcoma cells exposed to WR-1065, the active metabolite of amifostine. Radiat Res *158*, 101-109.

N

Nag, A., Bondar, T., Shiv, S., and Raychaudhuri, P. (2001). The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 is a specific target of cullin 4A in mammalian cells. Mol Cell Biol *21*, 6738-6747.

Nakata, T., Suzuki, K., Fujii, J., Ishikawa, M., Tatsumi, H., Sugiyama, T., Nishida, T., Shimizu, T., Yakushiji, M., and Taniguchi, N. (1992). High expression of manganese superoxide dismutase in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovarian cancer and increased serum levels in the tumor-bearing rats. Carcinogenesis *13*, 1941-1943.

Nass, S.J., and Dickson, R.B. (1997). Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis. Breast Cancer Res Treat *44*, 1-22.

Negoro, S., Kunisada, K., Fujio, Y., Funamoto, M., Darville, M.I., Eizirik, D.L., Osugi, T., Izumi, M., Oshima, Y., Nakaoka, Y., *et al.* (2001). Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. Circulation *104*, 979-981.

Nelson, K.K., and Melendez, J.A. (2004). Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. Free Radic Biol Med *37*, 768-784.

Nelson, K.K., Ranganathan, A.C., Mansouri, J., Rodriguez, A.M., Providence, K.M., Rutter, J.L., Pumiglia, K., Bennett, J.A., and Melendez, J.A. (2003). Elevated sod2 activity augments matrix metalloproteinase expression: evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. Clin Cancer Res *9*, 424-432.

Nichols, A.F., Itoh, T., Graham, J.A., Liu, W., Yamaizumi, M., and Linn, S. (2000). Human damage-specific DNA-binding protein p48. Characterization of XPE mutations and regulation following UV irradiation. J Biol Chem *275*, 21422-21428.

Nichols, A.F., Itoh, T., Zolezzi, F., Hutsell, S., and Linn, S. (2003). Basal transcriptional regulation of human damage-specific DNA-binding protein genes DDB1 and DDB2 by Sp1, E2F, N-myc and NF1 elements. Nucleic Acids Res *31*, 562-569.

Nichols, A.F., Ong, P., and Linn, S. (1996). Mutations specific to the xeroderma pigmentosum group E Ddb- phenotype. J Biol Chem *271*, 24317-24320.

Nicolini, A., Carpi, A., and Tarro, G. (2006). Biomolecular markers of breast cancer. Front Biosci *11*, 1818-1843.

Nioi, P., and Hayes, J.D. (2004). Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. Mutat Res *555*, 149-171.

Nishida, S., Akai, F., Iwasaki, H., Hosokawa, K., Kusunoki, T., Suzuki, K., Taniguchi, N., Hashimoto, S., and Tamura, T.T. (1993). Manganese superoxide dismutase content and localization in human thyroid tumours. J Pathol *169*, 341-345.

Nishikawa, M., Hyoudou, K., Kobayashi, Y., Umeyama, Y., Takakura, Y., and Hashida, M. (2005). Inhibition of metastatic tumor growth by targeted delivery of antioxidant enzymes. J Control Release *109*, 101-107.

Nishitani, H., Sugimoto, N., Roukos, V., Nakanishi, Y., Saijo, M., Obuse, C., Tsurimoto, T., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Fujita, M., *et al.* (2006). Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. EMBO J *25*, 1126-1136.

Noh, D.Y., Ahn, S.J., Lee, R.A., Kim, S.W., Park, I.A., and Chae, H.Z. (2001). Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. Anticancer Res *21*, 2085-2090.

Nordberg, J., and Arner, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med *31*, 1287-1312.

Noshita, N., Sugawara, T., Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., and Chan, P.H. (2001). Manganese Superoxide Dismutase Affects Cytochrome c Release and Caspase-9 Activation After Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice. J Cereb Blood Flow Metab *21*, 557-567.

O - P

Oberley, L.W. (2001). Anticancer therapy by overexpression of superoxide dismutase. Antioxid Redox Signal *3*, 461-472.

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

Ogawa, Y., Kobayashi, T., Nishioka, A., Kariya, S., Ohnishi, T., Hamasato, S., Seguchi, H., and Yoshida, S. (2004). Reactive oxygen species-producing site in radiation and hydrogen peroxide-induced apoptosis of human peripheral T cells: Involvement of lysosomal membrane destabilization. Int J Mol Med *13*, 655-660.

Okochi, E., Ichimura, S., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2002). The absence of Mth1 inactivation and DNA polymerase kappa overexpression in rat mammary carcinomas with frequent A:T to C:G transversions. Jpn J Cancer Res *93*, 501-506.

Okuda, A., Sakai, M., and Muramatsu, M. (1988). [The structure and regulatory elements of the rat glutathione S-transferase P gene]. Tanpakushitsu Kakusan Koso *33*, 1582-1589.

Olnes, M.I., and Kurl, R.N. (1994). Isolation of nuclear extracts from fragile cells: a simplified procedure applied to thymocytes. Biotechniques *17*, 828-829.

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

Ough, M., Lewis, A., Zhang, Y., Hinkhouse, M.M., Ritchie, J.M., Oberley, L.W., and Cullen, J.J. (2004). Inhibition of cell growth by overexpression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in human pancreatic carcinoma. Free Radic Res *38*, 1223-1233.

Ozanne, B.W., Spence, H.J., McGarry, L.C., and Hennigan, R.F. (2007). Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. Oncogene *26*, 1-10.

Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J., and Scanlan, T.S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. Science *277*, 1508-1510.

Pahan, K., Dobashi, K., Ghosh, B., and Singh, I. (1999). Induction of the manganese superoxide dismutase gene by sphingomyelinase and ceramide. J Neurochem *73*, 513-520.

Pani, G., Colavitti, R., Bedogni, B., Fusco, S., Ferraro, D., Borrello, S., and Galeotti, T. (2004). Mitochondrial superoxide dismutase: a promising target for new anticancer therapies. Curr Med Chem *11*, 1299-1308.

Park, J.H., Kim, Y.S., Lee, H.L., Shim, J.Y., Lee, K.S., Oh, Y.J., Shin, S.S., Choi, Y.H., Park, K.J., Park, R.W.*, et al.* (2006). Expression of peroxiredoxin and thioredoxin in human lung cancer and paired normal lung. Respirology *11*, 269-275.

Parmar, H., Melov, S., Samper, E., Ljung, B.M., Cunha, G.R., and Benz, C.C. (2005). Hyperplasia, reduced E-cadherin expression, and developmental arrest in mammary glands oxidatively stressed by loss of mitochondrial superoxide dismutase. Breast *14*, 256-263.

Pellikainen, J.M., and Kosma, V.M. (2007). Activator protein-2 in carcinogenesis with a special reference to breast cancer--a mini review. Int J Cancer *120*, 2061-2067.

Peus, D., Meves, A., Vasa, R.A., Beyerle, A., O'Brien, T., and Pittelkow, M.R. (1999). H2O2 is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation. Free Radic Biol Med *27*, 1197-1202.

Peus, D., Vasa, R.A., Meves, A., Pott, M., Beyerle, A., Squillace, K., and Pittelkow, M.R. (1998). H2O2 is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. J Invest Dermatol *110*, 966-971.

Porntadavity, S., Xu, Y., Kiningham, K., Rangnekar, V.M., Prachayasittikul, V., and St Clair, D.K. (2001). TPA-activated transcription of the human MnSOD gene: role of transcription factors Sp-1 and Egr-1. DNA Cell Biol *20*, 473-481.

Poswig, A., Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Hommel, C., Quel, G., Faisst, K., Dissemond, J., Briviba, K., Krieg, T., *et al.* (1999). Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation. J Invest Dermatol *112*, 13-18.

Praetorius-Ibba, M., Wang, Q.E., Wani, G., El-Mahdy, M.A., Zhu, Q., Qin, S., and Wani, A.A. (2007). Role of Claspin in regulation of nucleotide excision repair factor DDB2. DNA Repair (Amst) *6*, 578-587.

Prost, S., Lu, P., Caldwell, H., and Harrison, D. (2007). E2F regulates DDB2: consequences for DNA repair in Rb-deficient cells. Oncogene *26*, 3572-3581.

Punnonen, K., Ahotupa, M., Asaishi, K., Hyoty, M., Kudo, R., and Punnonen, R. (1994). Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in human breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol *120*, 374-377.

R

Rajagopalan, S., Meng, X.P., Ramasamy, S., Harrison, D.G., and Galis, Z.S. (1996). Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. J Clin Invest *98*, 2572-2579.

Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Sipley, J., Nagase, H., French, D.L., and Quigley, J.P. (1999). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. J Biol Chem *274*, 13066-13076.

Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T.W. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 3410-3415.

Ranganathan, A.C., Nelson, K.K., Rodriguez, A.M., Kim, K.H., Tower, G.B., Rutter, J.L., Brinckerhoff, C.E., Huang, T.T., Epstein, C.J., Jeffrey, J.J., *et al.* (2001). Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H2O2-dependent ERK1/2 activation. J Biol Chem *276*, 14264-14270.

Ranjan, P., and Boss, J.M. (2006). C/EBPbeta regulates TNF induced MnSOD expression and protection against apoptosis. Apoptosis *11*, 1837-1849.

Rapic-Otrin, V., McLenigan, M.P., Bisi, D.C., Gonzalez, M., and Levine, A.S. (2002). Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation. Nucleic Acids Res *30*, 2588-2598.

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

Rapic-Otrin, V., Kuraoka, I., Nardo, T., McLenigan, M., Eker, A.P., Stefanini, M., Levine, A.S., and Wood, R.D. (1998). Relationship of the xeroderma pigmentosum group E DNA repair defect to the chromatin and DNA binding proteins UV-DDB and replication protein A. Mol Cell Biol *18*, 3182-3190.

Ravn-Haren, G., Olsen, A., Tjonneland, A., Dragsted, L.O., Nexo, B.A., Wallin, H., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., and Vogel, U. (2006). Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. Carcinogenesis *27*, 820-825.

Reiss, U., and Tappel, A.L. (1973). Fluorescent product formation and changes in structure of DNA reacted with peroxidizing arachidonic acid. Lipids *8*, 199-202.

Rhee, S.G., Yang, K.S., Kang, S.W., Woo, H.A., and Chang, T.S. (2005). Controlled elimination of intracellular H(2)O(2): regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. Antioxid Redox Signal *7*, 619-626.

Ria, F., Landriscina, M., Remiddi, F., Rosselli, R., Iacoangeli, M., Scerrati, M., Pani, G., Borrello, S., and Galeotti, T. (2001). The level of manganese superoxide dismutase content is an independent prognostic factor for glioblastoma. Biological mechanisms and clinical implications. Br J Cancer *84*, 529-534.

Ridnour, L.A., Oberley, T.D., and Oberley, L.W. (2004). Tumor suppressive effects of MnSOD overexpression may involve imbalance in peroxide generation versus peroxide removal. Antioxid Redox Signal *6*, 501-512.

Rogers, R.J., Monnier, J.M., and Nick, H.S. (2001). Tumor necrosis factor-alpha selectively induces MnSOD expression via mitochondria-to-nucleus signaling, whereas interleukin-1beta utilizes an alternative pathway. J Biol Chem *276*, 20419-20427.

Rose, A.A., and Siegel, P.M. (2006). Breast cancer-derived factors facilitate osteolytic bone metastasis. Bull Cancer *93*, 931-943.

Ryan, K.R., and Jensen, R.E. (1995). Protein translocation across mitochondrial membranes: what a long, strange trip it is. Cell *83*, 517-519.

S

Safford, S.E., Oberley, T.D., Urano, M., and St Clair, D.K. (1994). Suppression of fibrosarcoma metastasis by elevated expression of manganese superoxide dismutase. Cancer Res *54*, 4261-4265.

Salin, M.L., and McCord, J.M. (1975). Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosine leukocytes by superoxide dismutase. J Clin Invest *56*, 1319-1323.

Sant, M., Allemani, C., Berrino, F., Coleman, M.P., Aareleid, T., Chaplain, G., Coebergh, J.W., Colonna, M., Crosignani, P., Danzon, A.*, et al.* (2004). Breast carcinoma survival in Europe and the United States. Cancer *100*, 715-722.

Sarsour, E.H., Agarwal, M., Pandita, T.K., Oberley, L.W., and Goswami, P.C. (2005). Manganese superoxide dismutase protects the proliferative capacity of confluent normal human fibroblasts. J Biol Chem *280*, 18033-18041.

Sarsour, E.H., Venkataraman, S., Kalen, A.L., Oberley, L.W., and Goswami, P.C. (2008). Manganese superoxide dismutase activity regulates transitions between quiescent and proliferative growth. Aging Cell *7*, 405-417.

Sato, K., Ito, K., Kohara, H., Yamaguchi, Y., Adachi, K., and Endo, H. (1992). Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. Mol Cell Biol *12*, 2525-2533.

Sato, H., and Seiki, M. (1993). Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. Oncogene *8*, 395-405.

Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol *182*, 311-322.

Semenza, G.L. (2001). Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance. J Clin Invest *108*, 39-40.

Senga, T., Sivaprasad, U., Zhu, W., Park, J.H., Arias, E.E., Walter, J.C., and Dutta, A. (2006). PCNA is a cofactor for Cdt1 degradation by CUL4/DDB1-mediated N-terminal ubiquitination. J Biol Chem *281*, 6246-6252.

She, Q.B., Chandarlapaty, S., Ye, Q., Lobo, J., Haskell, K.M., Leander, K.R., DeFeo-Jones, D., Huber, H.E., and Rosen, N. (2008). Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. PLoS ONE *3*, e3065.

Shimoda-Matsubayashi, S., Matsumine, H., Kobayashi, T., Nakagawa-Hattori, Y., Shimizu, Y., and Mizuno, Y. (1996). Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese

superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. Biochem Biophys Res Commun *226*, 561-565.

Shiyanov, P., Hayes, S.A., Donepudi, M., Nichols, A.F., Linn, S., Slagle, B.L., and Raychaudhuri, P. (1999a). The naturally occurring mutants of DDB are impaired in stimulating nuclear import of the p125 subunit and E2F1-activated transcription. Mol Cell Biol *19*, 4935-4943.

Shiyanov, P., Nag, A., and Raychaudhuri, P. (1999b). Cullin 4A associates with the UV-damaged DNA-binding protein DDB. J Biol Chem *274*, 35309-35312.

Shringarpure, R., Grune, T., and Davies, K.J. (2001). Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. Cell Mol Life Sci *58*, 1442-1450.

Siemankowski, L.M., Morreale, J., and Briehl, M.M. (1999). Antioxidant defenses in the TNF-treated MCF-7 cells: selective increase in MnSOD. Free Radic Biol Med *26*, 919-924.

Sipe, H.J., Jr., Jordan, S.J., Hanna, P.M., and Mason, R.P. (1994). The metabolism of 17 beta-estradiol by lactoperoxidase: a possible source of oxidative stress in breast cancer. Carcinogenesis *15*, 2637-2643.

Skrzycki, M., Scibior, D., Podsiad, M., and Czeczot, H. (2008). Activity and protein level of CuZnSOD and MnSOD in benign and malignant liver tumors. Clin Biochem *41*, 91-96.

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science *235*, 177-182.

Sohal, R.S., and Brunk, U.T. (1992). Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. Mutat Res *275*, 295-304.

Sommer, D., Coleman, S., Swanson, S.A., and Stemmer, P.M. (2002). Differential susceptibilities of serine/threonine phosphatases to oxidative and nitrosative stress. Arch Biochem Biophys *404*, 271-278.

Sovak, M.A., Bellas, R.E., Kim, D.W., Zanieski, G.J., Rogers, A.E., Traish, A.M., and Sonenshein, G.E. (1997). Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. J Clin Invest *100*, 2952-2960.

Speirs, V., Carder, P.J., Lane, S., Dodwell, D., Lansdown, M.R., and Hanby, A.M. (2004). Oestrogen receptor beta: what it means for patients with breast cancer. Lancet Oncol *5*, 174-181.

Srinivasan, D., Sims, J.T., and Plattner, R. (2008). Aggressive breast cancer cells are dependent on activated Abl kinases for proliferation, anchorage-independent growth and survival. Oncogene *27*, 1095-1105.

Srivastava, S., Zou, Z.Q., Pirollo, K., Blattner, W., and Chang, E.H. (1990). Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. Nature *348*, 747-749.

St Clair, D., Zhao, Y., Chaiswing, L., and Oberley, T. (2005). Modulation of skin tumorigenesis by SOD. Biomed Pharmacother *59*, 209-214.

St Clair, D.K., and Holland, J.C. (1991). Complementary DNA encoding human colon cancer manganese superoxide dismutase and the expression of its gene in human cells. Cancer Res *51*, 939-943.

St Clair, D.K., Oberley, T.D., and Ho, Y.S. (1991). Overproduction of human Mn-superoxide dismutase modulates paraquat-mediated toxicity in mammalian cells. FEBS Lett *293*, 199-203.

St Clair, D.K., Oberley, T.D., Muse, K.E., and St Clair, W.H. (1994). Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. Free Radic Biol Med *16*, 275-282.

St Clair, D.K., Porntadavity, S., Xu, Y., and Kiningham, K. (2002). Transcription regulation of human manganese superoxide dismutase gene. Methods Enzymol *349*, 306-312.

St Clair, D.K., Wan, X.S., Oberley, T.D., Muse, K.E., and St Clair, W.H. (1992). Suppression of radiation-induced neoplastic transformation by overexpression of mitochondrial superoxide dismutase. Mol Carcinog *6*, 238-242.

Stadtman, E.R., and Levine, R.L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids *25*, 207-218.

Stern, D.F. (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases. Breast Cancer Res *2*, 176-183.

Stoehlmacher, J., Ingles, S.A., Park, D.J., Zhang, W., and Lenz, H.J. (2002). The -9Ala/-9Val polymorphism in the mitochondrial targeting sequence of the manganese superoxide dismutase gene (MnSOD) is associated with age among Hispanics with colorectal carcinoma. Oncol Rep *9*, 235-238.

Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. Front Biosci *10*, 1881-1896.

Stoyanova, T., Yoon, T., Kopanja, D., Mokyr, M.B., and Raychaudhuri, P. (2008). The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 activates nucleotide excision repair by regulating the level of p21Waf1/Cip1. Mol Cell Biol *28*, 177-187.

Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., and Hanaoka, F. (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. Cell *121*, 387-400.

Sun, Y., and Oberley, L.W. (1996). Redox regulation of transcriptional activators. Free Radic Biol Med *21*, 335-348.

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

Suresh, A., Tung, F., Moreb, J., and Zucali, J.R. (1994). Role of manganese superoxide dismutase in radioprotection using gene transfer studies. Cancer Gene Ther *1*, 85-90.

Surh, Y. (1999). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. Mutat Res *428*, 305-327.

Surmacz, E. (2000). Function of the IGF-I receptor in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia *5*, 95-105.

Surmacz, E., and Bartucci, M. (2004). Role of estrogen receptor alpha in modulating IGF-I receptor signaling and function in breast cancer. J Exp Clin Cancer Res *23*, 385-394.

Sutton, A., Khoury, H., Prip-Buus, C., Cepanec, C., Pessayre, D., and Degoul, F. (2003). The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. Pharmacogenetics *13*, 145-157.

Suzuki, N., Ishizaki, J., Yokota, Y., Higashino, K., Ono, T., Ikeda, M., Fujii, N., Kawamoto, K., and Hanasaki, K. (2000). Structures, enzymatic properties, and expression of novel human and mouse secretory phospholipase A(2)s. J Biol Chem *275*, 5785-5793.

Suzuki, Y.J., Forman, H.J., and Sevanian, A. (1997). Oxidants as stimulators of signal transduction. Free Radic Biol Med *22*, 269-285.

Svineng, G., Ravuri, C., Rikardsen, O., Huseby, N.E., and Winberg, J.O. (2008). The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. Connect Tissue Res *49*, 197-202.

T

Takada, Y., Hachiya, M., Park, S.H., Osawa, Y., Ozawa, T., and Akashi, M. (2002). Role of reactive oxygen species in cells overexpressing manganese superoxide dismutase: mechanism for induction of radioresistance. Mol Cancer Res *1*, 137-146.

Takao, M., Abramic, M., Moos, M., Jr., Otrin, V.R., Wootton, J.C., McLenigan, M., Levine, A.S., and Protic, M. (1993). A 127 kDa component of a UV-damaged DNA-binding complex, which is defective in some xeroderma pigmentosum group E patients, is homologous to a slime mold protein. Nucleic Acids Res *21*, 4111-4118.

Takimoto, R., MacLachlan, T.K., Dicker, D.T., Niitsu, Y., Mori, T., and el-Deiry, W.S. (2002). BRCA1 transcriptionally regulates damaged DNA binding protein (DDB2) in the DNA repair response following UV-irradiation. Cancer Biol Ther *1*, 177-186.

Tanaka, T., Kurabayashi, M., Aihara, Y., Ohyama, Y., and Nagai, R. (2000). Inducible expression of manganese superoxide dismutase by phorbol 12-myristate 13-acetate is mediated by Sp1 in endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol *20*, 392-401.

Tang, J., and Chu, G. (2002). Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. DNA Repair (Amst) *1*, 601-616.

Tew, K.D. (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. Cancer Res *54*, 4313-4320.

Thangapazham, R.L., Passi, N., and Maheshwari, R.K. (2007). Green tea polyphenol and epigallocatechin gallate induce apoptosis and inhibit invasion in human breast cancer cells. Cancer Biol Ther *6*, 1938-1943.

Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol *279*, L1005-1028.

Toh, Y., Kuninaka, S., Mori, M., Oshiro, T., Ikeda, Y., Nakashima, H., Baba, H., Kohnoe, S., Okamura, T., and Sugimachi, K. (2000a). Reduced expression of manganese superoxide dismutase mRNA may correlate with invasiveness in esophageal carcinoma. Oncology *59*, 223-228.

Toh, Y., Kuninaka, S., Oshiro, T., Ikeda, Y., Nakashima, H., Baba, H., Kohnoe, S., Okamura, T., Mori, M., and Sugimachi, K. (2000b). Overexpression of manganese superoxide dismutase mRNA may correlate with aggressiveness in gastric and colorectal adenocarcinomas. Int J Oncol *17*, 107-112.

Toi, M., Inada, K., Suzuki, H., and Tominaga, T. (1995). Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. Breast Cancer Res Treat *36*, 193-204.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A *76*, 4350-4354.

Trempe, G.L. (1976). Human breast cancer in culture. Recent Results Cancer Res, 33-41.

Tsan, M.F., Lee, C.Y., and White, J.E. (1991). Interleukin 1 protects rats against oxygen toxicity. J Appl Physiol *71*, 688-697.

Tsan, M.F., White, J.E., and Wong, G.H. (1992). D-factor and growth hormone enhance tumor necrosis factor-induced increase of Mn superoxide dismutase mRNA and oxygen tolerance. Cytokine *4*, 101-105.

Tsanou, E., Ioachim, E., Briasoulis, E., Damala, K., Charchanti, A., Karavasilis, V., Pavlidis, N., and Agnantis, N.J. (2004). Immunohistochemical expression of superoxide dismutase (MnSOD) anti-oxidant enzyme in invasive breast carcinoma. Histol Histopathol *19*, 807-813.

Tycko, B. (2000). Epigenetic gene silencing in cancer. J Clin Invest *105*, 401-407.

U - V

Urano, M., Kuroda, M., Reynolds, R., Oberley, T.D., and St Clair, D.K. (1995). Expression of manganese superoxide dismutase reduces tumor control radiation dose: gene-radiotherapy. Cancer Res *55*, 2490-2493.

Ursini, F., Maiorino, M., and Gregolin, C. (1985). The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Biochim Biophys Acta *839*, 62-70.

Ushio-Fukai, M., and Nakamura, Y. (2008). Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. Cancer Lett *266*, 37-52.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol *39*, 44-84.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact *160*, 1-40.

Van Remmen, H., Williams, M.D., Yang, H., Walter, C.A., and Richardson, A. (1998). Analysis of the transcriptional activity of the 5'-flanking region of the rat catalase gene in transiently transfected cells and in transgenic mice. J Cell Physiol *174*, 18-26.

Venkataraman, S., Jiang, X., Weydert, C., Zhang, Y., Zhang, H.J., Goswami, P.C., Ritchie, J.M., Oberley, L.W., and Buettner, G.R. (2005). Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells. Oncogene *24*, 77-89.

W

Wajapeyee, N., Raut, C.G., and Somasundaram, K. (2005). Activator protein 2alpha status determines the chemosensitivity of cancer cells: implications in cancer chemotherapy. Cancer Res *65*, 8628-8634.

Wan, X.S., Devalaraja, M.N., and St Clair, D.K. (1994). Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. DNA Cell Biol *13*, 1127-1136.

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

Wang, L.I., Miller, D.P., Sai, Y., Liu, G., Su, L., Wain, J.C., Lynch, T.J., and Christiani, D.C. (2001). Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. J Natl Cancer Inst *93*, 1818-1821.

Wang, M., Kirk, J.S., Venkataraman, S., Domann, F.E., Zhang, H.J., Schafer, F.Q., Flanagan, S.W., Weydert, C.J., Spitz, D.R., Buettner, G.R., *et al.* (2005). Manganese superoxide dismutase suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor. Oncogene *24*, 8154-8166.

Wang, T.C., Cardiff, R.D., Zukerberg, L., Lees, E., Arnold, A., and Schmidt, E.V. (1994). Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. Nature *369*, 669-671.

Warner, B.B., Stuart, L., Gebb, S., and Wispe, J.R. (1996). Redox regulation of manganese superoxide dismutase. Am J Physiol *271*, L150-158.

Watson, W.H., Yang, X., Choi, Y.E., Jones, D.P., and Kehrer, J.P. (2004). Thioredoxin and its role in toxicology. Toxicol Sci *78*, 3-14.

Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Poswig, A., Briviba, K., Oberley, T.D., and Scharffetter-Kochanek, K. (1999). Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies

hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloprotease-1. J Biol Chem *274*, 25869-25876.

Weydert, C., Roling, B., Liu, J., Hinkhouse, M.M., Ritchie, J.M., Oberley, L.W., and Cullen, J.J. (2003). Suppression of the malignant phenotype in human pancreatic cancer cells by the overexpression of manganese superoxide dismutase. Mol Cancer Ther *2*, 361-369.

Weydert, C.J., Waugh, T.A., Ritchie, J.M., Iyer, K.S., Smith, J.L., Li, L., Spitz, D.R., and Oberley, L.W. (2006). Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. Free Radic Biol Med *41*, 226-237.

Weydert, C.J., Zhang, Y., Sun, W., Waugh, T.A., Teoh, M.L., Andringa, K.K., Aykin-Burns, N., Spitz, D.R., Smith, B.J., and Oberley, L.W. (2008). Increased oxidative stress created by adenoviral MnSOD or CuZnSOD plus BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) inhibits breast cancer cell growth. Free Radic Biol Med *44*, 856-867.

Wispe, J.R., Warner, B.B., Clark, J.C., Dey, C.R., Neuman, J., Glasser, S.W., Crapo, J.D., Chang, L.Y., and Whitsett, J.A. (1992). Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. J Biol Chem *267*, 23937-23941.

Wittschieben, B.O., Iwai, S., and Wood, R.D. (2005). DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA. J Biol Chem *280*, 39982-39989.

Wolf, D., Schumann, J., Koerber, K., Kiemer, A.K., Vollmar, A.M., Sass, G., Papadopoulos, T., Bang, R., Klein, S.D., Brune, B., *et al.* (2001). Low-molecular-weight hyaluronic acid induces nuclear factor-kappaB-dependent resistance against tumor necrosis factor alpha-mediated liver injury in mice. Hepatology *34*, 535-547.

Wong, G.H. (1995). Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD. Biochim Biophys Acta *1271*, 205-209.

Wooster, R., and Weber, B.L. (2003). Breast and ovarian cancer. N Engl J Med *348*, 2339-2347.

Wyatt, C.A., Geoghegan, J.C., and Brinckerhoff, C.E. (2005). Short hairpin RNA-mediated inhibition of matrix metalloproteinase-1 in MDA-231 cells: effects on matrix destruction and tumor growth. Cancer Res *65*, 11101-11108.

X - Y - Z

Xanthoudakis, S., and Curran, T. (1996). Redox regulation of AP-1: a link between transcription factor signaling and DNA repair. Adv Exp Med Biol *387*, 69-75.

Xu, Y., Fang, F., Dhar, S.K., St Clair, W.H., Kasarskis, E.J., and St Clair, D.K. (2007). The role of a single-stranded nucleotide loop in transcriptional regulation of the human sod2 gene. J Biol Chem *282*, 15981-15994.

Xu, Y., Kiningham, K.K., Devalaraja, M.N., Yeh, C.C., Majima, H., Kasarskis, E.J., and St Clair, D.K. (1999a). An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. DNA Cell Biol *18*, 709-722.

Xu, Y., Krishnan, A., Wan, X.S., Majima, H., Yeh, C.C., Ludewig, G., Kasarskis, E.J., and St Clair, D.K. (1999b). Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. Oncogene *18*, 93-102.

Xu, Y., Porntadavity, S., and St Clair, D.K. (2002). Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). Biochem J *362*, 401-412.

Yan, T., Oberley, L.W., Zhong, W., and St Clair, D.K. (1996). Manganese-containing superoxide dismutase overexpression causes phenotypic reversion in SV40-transformed human lung fibroblasts. Cancer Res *56*, 2864-2871.

Yanagawa, T., Ishikawa, T., Ishii, T., Tabuchi, K., Iwasa, S., Bannai, S., Omura, K., Suzuki, H., and Yoshida, H. (1999). Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors. Cancer Lett *145*, 127-132.

Yang, J.Q., Li, S., Domann, F.E., Buettner, G.R., and Oberley, L.W. (1999). Superoxide generation in v-Ha-ras-transduced human keratinocyte HaCaT cells. Mol Carcinog *26*, 180-188.

Yeh, C.C., Wan, X.S., and St Clair, D.K. (1998). Transcriptional regulation of the 5' proximal promoter of the human manganese superoxide dismutase gene. DNA Cell Biol *17*, 921-930.

Yeldandi, A.V., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (2000). Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. Mutat Res *448*, 159-177.

Yeung, B.H., Wong, K.Y., Lin, M.C., Wong, C.K., Mashima, T., Tsuruo, T., and Wong, A.S. (2008). Chemosensitisation by manganese superoxide dismutase inhibition is caspase-9 dependent and involves extracellular signal-regulated kinase 1/2. Br J Cancer *99*, 283-293.

Yoo, H.Y., Chang, M.S., and Rho, H.M. (1999). Xenobiotic-responsive element for the transcriptional activation of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene. Biochem Biophys Res Commun *256*, 133-137.

Yoon, T., Chakrabortty, A., Franks, R., Valli, T., Kiyokawa, H., and Raychaudhuri, P. (2005). Tumor-prone phenotype of the DDB2-deficient mice. Oncogene *24*, 469-478.

Zelko, I.N., Mariani, T.J., and Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic Biol Med *33*, 337-349.

Zhang, H.J., Drake, V.J., Xu, L., Hu, J., Domann, F.E., Oberley, L.W., and Kregel, K.C. (2002a). Redox regulation of adenovirus-induced AP-1 activation by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. J Virol *76*, 355-363.

Zhang, H.J., Zhao, W., Venkataraman, S., Robbins, M.E., Buettner, G.R., Kregel, K.C., and Oberley, L.W. (2002b). Activation of matrix metalloproteinase-2 by overexpression of manganese superoxide dismutase in human breast cancer MCF-7 cells involves reactive oxygen species. J Biol Chem *277*, 20919-20926.

Zhang, Y., Zhao, W., Zhang, H.J., Domann, F.E., and Oberley, L.W. (2002c). Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. Cancer Res *62*, 1205-1212.

Zhao, Q., Barakat, B.M., Qin, S., Ray, A., El-Mahdy, M.A., Wani, G., Arafa el, S., Mir, S.N., Wang, Q.E., and Wani, A.A. (2008). The p38 mitogen-activated protein kinase augments nucleotide excision repair by mediating DDB2 degradation and chromatin relaxation. J Biol Chem *283*, 32553-32561.

Zhao, Y., Xue, Y., Oberley, T.D., Kiningham, K.K., Lin, S.M., Yen, H.C., Majima, H., Hines, J., and St Clair, D. (2001). Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor formation by modulation of activator protein-1 signaling in a multistage skin carcinogenesis model. Cancer Res *61*, 6082-6088.

Zhong, H., De Marzo, A.M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L., and Simons, J.W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. Cancer Res *59*, 5830-5835.

Zhong, W., Oberley, L.W., Oberley, T.D., and St Clair, D.K. (1997). Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. Oncogene *14*, 481-490.

Zhu, C.H., Huang, Y., Oberley, L.W., and Domann, F.E. (2001). A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. J Biol Chem *276*, 14407-14413.

Zyad, A., Benard, J., Tursz, T., Clarke, R., and Chouaib, S. (1994). Resistance to TNF-alpha and adriamycin in the human breast cancer MCF-7 cell line: relationship to MDR1, MnSOD, and TNF gene expression. Cancer Res *54*, 825-831.

RESUME

La superoxyde dismutase à Manganèse (SOD Mn ou SOD2) est une enzyme importante dans la défense antioxydante, qui semble jouer un rôle mal défini dans le développement des tumeurs selon l'expression constitutive de son gène. Cependant, les mécanismes de régulation de cette expression constitutive sont mal connus, en particulier dans les cellules tumorales mammaires. Ce travail a reposé sur la mise en évidence préalable d'une protéine, appelée la Damaged DNA Binding 2 (DDB2) protein, se fixant spécifiquement sur la région promotrice du gène *SOD2*. La DDB2 est connue pour sa participation dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides.

Dans un 1er temps, nous avons caractérisé la séquence d'ADN spécifiquement reconnue dans la région proximale du promoteur du gène *SOD2*, sur laquelle la DDB2 s'y fixe sous la forme d'un monomère, pour réguler négativement la transcription constitutive de la SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires non métastatiques de type MCF-7. Par ailleurs, la DDB2 n'est pas impliquée dans le mécanisme d'induction du gène *SOD2*, lorsque les cellules MCF-7 sont exposées à des substances inductrices. En revanche, nous avons montré que l'absence de la protéine DDB2, associée à celle du facteur de transcription AP-2α, déjà connu comme répresseur du gène *SOD2*, entraîne une expression constitutive élevée de la SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires métastatiques n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes (ER-). De plus, cette expression constitutive élevée est principalement dépendante du facteur de transcription Sp1.

Dans un 2ème temps, nous avons évalué la signification biologique de la régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn par la DDB2 dans les cellules tumorales mammaires. Nos résultats montrent que la DDB2 active la prolifération des cellules tumorales mammaires ER+, en exerçant sa régulation négative sur l'expression de la SOD Mn.

Dans un 3ème temps, nous avons cherché à montrer les conséquences sur la croissance des cellules tumorales mammaires ER-, qui surexpriment naturellement la SOD Mn. Nos résultats révèlent que l'enzyme antioxydante joue un rôle important dans les mécanismes moléculaires impliqués dans le pouvoir invasif des cellules tumorales mammaires ER-. La surexpression de la SOD Mn, associée à un taux faible des enzymes éliminant l'H_2O_2, entraînent une augmentation du pouvoir invasif déjà élevé des cellules tumorales mammaires ER-, associée une augmentation de l'activité de la métalloprotéinase 9. L'élimination, en présence d'antioxydants, de l'H_2O_2 libéré par l'activité de la SOD Mn surexprimée, entraîne une inhibition à la fois de la croissance et des capacités invasives des cellules tumorales mammaires ER-.

L'ensemble de ce travail contribue à mieux comprendre l'importance de la SOD Mn et du mécanisme de régulation de son gène dans la croissance et l'invasion tumorales. Ainsi ce travail révèle également la SOD Mn et la DDB2 comme de potentiels facteurs prédictifs de la progression tumorale mammaire. Enfin, la découverte de la nouvelle activité biologique de la DDB2 ouvre un vaste champ de perspectives intéressantes en cancérologie mammaire.

MOTS CLES: Superoxyde dismutase à manganèse (SOD Mn) ; Damaged-DNA binding 2 (DDB2) ; cancer du sein ; espèces actives de l'oxygène (EAO) ; croissance tumorale ; invasion tumorale ; régulation génique.

SUMMARY

Manganese superoxide dismutase (Mn SOD or SOD2) is an important enzyme in the antioxidizing defence, which seems to play an unclear role in the cancer development, according to the constitutive expression of its gene. However, the regulation of this constitutive expression is not totally known, particularly in the breast cancer cells. This work is based on a preliminary revealing that a protein, called Damaged DNA Binding 2 (DDB2), specifically binds the *SOD2* gene promoter. The DDB2 is known for its involvement in the nucleotide excision repair.

At first step, we characterized the specific DNA sequence recognized in the proximal area of the *SOD2* gene promoter, on which a DDB2 monomer binds, in order to regulate negatively the Mn SOD transcription in the MCF-7 non metastatic breast cancer cells. Besides, DDB2 is not involved in the mechanism of *SOD2* gene induction, when MCF-7 cells are exposed to induced substances. However, we showed that the lack of the DDB2 protein, associated with the lack of the AP-2α transcription factor, already known as a repressor of the *SOD2* gene, lead to a high Mn SOD constitutive expression in the metastatic breast cancer cells. Furthermore, this high constitutive expression is mainly dependent of the Sp1 transcription factor.

Secondly, we estimated the biological meaning of the regulation of the Mn SOD constitutive expression by the DDB2 in the breast cancer cells. Our results show that the DDB2 activates the positive ER breast cancer cell proliferation, by exercising its negative regulation on the Mn SOD expression.

Thirdly, we tried to show the consequences on the negative ER breast cancer cell growth, which naturally and highly express the Mn SOD. Our results reveal that the antioxidizing enzyme plays an important role in the molecular mechanisms involved in the invasive capacities of the negative ER breast cancer cells. The high Mn SOD expression, associated in a decrease of the H_2O_2 detoxifying enzymes expression, enhance the negative ER breast cancer cell invasion and an increase of the matrix metallopeptidase-9 activity. The H_2O_2 elimination, with specific antioxidants, decreases both negative ER breast cancer cell growth and invasive capacities.

This whole work contributes to better understand the Mn SOD importance and the mechanism of its gene regulation, in the tumoral growth and invasion. This work also reveals the Mn SOD and DDB2 as potential predictive factors of the breast cancer progress. Finally, the discovery of this new DDB2 biological activity opens a huge field of interesting perspectives in breast cancer research.

KEY WORDS: Manganese superoxide dismutase (Mn SOD); Damaged-DNA binding 2 (DDB2); breast cancer; reactive oxygen species (ROS) ; cancer growth ; tumoral invasion; transcriptional regulation.