



HAL
open science

Rôle de la superoxyde dismutase à manganèse et de la protéine damaged DNA binding 2 dans la croissance tumorale mammaire

Zilal Kattan

► **To cite this version:**

Zilal Kattan. Rôle de la superoxyde dismutase à manganèse et de la protéine damaged DNA binding 2 dans la croissance tumorale mammaire. Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10040 . tel-01748404

HAL Id: tel-01748404

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748404>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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 1

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

THESE

Présentée par

Zilal KATTAN

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY 1
EN BIOLOGIE CELLULAIRES ET NUTRITION**

**ROLE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE A
MANGANESE ET DE LA PROTEINE DAMAGED
DNA BINDING 2 DANS LA CROISSANCE
TUMORALE MAMMAIRE**

Soutenance publique le 29 juin 2009

Membres du jury

Rapporteurs :

Pr Xuefen LE BOURHIS
Dr Olivier MICHEAU

INSERM U908/ Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq
INSERM U866/ Université de Bourgogne, Dijon

Examineurs :

Pr Jean-Louis MERLIN
Dr Joseph ABECASSIS

Unité de Biologie des Tumeurs/ CAV, Vandoeuvre lès Nancy
Centre Anticancéreux Paul Strauss, Strasbourg

Directeur de thèse :

Pr Philippe BECUWE

EA SIGRETO - UHP Nancy 1, Vandoeuvre lès Nancy

Unité de recherche en cancérologie, EA SIGRETO
Faculté des Sciences et Techniques – 54506 Vandoeuvre-Lès-Nancy

Université Henri Poincaré, Nancy 1

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

THESE

Présentée par

Zilal KATTAN

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY 1
EN BIOLOGIE CELLULAIRES ET NUTRITION**

**ROLE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE A
MANGANESE ET DE LA PROTEINE DAMAGED
DNA BINDING 2 DANS LA CROISSANCE
TUMORALE MAMMAIRE**

Soutenance publique le 29 juin 2009

Membres du jury

Rapporteurs :

Pr Xuefen LE BOURHIS
Dr Olivier MICHEAU

INSERM U908/ Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq
INSERM U866/ Université de Bourgogne, Dijon

Examineurs :

Pr Jean-Louis MERLIN
Dr Joseph ABECASSIS

Unité de Biologie des Tumeurs/ CAV, Vandoeuvre lès Nancy
Centre Anticancéreux Paul Strauss, Strasbourg

Directeur de thèse :

Pr Philippe BECUWE

EA SIGRETO - UHP Nancy 1, Vandoeuvre lès Nancy

Unité de recherche en cancérologie, EA SIGRETO
Faculté des Sciences et Techniques – 54506 Vandoeuvre-Lès-Nancy

REMERCIEMENTS

Quel bonheur d'écrire cette partie!!!! Tout d'abord parce que cela me permet de remercier les personnes sans qui ces années n'auraient pas été aussi belles. Mais aussi parce que ces quelques lignes viennent du cœur et ne suivent pas de logique scientifique...

*La première personne que j'aimerais remercier et dédier cette thèse est mon mari **Mustafa Beesh** sans lequel cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Ton amour, ta compréhension, ta patience, tes encouragements et ta tendresse m'ont permis d'en arriver là, merci pour ta présence à mes côtés, merci pour ton soutien à chaque instant pendant les bons moments comme pendant les autres. Mon âme tu es toute ma vie. Mustafa je t'aime.*

*A mon petit ange **Joud**,*

Joud, l'amour de ma vie (à égalité avec ton papa), rien que ton sourire me remplit de joie et me fait oublier les problèmes, merci pour ton innocence.

*Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, le professeur **Philippe Becuwe** qui m'a accompagné tout au long de ma thèse, plus de quatre années de travail mais aussi plus de quatre années d'amitié (merci Philippe pour tout ce que tu m'as appris. Merci pour ton encadrement scientifique et technique, comme pour les discussions scientifiques, merci pour ton soutien humain et ta disponibilité, pour la confiance que tu m'as accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral.*

*Je voudrais aussi exprimer ma très vive reconnaissance et mes sentiments respectueux à Monsieur le professeur **Michel Dauça** pour son écoute et ses conseils avisés, sa grande disponibilité et accessibilité ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée, (Monsieur Michel Dauça, j'ai été extrêmement sensible à vos qualités humaines et merci d'avoir été comme un père pour moi).*

*J'exprime ma profonde gratitude à Madame le Pr **Xuefen Le Bourhis**, et à Monsieur le Dr **Olivier Micheau** qui m'ont fait le plaisir d'accepter de juger mon travail de thèse et d'assumer la tâche de rapporteur.*

*J'aimerais exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Pr **Jean-Louis Merlin** qui a accepté d'être le président du jury et examiner ce travail, et je remercie très sincèrement Monsieur le Dr **Josef Abecassis** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à Dr **Lionel Domenjoud** pour sa gentillesse et ses explications très pédagogiques, pour toutes les discussions que nous avons partagé (merci Lionel pour ta bonne humeur et ton extrême gentillesse).*

*Je tiens également à remercier Dr **Nadège Touche**, Dr **Stéphanie Grandemange**, pour leurs encouragements et leur soutien, mais aussi et pour avoir été de très bon conseil lors de la préparation de mon oral de thèse.*

Mes remerciements vont également à mon pays, la Syrie, notamment l'Université Al Baath, et la Faculté vétérinaire pour leur soutien financier sans lequel ce travail n'aurait jamais vu le jour.

J'adresse mes remerciements au centre Alexi Vautrin : Notamment, à Pr Jean-Louis MERLIN, Sophie Marchal, Carole Ramacci, Angès Leroux

Mes reconnaissants remerciements à Madame Sophie Marchal pour ses conseils, sa disponibilité concernant la cytométrie en flux (merci Sophie pour nos discussions enrichissantes que nous avons eues, notamment sur le Savon d'Alep).

Un grand grand grand merci à Emilie Brunner, Vanessa Minig, Annie Stoekel, Hossam Murad, Murielle Guillaume, pour leur amitié, leur amour, leur soutien, mais aussi pour les bons moments que nous avons passés ensemble durant ces années (Emilie, merci d'avoir été avec moi surtout pendant ma grossesse, Vanessa merci pour tous les moments amicaux passés ensemble, Annie un grand merci d'avoir accepté de garder ma fille le jour de ma soutenance, Hussam merci pour tes conseils, Murielle merci pour ta bonne humeur).

L'ambiance au laboratoire a été excellente et ce notamment grâce aux autres amis qu'ont été Vanessa Besancenot, Nathalie Degousee, Najat Ouzzine, Marie Ennen, Bérénice Schaerlinger, Sylvie Laine, Cathy Fiatte. Merci à vous tous.

Je tiens également à remercier mes amis à Strasbourg, notamment, Madame Michèle Bettembourg, ma voisine Claudia Stegmaier, Madame et Monsieur Moskal, Madame Catherine Louveau, pour leur compréhension et leur soutien.

Merci pour tous les moments passés ensemble au travail et en dehors. Je vous aime tous. Je vous exprime toute mon amitié.

Finalement, Je voulais remercier du fond de cœur et je dédie cette thèse à ma famille en Syrie et notamment :

A Maman

Je te dois tout, tu m'as toujours soutenue et laissée libre de mes choix dans mon orientation, merci pour ton amour et ta confiance. Grace à toi je suis là.

*A mon oncle **Khaled** (frère de ma mère)*

Merci Khalo pour tous, merci pour ton amour, pour ton amitié, je t'aime khalo.

Un grand merci à mon frère et ma sœur, merci à nos souvenirs d'enfance, je vous aime fort.

Mes remerciements vont aussi à tout le reste de ma famille et à celle de mon mari ainsi qu'à nos amis, qu'ils soient en Syrie et en France, et je sais qu'ils sont nombreux. Merci pour votre amour et vos encouragements.

A mon père et ma grand- mère

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS

ABREVIATIONS

1	INTRODUCTION.....	17
2	ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
2.1	LE CANCER DU SEIN.....	19
2.1.1	<i>Généralité.....</i>	19
2.1.2	<i>Les différents types de tumeurs mammaires.....</i>	19
2.1.2.1	Les cancers du sein in-situ	20
2.1.2.2	Les carcinomes invasifs (infiltrants)	21
2.1.2.3	Les autres tumeurs malignes du sein.....	21
2.1.2.4	Les métastases	23
2.1.3	<i>Les facteurs de risques de cancer du sein.....</i>	23
2.1.3.1	Le sexe féminin	23
2.1.3.2	L'âge de la femme à la première grossesse.....	23
2.1.3.3	Un âge avancé	23
2.1.3.4	La durée de vie génitale	23
2.1.3.5	Les prédispositions génétiques.....	23
2.1.3.6	Les modifications du mode de vie des femmes.....	24
2.1.4	<i>Les principaux marqueurs biologiques du cancer du sein.....</i>	24
2.1.5	<i>La carcinogenèse mammaire</i>	26
2.1.5.1	Les altérations génétiques dans le cancer du sein	28
2.1.5.2	Les principaux signaux de prolifération des cellules tumorales mammaires.....	29
2.1.5.2.1	Les œstrogènes	29
2.1.5.2.2	La progestérone	32
2.1.5.2.3	Les facteurs de croissance de la famille des EGF et de l'insuline	32
2.1.5.3	La dérégulation du cycle cellulaire	34
2.1.5.3.1	Les différentes phases du cycle cellulaire.....	34
2.1.5.3.2	Le point de restriction G1/S	35
2.1.5.3.3	Le point de restriction G2/M.....	37
2.1.5.4	La résistance à l'apoptose	37
2.1.5.5	La progression tumorale dans le cancer du sein.....	39
2.2	LES ESPECES ACTIVES DE L'OXYGENE ET LES DEFENSES ANTIOXYDANTES DANS LE CANCER.....	42
2.2.1	<i>Les différentes espèces actives de l'oxygène (EAO)</i>	42
2.2.2	<i>Les défenses antioxydantes.....</i>	46
2.2.2.1	Les protéines enzymatiques éliminant les EAO.....	47
2.2.2.1.1	Les superoxydes dismutases.....	47
2.2.2.1.2	La catalase (CAT)	48
2.2.2.1.3	Les glutathions peroxydases.....	48
2.2.2.1.4	Les peroxyrédoxines	50
2.2.2.2	Les autres protéines et molécules antioxydantes.....	51

2.2.2.3	Les protéines de réparation des dommages oxydatifs.....	51
2.2.2.4	La régulation des défenses antioxydantes	52
2.2.3	<i>Le rôle des EAO dans la transformation cellulaire</i>	54
2.2.4	<i>Le rôle des EAO et des défenses antioxydantes dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales</i>	56
2.2.4.1	La production des EAO dans les cellules tumorales	56
2.2.4.2	Rôle des EAO dans la prolifération et la survie des cellules tumorales.....	57
2.2.4.3	Rôle des EAO dans la migration et l'invasion des cellules tumorales.....	59
2.2.4.4	Rôle des EAO dans l'angiogenèse tumorale	62
2.2.5	<i>Rôle des défenses antioxydantes dans l'action des EAO sur les voies de signalisation</i>	63
2.3	LA SUPEROXYDE DISMUTASE DEPENDANTE DU MANGANESE (SOD MN OU SOD2).....	66
2.3.1	<i>Structure de la SOD Mn</i>	66
2.3.2	<i>Structure et régulation du gène de la SOD Mn</i>	66
2.3.2.1	Structure du gène.....	66
2.3.2.2	Régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn.....	66
2.3.2.3	Régulation de l'expression induite de la SOD Mn.....	67
2.3.2.4	Régulation post-transcriptionnelle de la SOD Mn	69
2.3.2.5	Les voies de transduction de la régulation de l'expression de la SOD Mn..	70
2.3.3	<i>Rôles biologiques de la SOD Mn dans les cellules</i>	70
2.3.4	<i>Rôle de la SOD Mn dans le cancer</i>	71
2.3.4.1	Expression de la SOD Mn dans les cellules tumorales	72
2.3.4.2	Régulation de l'expression de la SOD Mn dans les cellules tumorales	72
2.3.4.3	Rôle de la SOD Mn dans la prolifération des cellules tumorales	74
2.3.4.4	Rôle de la SOD Mn dans l'invasion tumorale.....	78
2.3.4.5	Rôle de la SOD Mn dans l'angiogenèse tumorale	78
2.3.5	<i>Rôle de la SOD Mn dans la résistance aux traitements anticancéreux</i>	79
2.3.6	<i>Rôle de la SOD Mn dans le cancer du sein</i>	81
2.3.6.1	Expression de la SOD Mn dans les cancers du sein.....	81
2.3.6.2	Régulation de l'expression du gène SOD2 dans les cellules tumorales mammaires	82
2.3.6.3	La SOD Mn et la résistance aux traitements anticancéreux dans les cellules tumorales mammaires	83
2.4	LA PROTEINE DAMAGED DNA-BINDING 2 (DDB2).....	84
2.4.1	<i>Structure du gène et de la protéine DDB2</i>	84
2.4.2	<i>Importance biologique du complexe DDBP</i>	85
2.4.3	<i>Rôle biologiques de la DDB2</i>	86
2.4.3.1	Réparation de l'ADN endommagé par les UV.....	86
2.4.3.2	Remodelage de la chromatine	90
2.4.3.3	Régulation du cycle cellulaire	91
2.4.3.4	Activité suppresseur de tumeur	91
2.4.3.5	Régulation de la transcription	92
3	OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE.....	93
4	RESULTATS	96
4.1	IMPLICATION DE LA SOD MN DANS LA CROISSANCE ET LES PROPRIETES INVASIVES DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES HUMAINES OESTROGENES-INDEPENDANTES	96
4.1.1	<i>Introduction</i>	96
4.1.2	<i>Résultats obtenus</i>	96
4.1.3	<i>Conclusions</i>	97

4.2	ROLE DE LA DDB2 DANS LA CROISSANCE TUMORALE MAMMAIRE.....	99
4.2.1	<i>Introduction</i>	99
4.2.2	<i>Résultats obtenus</i>	99
4.2.2.1	Etude de l'expression de DDB2 dans les lignées de cellules tumorales et dans les tumeurs mammaires.....	99
4.2.2.2	Développement des modèles cellulaires transgéniques	102
4.2.2.3	Rôle de la DDB2 dans la prolifération cellulaire	104
4.2.2.4	Rôle de la DDB2 dans la régulation du cycle cellulaire	105
4.2.3	<i>Conclusions</i>	107
5	DISCUSSION GENERALE	110
5.1	LE ROLE DE LA SOD Mn DANS LA CROISSANCE TUMORALE MAMMAIRE.....	110
5.1.1	<i>Implication de la SOD Mn dans la prolifération des cellules tumorales mammaires</i>	110
5.1.2	<i>Implication de la SOD Mn dans la migration des cellules tumorales mammaires</i> 113	
5.1.3	<i>Régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn</i>	115
5.2	LE ROLE DE LA DDB2 DANS LA CROISSANCE TUMORALE MAMMAIRE.....	116
5.2.1	<i>Surexpression du gène DDB2 dans les cellules tumorales mammaires ER positives</i>	116
5.2.2	<i>Rôle de la DDB2 dans la prolifération cellulaire</i>	117
5.2.3	<i>Relation entre la DDB2 et la réplication de l'ADN</i>	118
5.2.4	<i>La DDB2 : une nouvelle oncoprotéine dans le cancer du sein ?</i>	119
5.2.5	<i>Intérêt clinique de la DDB2</i>	120
5.3	RELATION ENTRE LA DDB2, LA SOD Mn ET LA CROISSANCE TUMORALE MAMMAIRE	121
6	CONCLUSIONS	124
7	PERSPECTIVES.....	126
8	REFERENCES.....	128
9	ANNEX	150

TABLE DES ILLUSTRATION

FIGURE 1 : REPRESENTATION DE LA GLANDE MAMMAIRE	20
FIGURE 2 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES TUMEURS DE LA GLANDE MAMMAIRE.	22
FIGURE 3 : LES ETAPES DE TRANSFORMATION DANS LA CANCEROGENESE MAMMAIRE.....	27
FIGURE 4 : LES DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUANT LE RECEPTEUR AUX OESTROGENES (R).	31
FIGURE 5 : VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE ACTIVEES PAR L'EGF (EPIDERMAL GROWTH FACTOR)	34
FIGURE 6 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE ET DES ACTEURS MOLECULAIRES INTERVENANTS.....	36
FIGURE 7 : SCHEMA SIMPLIFIE DES VOIES DE REGULATION DE L' APOPTOSE.....	39
FIGURE 8 : TRANSFORMATION DU STROMA AU COURS DE L'EVOLUTION TUMORALE.	40
FIGURE 9 : LES DIFFERENTES PATHOLOGIES DANS LESQUELLES LES EAO SONT IMPLIQUEES. ...	43
FIGURE 10 : PRODUCTION MITOCHONDRIALE ET PRISE EN CHARGE DE L' ANION SUPEROXYDE. .	45
FIGURE 11 : CYCLE OXYDO-REDUCTEUR DU GLUTATHION	49
FIGURE 12: LE SYSTEME DE REGENERATION DES PEROXYREDOXINES PAR LES THIOREDOXINES	50
FIGURE 13 : FACTEURS DE TRANSCRIPTION RECRUTES SUR L' ANTIOXYDANT RESPONSE ELEMENT OU DANS DES CONDITIONS NORMALES OU LORS D'UN STRESS OXYDANT.	53
FIGURE 14 : ORIGINES ET CIBLES INTRACELLULAIRES DES EAO	54
FIGURE 15 : VOIS DE SIGNALISATION DES MAPK INDUITE PAR LES EAO	58
FIGURE 16 : REPRESENTATION DU MODE D' ACTION DU COMPLEXE NF-kB DANS LA TRANACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION DE GENES SOUS SA DEPENDANCE, SUITE A DES SIGNAUX EXTRACELLULAIRES.	60
FIGURE 17 : ACTIVATION OXYDATIVE DE LA METALLOPROTEASE-1 (MMP-1) ET CONTROLE REDOX DE LA SIGNILISATION CELLULAIRE MENANT A L' ACTIVATION DES MMP	61
FIGURE 18 : LOCALISATION SUR LE PROMOTEUR DU GENE DE LA SOD Mn DES SITES DE FIXATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION REGULANT L' EXPRESSION CONSTITUTIVE (Sp1, AP-2A) OU INDUITE PAR DIVERSES SUBSTANCES (TNFA, IL-1B, ESTERS DE PHORBOLS) DE LA SOD Mn.....	69
FIGURE 19 : MECANISMES MOLECULAIRES MIS EN JEU <i>IN VITRO</i> DANS LES CELLULES TUMORALES AYANT LA SOD Mn FAIBLEMENT EXPRIMEE.	76
FIGURE 20 : MECANISMES POSSIBLES CONDUISANT A UNE EXPRESSION BASALE ELEVEE DE LA SOD Mn DANS CERTAINES CELLULES CANCEREUSES.....	77
FIGURE 21 : ROLE POSSIBLE DE LA SOD Mn DANS L' INVASION TUMORALE	79
FIGURE 22 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DU GENE ET DE LA PROTEINE DDB2 HUMAINE.....	85
FIGURE 23 : MECANISME DE REPARATION PAR EXCISION DE NUCLEOTIDE (NER).....	87
FIGURE 24 : : PROCESSUS D'UBIQUITINYLATION DE DDB2 PAR LA CULLINE-4A LORS DE LESIONS SUR L' ADN PROVOQUEES PAR UNE IRRADIATION.....	89
FIGURE 25 : A. PRESENTATION DE LA LOCALISATION DE LA DDB1 ET DE LA DDB2 PAR L' IMMUNOFLUORESCENCE. B. ANALYSE PAR WESTERN BLOT.	101
FIGURE 26 : ANALYSE PAR WESTERN BLOTTING.....	103
FIGURE 27 : A. CARTE DU VECTEUR PLASMIDIQUE pSIRN/U6/DDB2-siRNA. B, C. PRESENTATION DE L' INHIBTION DE LA SUREXPRESSION DE LA DDB2 DANS LES CELLULES	

MCF-7 TRANSFECTEES AVEC LE PLASMIDE A L'ORIGINE DES ARNI PAR PCR ET WESTERN BLOT.....	104
FIGURE 28 : PRESENTATION L'AGENCEMENT DES CELLULES MCF-7 TEMOINS (WT, CONTROL) ET LES CELLULES MCF-7 DDB2 siRNA CL.2, CL.3 EN CULTURE.....	106
FIGURE 29 : RELATION ENTER LA DDB2, L'EXPRESSION DE LA SOD Mn ET LA CROISSANCE TUMORALE MAMMAIRE	125

ABBREVIATIONS

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 messenger
• ARNT	➤ Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
• AP-1	➤ Activator protein-1
• AP-2	➤ Activator protein-2
• ASK-1	➤ Apoptosis signal-regulating kinase-1
• ATF-1	➤ Activating transcription factor-1
• ATM	➤ Ataxia-Telangiectasia-Mutated
• ATP	➤ Adénosine triphosphate
• ATR	➤ Ataxia-Telangiectasia 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	➤ Cytochrom P450 17 et 19

D

• dATP	➤ Désoxyadénosine triphosphate
• DCAF	➤ DDB1 and Cul-4A-associated factors
• dCTP	➤ Désoxycytidine triphosphate
• DDB1	➤ Damaged DNA-binding 1
• DDB2	➤ Damaged DNA-binding 2
• DDBP	➤ Damaged DNA-binding protein
• dGTP	➤ Désoxyguanine triphosphate
• DHFR	➤ Dihydrofolate réductase
• DMSO	➤ Diméthylsulfoxyde
• dNTP	➤ Déoxynucléotides triphosphates
• dTTP	➤ Désoxythymidine 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 oestrogènes
• Egr-1	➤ Early growth factor-1
• ERE	➤ Estrogen Response Element
• ERK	➤ Extracellular Regulated Kinases

F

• FADH ₂	➤ Flavine adenine 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
• GST	➤ Glutathion S-transferases
• GSTM1	➤ Glutathion S-transferase M1
• GSTP1	➤ Glutathion S-transferase Pi
• cGPX	➤ Glutathion peroxydase cytosolique
• GPX	➤ Glutathion peroxydase
• GPX1	➤ Glutathion peroxydase mitochondrial

H

• H ₂ O	➤ Eau
• H ₂ O ₂	➤ Peroxyde d'hydrogène
• HCl	➤ Acide chlorhydrique
• HER	➤ Human Epidermal growth factor Receptor

• HER2/neu	➤ Human Epidermal growth factor Receptor 2
• HIF	➤ Hypoxia Inducible factor

I

• IAP-1	➤ Inhibition 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

J, K, L

• JNK	➤ c-Jun N-terminal kinase
• KCl	➤ Chlorure de potassium
• kDa	➤ Kilo Dalton
• Keap 1	➤ Kelch-like ECH-associated protein 1
• Luc	➤ Luciférase

M

• MAPK	➤ Mitogen-Activated Protein Kinase
• 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
• MT	➤ Métallothionéine

N, O

• NAC	➤ N-acétyl-L-cystéine
• NaCl	➤ Chlorure de sodium
• NaOH	➤ Hydroxyde de sodium
• NADP	➤ Nicotinamide adenine dinucléotide Phosphate oxydée
• NADPH	➤ Nicotinamide adenine 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
• ONOO-	➤ Peroxynitrites

P

• PARP	➤ Poly-ADP-ribose polymerase
• pb	➤ paire de bases
• PCNA	➤ Prolifération Cell Antigen
• PCR	➤ Réaction de polymérisation en chaîne
• PI3K	➤ Phosphoinositol-4,5-bisphosphate
• PTEN	➤ Phosphatase and TENsin homolog

R, S

• RPA	➤ Facteur de replication A
• RT-PCR	➤ Transcription inverse
• siRNA	➤ Small interfering
• SOD Cu/Zn	➤ Superoxyde dismutase à cuivre et zinc intracellulaire

ou SOD1	
• SOD Mn ou SOD2	➤ Superoxyde dismutase à manganèse mitochondriale
• Sp1	➤ Specificity protein 1
• STAGA	➤ SPT3/TAF9/GNC5/acetyltransférase

T, U, V, X

• TP53	➤ Tumor Protein 53
• Trx	➤ Thiorédoxine
• TrxR	➤ Thiorédoxine Réductase
• UV	➤ Ultraviolets
• VEGF	➤ Vascular endothelial growth factor
• XP	➤ Xeroderma pigmentosum

1 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 et environ 373 000 décès enregistrés dans le monde, 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 au pouvoir métastatique et à l'échappement aux thérapies anticancéreuses de certaines cellules tumorales mammaires. A l'heure actuelle, peu de protéines mises en évidence, ainsi que la régulation de leur activité, ne permettent d'expliquer la progression des cellules tumorales mammaires vers un état prolifératif et/ou invasif.

Dans le laboratoire d'accueil, une des thématiques de recherche consiste à identifier de nouveaux marqueurs moléculaires, qui jouent un rôle dans le développement des tumeurs mammaires. Dans ce sens, une analyse protéomique récente a permis de mettre en évidence la surexpression de deux protéines dans des lignées tumorales mammaires et sur lesquelles l'intérêt s'est porté dans le cadre de cette thèse. Il s'agit de la superoxyde dismutase mitochondriale (SOD Mn), une enzyme antioxydante, et la protéine DNA-Damaged Binding 2 (DDB2). La participation de la SOD Mn dans le développement des tumeurs est actuellement mal comprise et dépend de l'origine de la cellule tumorale, ainsi que de la régulation de l'expression constitutive de son gène. Par contre, l'implication biologique de la DDB2 dans la croissance tumorale n'a jamais été décrite dans la littérature.

CHAPITRE 1

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

2 ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Le cancer du sein

2.1.1 Généralité

Le cancer du sein se développe à partir des unités ducto-lobulaires, qui produisent le lait (l'unité ducto-lobulaire est constituée par un petit canal situé à l'extérieur et à l'intérieur de chaque globule et se terminant par un acini. Cet ensemble est sensible à l'inhibition hormonale de l'organisme) (**Figure 1**).

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers féminins. Dans le monde, plus de 1 050 000 nouveaux cas de cancer du sein surviennent chaque année, dont plus de 580 000 dans les pays développés (Europe de l'ouest, Amérique du nord) où il est plus fréquent qu'en Afrique ou en Asie. Il est responsable chaque année de plus de 400 000 décès de femmes. En France, il représente 36,7% de l'ensemble des nouveaux cas de cancer chez la femme. On estime qu'en 2005, 49 814 nouveaux cas y ont été diagnostiqués et 11 637 décès ont été liés à ce cancer. Entre 1980 et 2000, le nombre de nouveaux cas a presque doublé, dans le même temps la mortalité n'a que très peu augmenté grâce à l'amélioration des thérapeutiques. Plus de 50 % des cancers sont observés après 65 ans, près de 10 % avant 35 ans.

Aujourd'hui, le taux global de survie relative à 5 ans après le diagnostic est de 85 %. Il faut noter que le cancer du sein peut survenir aussi chez l'homme, mais il est rare et environ 200 fois moins fréquent que chez la femme (Sources : Institut National Du Cancer 2009).

2.1.2 Les différents types de tumeurs mammaires

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.

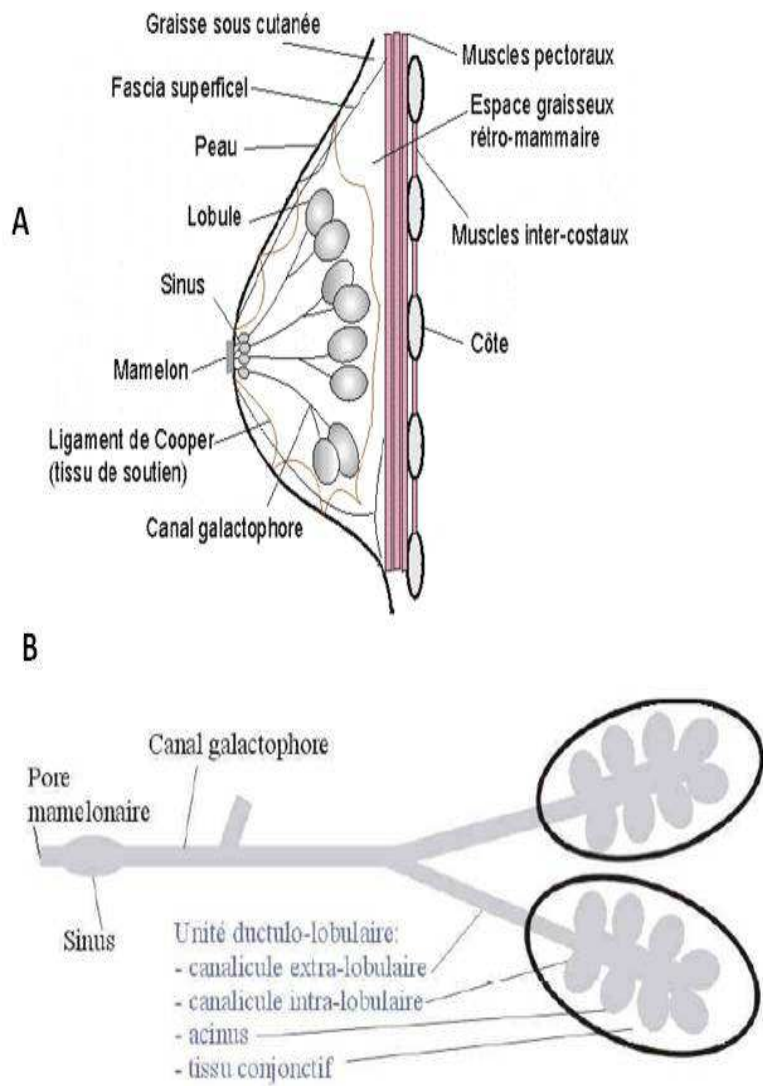


Figure 1 : Représentation de la glande mammaire

A. Anatomie et structure de la glande mammaire. **B.** Schéma de l'arbre galactophorique. Les deux images proviennent du site Internet :

<http://home.tiscali.be/salvatore.murgo/anatomie.htm>

2.1.2.1 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.

2.1.2.2 Les carcinomes invasifs (infiltrants)

Le carcinome canalaire invasif 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 fibreux, plus ou moins hyalinisé, et peut être le siège de remaniements (infiltrat inflammatoire, microcalcifications...) (**Figure 2**).

Le carcinome lobulaire invasif représente 4% des carcinomes invasifs. Ces tumeurs sont généralement mal limitées, difficilement mesurables et reconnues qu'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 2**).

Les carcinomes mucineux ou colloïde muqueux surviennent plutôt chez la femme âgée et représentent 1% des carcinomes mammaires invasifs. Cette tumeur bien délimitée est d'aspect translucide. Les cellules sont pauvres en mitose et disposées en lobules ou réalisent des tubes au sein de plages de mucus (**Figure 2**).

2.1.2.3 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.

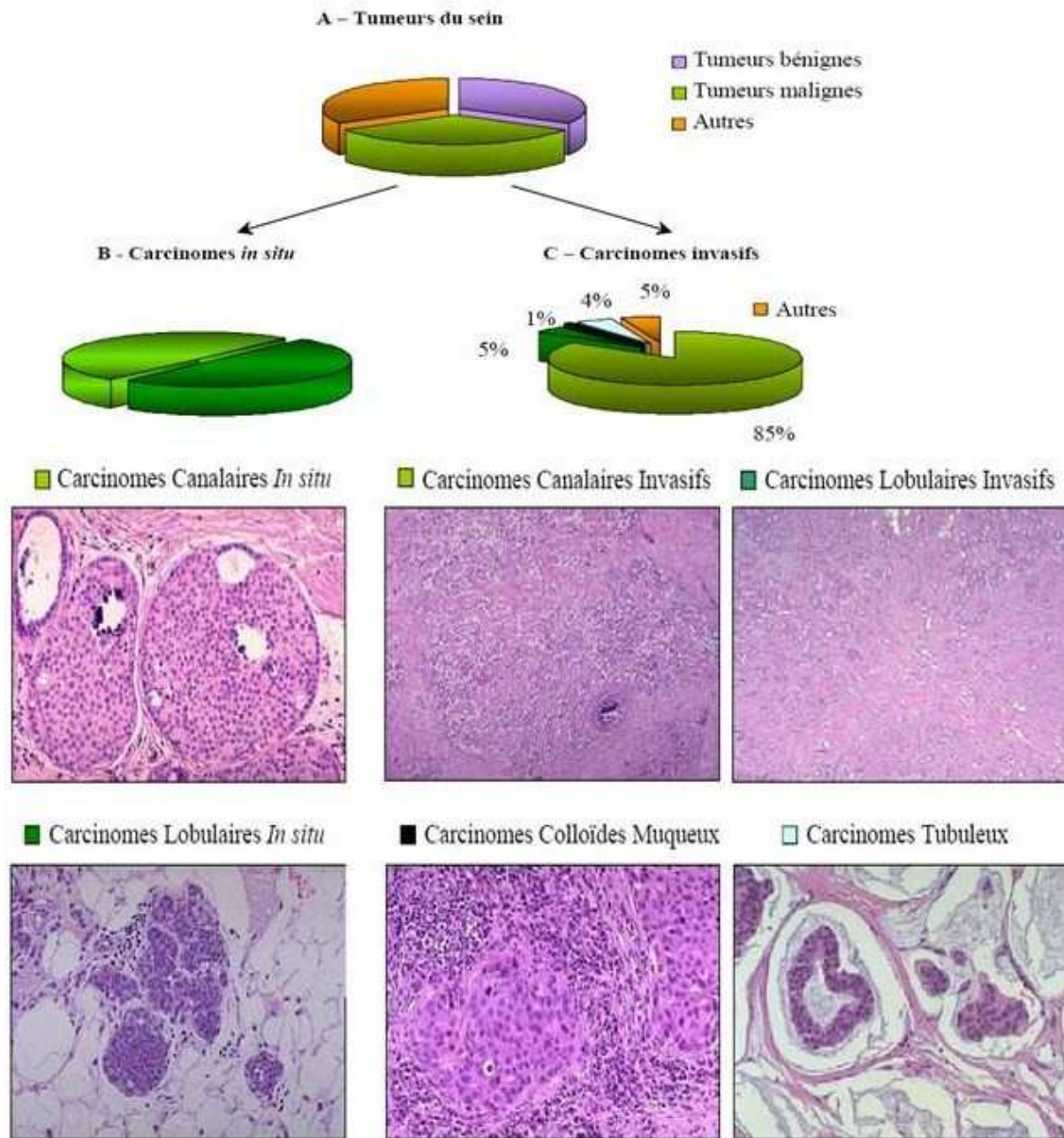


Figure 2 : Représentation des différentes tumeurs de la glande mammaire.

A. Schéma des principales tumeurs observées chez les femmes. Cette représentation ne tient pas compte des proportions de chaque catégorie de tumeurs. B. Diagramme représentant les diverses classes des carcinomes *in situ*. C. Diagramme représentant en pourcentage les classe des carcinomes invasifs avec comme représentant majeur les carcinomes canauxiaux invasifs. Microphotographies montrant les aspects histologiques des différentes tumeurs mammaires, qui proviennent du site Internet (Web Path) :

<http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/BREAST/BREAST.html>

2.1.2.4 Les métastases

Les métastases mammaires sont rares, survenant généralement à un stade tardif de l'évolution de la maladie. Les tumeurs le 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.

2.1.3 Les facteurs de risques de cancer du sein

2.1.3.1 Le sexe féminin

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

2.1.3.2 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 précédents 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.

2.1.3.3 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).

2.1.3.4 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 liées à un risque légèrement élevé de cancer du sein (Brinton *et al.*, 1988; Kvale et Heuch, 1988).

2.1.3.5 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* (*BR*east *C*ancer *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, car elles 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 et TENsin homolog* (maladie de Cowden) (Liaw *et al.*, 1997a; Srivastava *et al.*, 1990).

2.1.3.6 Les modifications du mode de vie des femmes

Le tabagisme, le stress, les traitements hormonaux, l'obésité, une consommation d'alcool régulière, ou encore les rayons ionisants, sont des facteurs qui participeraient au développement d'un cancer du sein. Nous reviendrons plus loin sur le lien entre le facteur tel que les hormones oestrogéniques données lors de traitements contraceptifs et la croissance des cellules tumorales mammaires.

2.1.4 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 de *HER2*.

Parmi les récepteurs hormonaux, le récepteur aux œstrogènes (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 (Henttu *et al.*, 1997). Il en existe deux isoformes, ER α et ER β . 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 œstrogènes, reflétant ainsi la bonne fonctionnalité des récepteurs aux œstrogènes (Giangrande *et al.*, 1997). L'expression des récepteurs aux œstrogènes permet de proposer une stratégie thérapeutique appelée hormonothérapie, qui vise à proposer aux patientes un médicament inhibant soit la biosynthèse endogène d'œstrogènes, correspondant à la catégorie médicamenteuse des antiaromatases, 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+ » (Iglehart *et al.*, 1990; Slamon *et al.*, 1987). 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 également sur l'IGF-1R, et tous les deux peuvent 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, 2002).

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 néoangiogenèse. Ils se lient à divers récepteurs appelés VEGFR1, VEGFR2... 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).

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 prolifératif ou au contrôle du cycle cellulaire est suggérée (Scholzen et Gerdes, 2000). De nombreuses études concernant Ki-67 ont été réalisées dans des tumeurs mammaires et mettent en évidence qu'il est un excellent marqueur prolifératif 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).

Enfin, les marqueurs de l'activité métastatique (protéase : cathepsine-D, activateur du plasminogène et l'un de ses inhibiteurs PAI-1 ; métalloprotéases ; stromélysine III ; collagénases) semblent également des facteurs discriminants et prédictifs d'un envahissement ganglionnaire (Janicke *et al.*, 2001).

2.1.5 La carcinogenèse 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 et d'une exposition soutenue des cellules à des signaux de prolifération, conduisant à une dérégulation du cycle cellulaire et à une résistance à l'apoptose des cellules transformées et tumorigènes qui émergent. Cette émergence peut résulter d'altérations touchant des cellules différenciées, selon le concept de l'origine clonale des tumeurs. Cependant, la découverte de cellules souches cancéreuses permet de concevoir que ces cellules non différenciées subissent des altérations génétiques, qu'elles transmettent aux cellules filles différenciées, expliquant ainsi l'hétérogénéité des tumeurs mammaires (Al-Hajj

et al., 2003). Classiquement, on distingue 3 étapes dans la cancérogenèse mammaire: l'initiation qui correspond à la première mutation, la progression qui est l'étape de constitution et de développement de la tumeur mammaire, puis la dissémination (**Figure 3**).

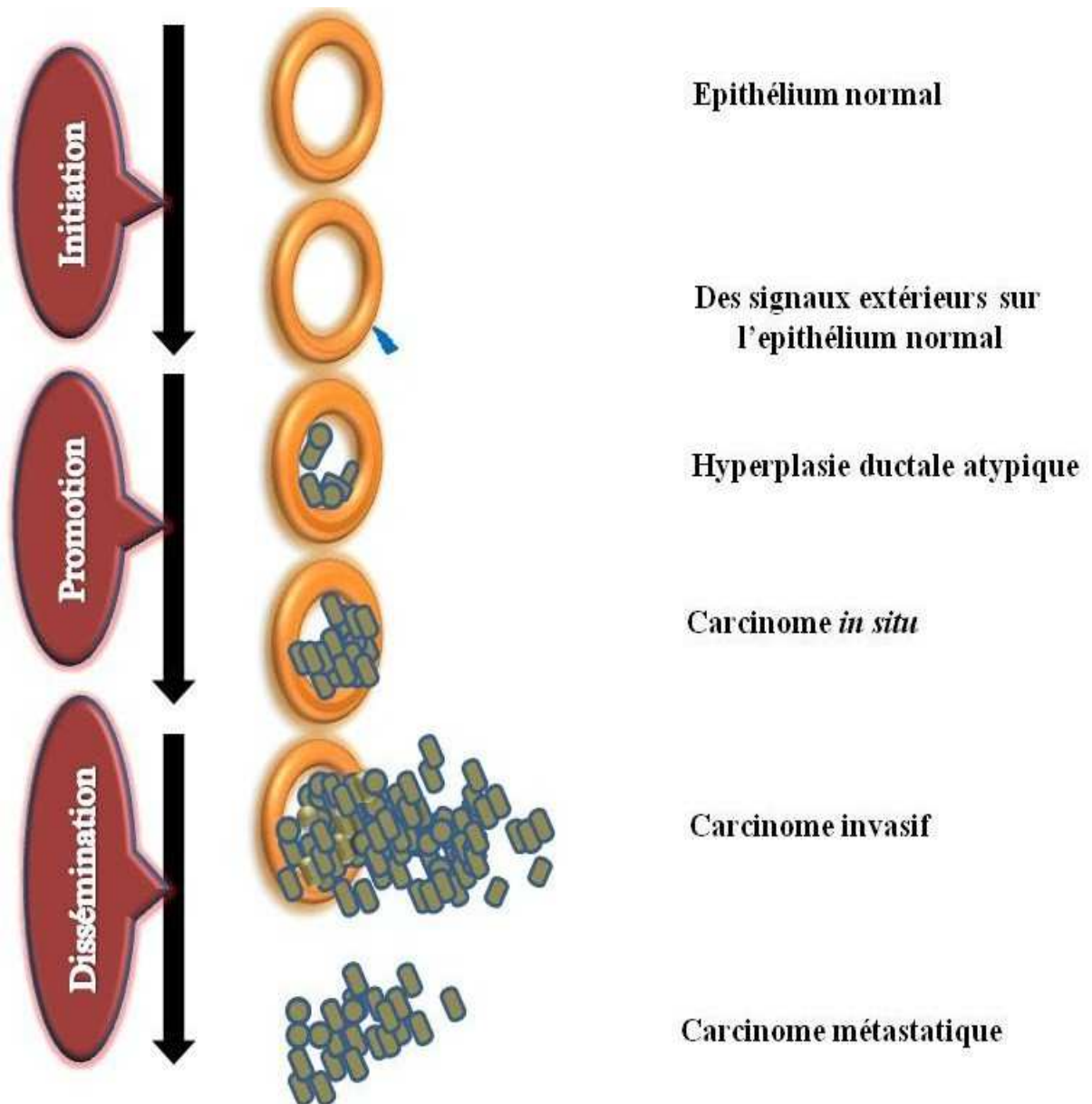


Figure 3 : les étapes de transformation dans la cancérogenèse mammaire.

Il existe trois étapes dans la cancérogenèse mammaire : l'initiation, la promotion et la dissémination.

2.1.5.1 Les altérations génétiques dans le cancer du sein

Dans les cancers du sein, comme dans l'immense majorité des cancers, ces altérations sont somatiques, uniquement présentes dans les cellules tumorales. En dehors des prédispositions génétiques (dans 5 à 10% des cancers du sein), 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 (aneuploïdie) 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 *HER2*, *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 *IGFRI* codant pour le récepteur de l'IGF1 (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 des gènes suppresseurs de tumeurs, comme C'est la mutation du gène *TP53* retrouvée dans 25-30% des cas sporadiques de cancers du sein (Kerangueven *et al.*, 1997; Macleod, 2000).

- d'activer d'autres gènes, conduisant à leur surexpression : c'est le cas, pour un certain pourcentage de cancer du sein, des gènes codant le récepteur à l'EGF (EGFR), la télomérase (hTERT), les protéines anti-apoptotiques comme *bcl2*, le facteur angiogénique comme le VEGF, les facteurs d'invasion comme l'uPA/PAI et des métalloprotéases (MMP).

- l'altération de gènes agissant notamment sur le « modelage » de la chromatine ou sur le degré de méthylation de l'ADN (altérations épigénétiques) ce qui a pour conséquence de provoquer des modifications de l'expression des gènes cités précédemment. C'est le cas également du gène suppresseur de tumeur *PTEN*, inactivé par une hyperméthylation de ses

séquences promotrices dans 40% des cancers du sein sporadiques (Khan *et al.*, 2004; Tycko, 2000).

- L'altération des gènes touche souvent des gènes impliqués dans la stabilité du génome et peut être ainsi responsable d'une instabilité génétique. Celle-ci correspond à des déficiences dans les systèmes de réparations (par excision de nucléotides ou NER, de bases ou BER, des cassures simple brin et double brin), des altérations des gènes du système de réparation des mésappariements (hMSH1 et 2) (Agnolletto *et al.*, 2007; Karihtala *et al.*, 2006 ; Okochi *et al.*, 2002), qui se traduisent par 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, cités ci-dessus), et dans la résistance à l'apoptose.

De nombreux travaux suggèrent également l'importance des altérations épigénétiques pour inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs dans les cancers du sein. C'est le cas par exemple du gène codant la Masp1, et le gène BRCA1 dans 15 à 30% des tumeurs du sein sporadiques (Tycko, 2000).

2.1.5.2 Les principaux signaux de prolifération des cellules tumorales mammaires

Ils sont essentiellement d'origine endocrine, paracrine ou autocrine. Les signaux endocrines sont essentiellement des hormones, telles que les œstrogènes et la progestérone, tandis que les signaux paracrines et autocrines correspondent aux facteurs de croissance.

2.1.5.2.1 Les œstrogènes

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 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* une 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 : ER α et ER β . Seul ER α serait clairement impliqué dans la prolifération cellulaire induite par les œstrogènes, tandis qu'ER β exercerait au contraire des effets anti-prolifératifs (DeNardo *et al.*, 2005; 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 est 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 (Cepa *et al.*, 2008; Kijima *et al.*, 2005). 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 4**).

La voie classique d'activation des ER passe par la fixation de l'œstradiol (E₂) 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 TGF α (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'E₂ 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).

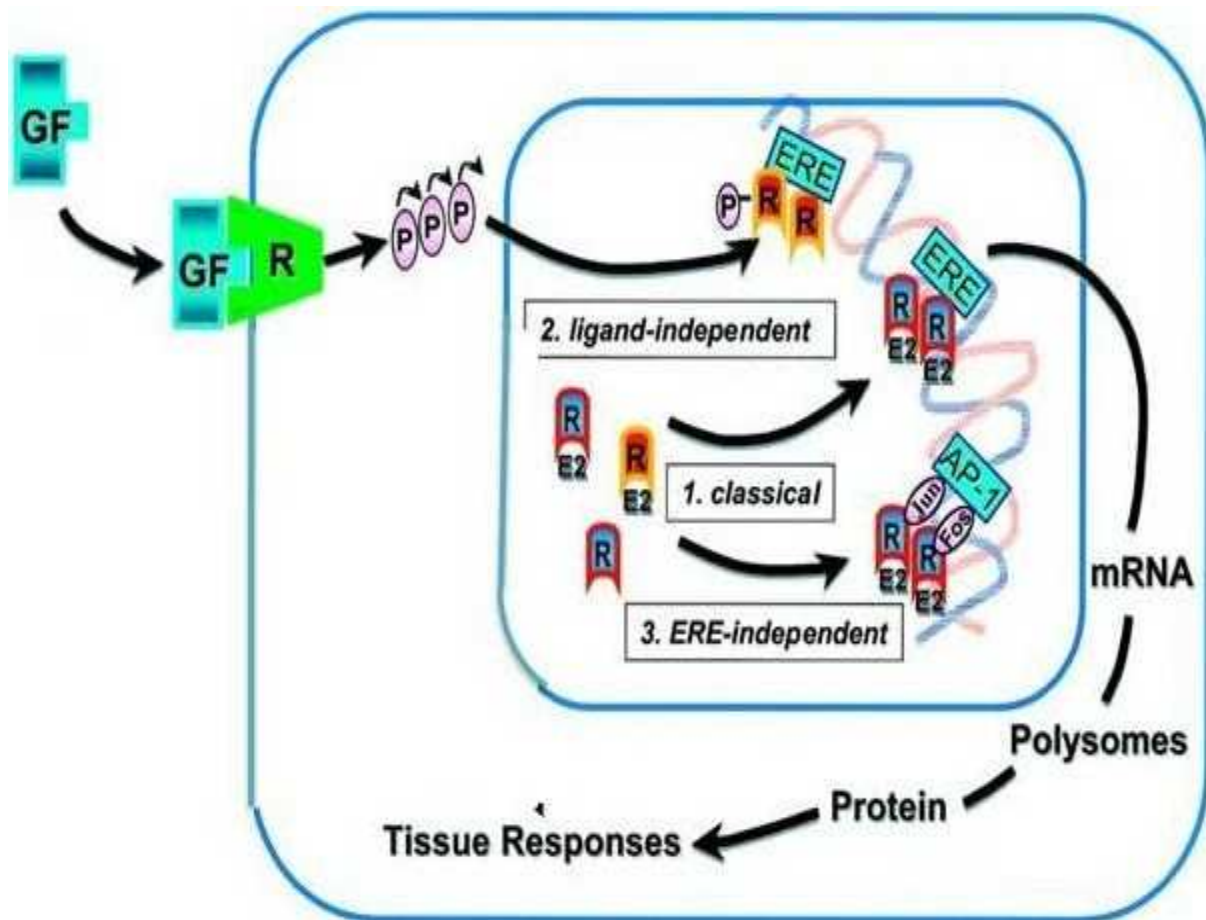


Figure 4 : Les différentes voies de signalisation impliquant le récepteur aux œstrogènes (R).

Il existe trois voies distinctes d'activation des récepteurs aux œstrogènes : la voie classique (classical) et non classique (ERE-independent), dépendante de la fixation d'un œstrogène comme l'œstradiol (E2) sur le récepteur nucléaire, et la voie d'activation non génomique (ligand-independent). GF, Facteur de croissance et R, Récepteur de facteur de croissance, ERE, élément de réponse aux œstrogènes. (Modifiée d'après Julie M. Hall *et al.* 2001).

D'autres études ont montré qu'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 (Insulin-like growth factor-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 d'ERα *via* l'activation des voies

communes telle que celle de survie cellulaire (la PI3K) et celle des MAPK (mitogen-activated protein kinases).

2.1.5.2.2 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).

2.1.5.2.3 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 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 TGF α , 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 correspondante 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 Goncalves, 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- κ B pour Nuclear Factor-kappa B. 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 (Kim et al., 2000; Sovak *et al.*, 1997).

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 ou Insulin-like growth factor 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 activité tyrosine kinase appelés IGF-1R (Insulin-like growth factor-1 receptor). En dehors de quelques différences au niveau moléculaire, telle que la présence d'une protéine adaptatrice distincte appelé IRS-1 correspondant au 1^{er} substrat du récepteur IGF-1R, la voie de signalisation *via* le récepteur IGF-1R (**Figure 5**) 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 *et al.*, 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).

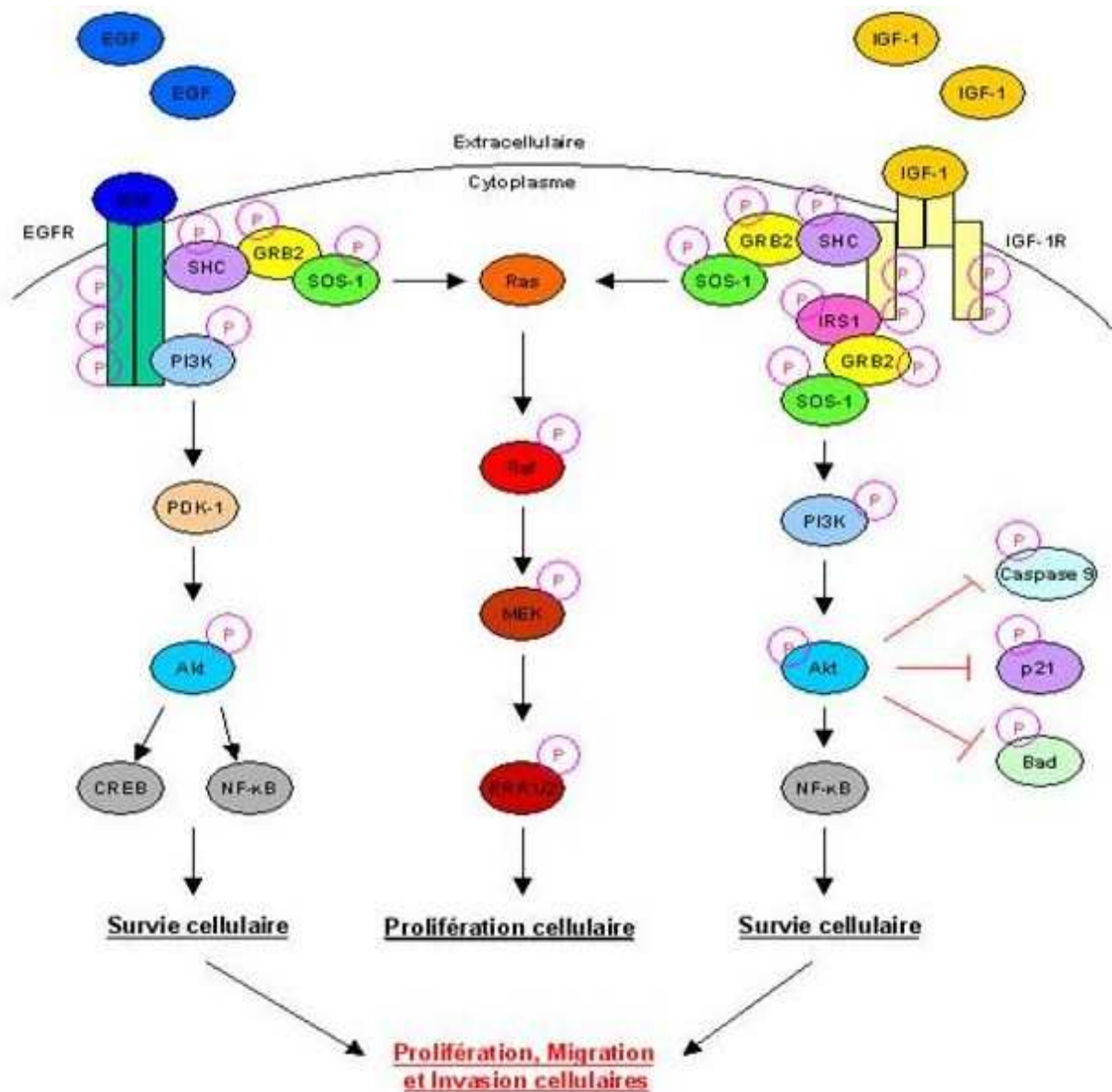


Figure 5 : Voies de signalisation cellulaire activées par l'EGF (Epidermal growth factor) et par l'IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) conduisant à la survie cellulaire.

2.1.5.3 La dérégulation du cycle cellulaire

2.1.5.3.1 Les différentes phases du cycle cellulaire

La cinétique de croissance d'une tumeur combine à la fois la vitesse de prolifération des cellules tumorales, mais également des cellules des autres compartiments cellulaires, comme le stroma, les cellules composant les néovaisseaux et les infiltrats inflammatoires, ainsi que les communications entre les cellules via la production de facteurs de croissance.

L'étude de la prolifération tumorale permet d'approcher l'agressivité des tumeurs et peut être reconnue comme une valeur pronostique dans le cancer du sein.

La division d'une cellule est un phénomène régulé par différentes combinaisons de protéines stimulatrices et inhibitrices de la prolifération. Cette dernière s'effectue selon le cycle cellulaire, qui se divise en quatre phases : G1, S, G2 et M. La phase G1 est le temps nécessaire pour la préparation de la cellule à la duplication de l'ADN, qui dure plusieurs heures (6 à 24 heures selon les types cellulaires) et qui nécessite un environnement extracellulaire chargé en facteurs de croissance et en nutriments. La phase S correspond au temps nécessaire pour la synthèse de l'ADN en double par réplication exacte du contenu originel. La phase G2 ou de repos pré-mitotique correspond à la phase de synthèse du matériel nécessaire à la mitose. Enfin, la phase M qui correspond à la mitose, durant laquelle les chromosomes homologues dupliqués migrent aux 2 pôles des deux futures cellules filles.

Le bon déroulement du cycle cellulaire nécessite la présence de 6 complexes protéiques appelées Cycline / CDK (kinase dépendante d'une cycline), qui assurent le passage des points de restriction entre la phase G1 et S, puis entre G2 et M et qui interviennent à des moments précis du cycle cellulaire, en phosphorylant des substrats spécifiques (**Figure 6**).

2.1.5.3.2 Le point de restriction G1/S

L'entrée des cellules en phase G1 nécessite la stimulation des cellules tumorales par un facteur de croissance ou une hormone. La liaison du facteur de croissance à son récepteur transmembranaire provoque une cascade de signaux intracellulaires à l'origine de l'activation en cascade de protéines kinases entraîne l'activation de c-Myc ou AP-1 (Activator protein-1) pour déclencher la transcription du gène de la Cycline D. La liaison de l'œstrogène sur son récepteur nucléaire entraîne directement ou via l'activation de la protéine c-Myc l'expression de la cycline D (Foster *et al.*, 2001). Cette dernière s'associe avec la CDK4. Le complexe ainsi formé et activé initie la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome ou pRb. Phosphorylée, la pRb libère E2F qui sert alors de facteur de transcription du gène de la cycline E. La fonction essentielle de la Cycline D / Cdk4 est donc d'activer, au début de la phase G1 (G1 précoce), la transcription du gène de la cycline E intervenant dans la phase suivante du cycle. Dans les cancers du sein, les cyclines D et E sont particulièrement élevées et sont considérées comme des facteurs de mauvais pronostic (Keyomarsi et Pardee, 1993). Cette surexpression est un des mécanismes qui conduit à entretenir de façon continue le cycle des cellules tumorales mammaires (Foster *et al.*, 2001).

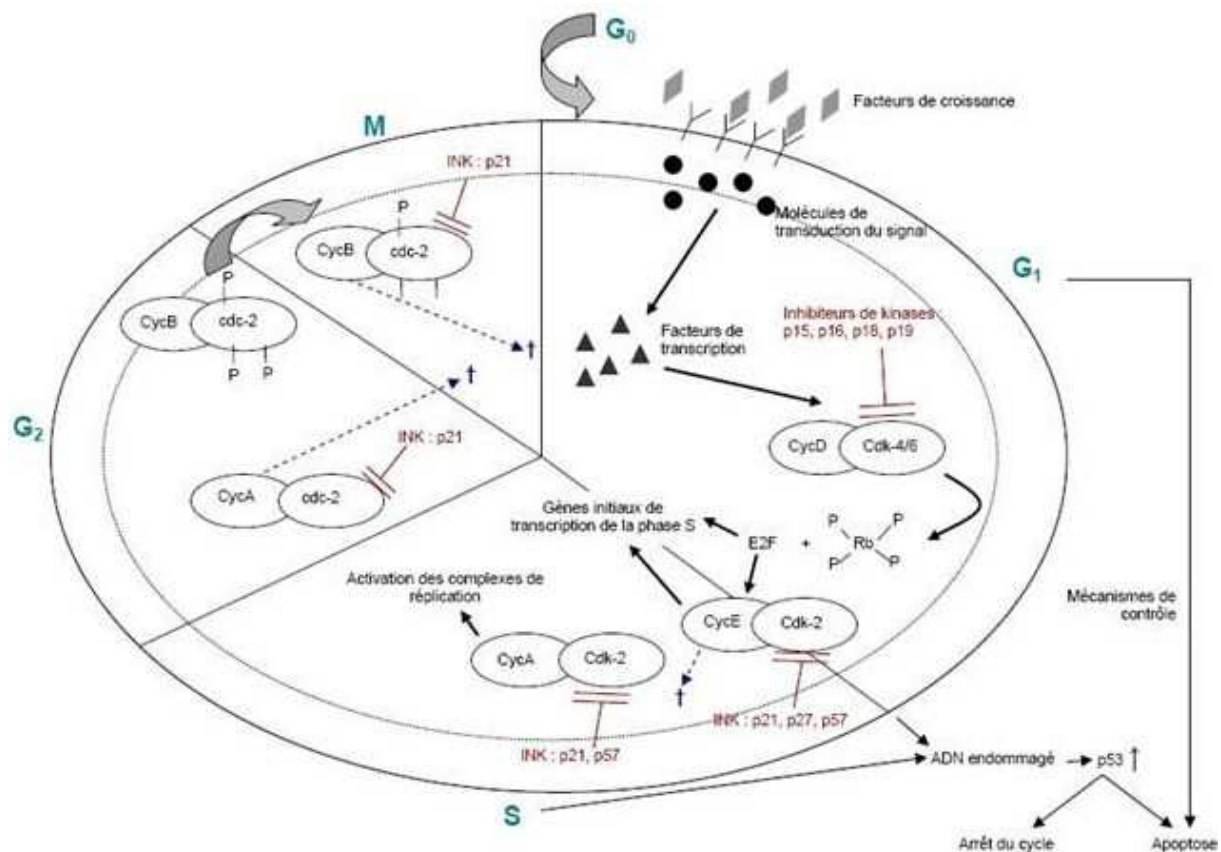


Figure 6 : Représentation des différentes phases du cycle cellulaire et des acteurs moléculaires intervenants.

INK : inhibiteur de kinase (régulation négative du cycle), **cyc**, cycline, **cdk** : kinase dépendante d'une cycline, † : dégradation par les protéasomes. D'après PRADEE AB: Regulation of cell cycle, in: ALISON MR editor. *The cancer handbook*, UK, London: Nature Publishing Group, 2002, p15.

L'activité des CDK de la phase G₁ et S est contrôlée par des inhibiteurs spécifiques de kinases ou INK, dont l'expression basse constitue également un mécanisme entretenant le cycle des cellules tumorales mammaire et représente également un facteur de mauvais pronostic. C'est le cas de la p27 qui prévient l'activation des complexes CDK/Cycline E ou CDK4/Cycline D et qui contrôle ainsi la progression dans le cycle cellulaire (Cariou *et al.*, 1998). De même la p21 (WAF1/CIP1), qui est un gène cible de la TP53, se lie au complexe contenant la CDK2 ou 4 et régule le cycle cellulaire au niveau de la phase G₁. La p21 se lie également à PCNA, qui montre son implication dans le contrôle de la phase S (Cariou *et al.*, 1998). En plus de l'induction du gène de la cycline D, les oestrogènes et les facteurs de croissance sont également connus pour activer le passage des cellules tumorales de la phase

G1 à S en activant la dégradation des inhibiteurs p21 et p27 et en provoquant la diminution de l'expression du gène codant la pRb dans le cancer du sein (Foster *et al.*, 2001; Gottardis *et al.*, 1995).

2.1.5.3.3 Le point de restriction G2/M

L'entrée des cellules en mitose nécessite l'activation du complexe Cycline A ou B/CDK1 (*cdc2*). Avant que cette activation ne s'établisse, il existe un mécanisme de surveillance du cycle cellulaire, qui peut être activé par divers signaux (cassures des brins d'ADN, arrêt de la progression des fourches de réplication lors de la synthèse de l'ADN...), et qui permet d'arrêter le cycle en G2, de sorte que la mitose ne soit pas déclenchée tant que la réplication n'est pas totalement et correctement achevée. Une des cibles essentielles du point de surveillance G2/M est la phosphatase Cdc25C qui sera inactivée. La fonction de Cdc25C dans la progression normale du cycle est de déphosphoryler la Cdk1, rendant ainsi le complexe Cycline A ou B/CDK1 actif. Les lésions de l'ADN activent les kinases Chk1 et Chk2 qui phosphorylent Cdc25C sur des sérines, ce qui entraîne sa séquestration dans le cytoplasme, loin de son substrat nucléaire Cdk1. Le complexe Cycline B/Cdk1 reste alors phosphorylé donc inactif. Si la réplication est inachevée, c'est ATR qui intervient, en phosphorylant Chk1 qui inhibe Cdk1.

La p21 a également pour cible le complexe Cycline B / Cdk 1, provoquant ainsi le maintien de l'arrêt en G2. Dans les cellules tumorales, le point de passage de G2 en M est souvent dérégulée, même lorsque des lésions de l'ADN, apparaissent car le gène de la p53 ou de BRCA1 est souvent muté. La p53 ainsi que BRCA1, phosphorylées par la kinase ATM, stimulent l'expression du gène p21. Dans le cas de BRCA1, cette protéine interagit à son tour avec Chk1 et 2, pour bloquer le passage des cellules de la phase G2 à M (Deng, 2006).

2.1.5.4 La résistance à l'apoptose

Le développement d'une tumeur est également favorisé par des mécanismes qui permettent aux cellules tumorales d'échapper à l'apoptose. Ce mécanisme de mort cellulaire est provoqué par deux voies principales : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (**Figure 7**). Brièvement, la 1^{ère} dépend d'un signal extérieur, qui agit *via* un récepteur de mort et déclenche une cascade d'activation d'enzymes protéolytiques, les caspases. Celles-ci provoquent à son tour l'activation d'une DNase, qui va fragmenter l'ADN et l'activation d'autres enzymes clivant les protéines du cytosquelette, ce qui aboutit à la formation de corps apoptotiques. La voie intrinsèque est activée par un stress cellulaire (irradiation, infection

virale, lésions de l'ADN,...). Elle commence par l'apparition de pores dans la membrane mitochondriale, permettant la sortie de cytochrome c dans le cytoplasme qui va se complexer avec l'apaf-1 et la caspase 9 pour former l'apoptosome. Ce dernier active la cascade des caspases. La perméabilité des membranes mitochondriales est contrôlée par une série de protéines inhibant (Bcl2), ou favorisant l'apoptose (Bax, Bad).

Les mécanismes d'échappement à l'apoptose sont divers. Dans le cas des cellules tumorales mammaires, la mutation du gène de la p53 représente un des moyens de s'opposer à l'apoptose. La TP53, en tant que facteur de transcription, induit entre autre l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax, tandis qu'elle réprime celle de Bcl2 (Miyashita *et al.*, 1994), mais induit également l'expression du gène Fas/Apo-1/CD95, codant pour un membre de la superfamille des récepteurs du Tumor Necrosis Factor (Owen-Schaub *et al.*, 1995). Dans ce dernier exemple, il est décrit que les cellules tumorales mammaires exprimant le ligand Fas et ayant la p53 mutée résistent à l'apoptose et sont capables d'induire l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques (Jager *et al.*, 2002). Un 2^{ème} mécanisme expliquant l'échappement des cellules tumorales mammaires à l'apoptose est que les oestrogènes induisent l'expression de Bcl2, une action inhibée par le tamoxifène (Jager *et al.*, 2002). Enfin, un des mécanismes principaux de résistance à l'apoptose, correspond à la voie de survie qui est activée par l'EGF et qui concerne les cellules tumorales mammaires surexprimant c-Erb2. La voie de signalisation intracellulaire, déclenchée par la fixation du facteur de croissance sur son récepteur, active des facteurs de transcription comme NF-κB, dont certains gènes cibles produisent des protéines anti-apoptotiques (Inoue *et al.*, 2007 ; Van Waes *et al.*, 2007).

Les cascades des caspases

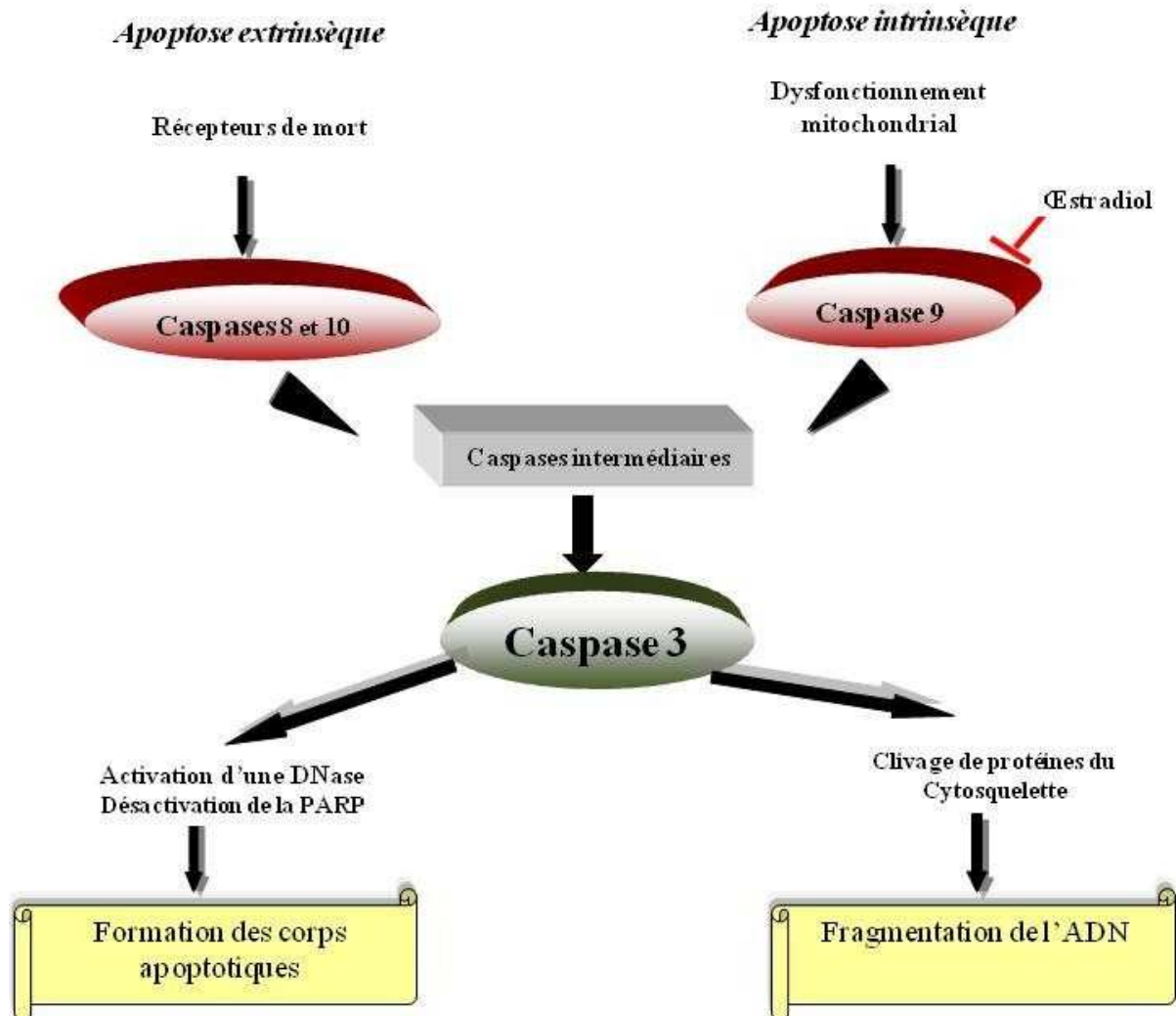


Figure 7 : Schéma simplifié des voies de régulation de l'apoptose.

(Modifiée d'après Desreux et Foidart, dans le livre (Le Sein) 3^e édition 2007.

2.1.5.5 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. 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).

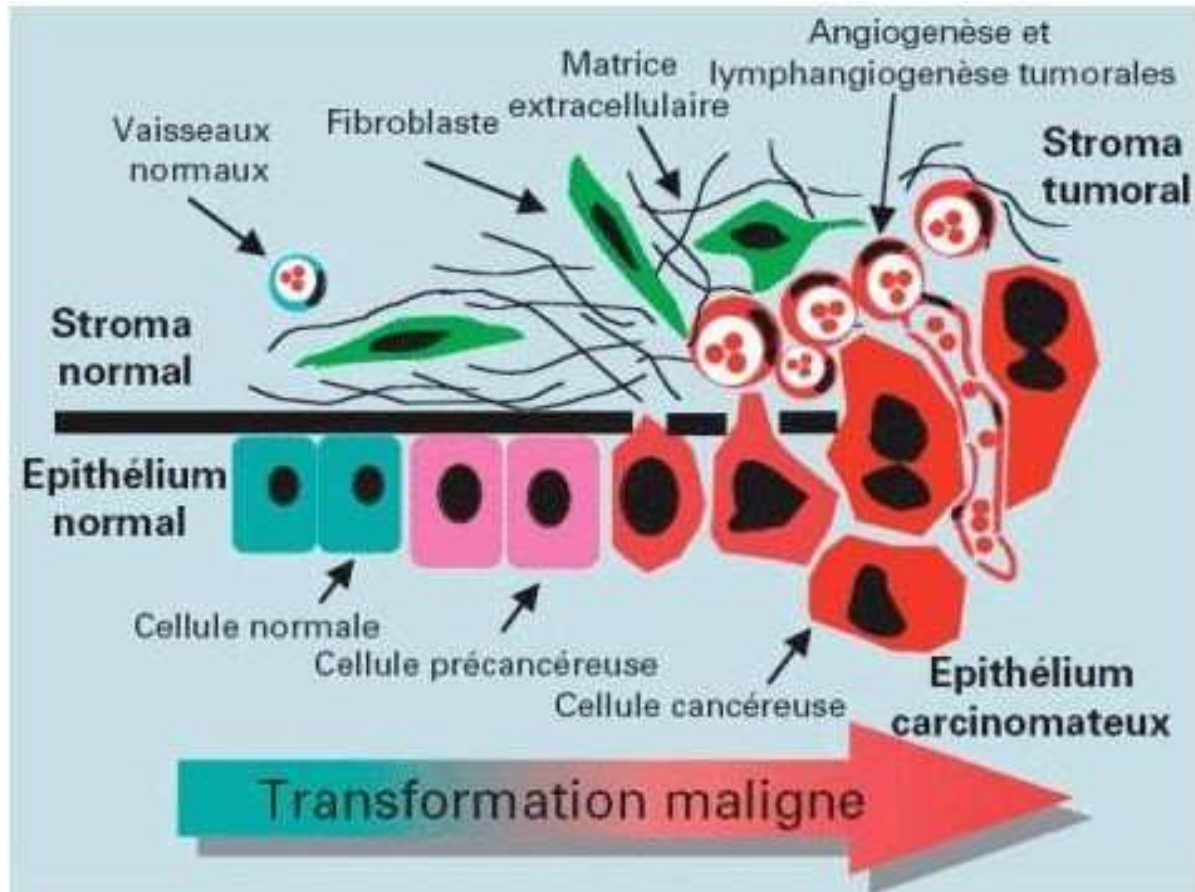


Figure 8 : Transformation du stroma au cours de l'évolution tumorale.

L'ensemble des modifications des structures préexistantes induites par les cellules cancéreuses aboutit à la formation d'un tissu conjonctif et inflammatoire, associé aux cellules tumorales, que l'on appelle le stroma. Le stroma fait partie intégrante de la tumeur et participe à sa biologie. Il comporte généralement des cellules conjonctives, fibroblastes ou myofibroblastes, des néo-vaisseaux sanguins, ainsi que des fibres extra-cellulaires de collagène et d'élastine. Le stroma constitue donc un tissu de soutien et de nutrition (Ahmad *et al.*, 1997). Ce schéma provienns du site Internet (Web Path) :

[http://www.unilim.fr/theses/2005/sante/2005limo0100f/xml/ressources/image007.png&imgref url \(le 07- 03-2009\).](http://www.unilim.fr/theses/2005/sante/2005limo0100f/xml/ressources/image007.png&imgref url (le 07- 03-2009).)

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-angiogénèse. 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 (Rose et Siegel, 2006; Wyatt *et al.*, 2005). La transition épithélio-mésenchymateuse conduit également à l'expression de gènes modifiant le cytosquelette et la perte d'adhésion des cellules tumorales, pour favoriser leur migration. C'est le cas des cellules de carcinomes mammaires canaux, 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 cytokératines et de 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 tumorale, soit des macrophages infiltrants 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) auxquelles 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.

2.2 Les espèces actives de l'oxygène et les défenses 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.

2.2.1 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 ($O_2^{\circ-}$), 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 du 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' $O_2^{\circ-}$ 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 comme les quinones et le noyau hémique des hémoprotéines. Sa charge négative lui permet de traverser les membranes cellulaires en empruntant les canaux ioniques (Suzuki *et al.*, 1997).

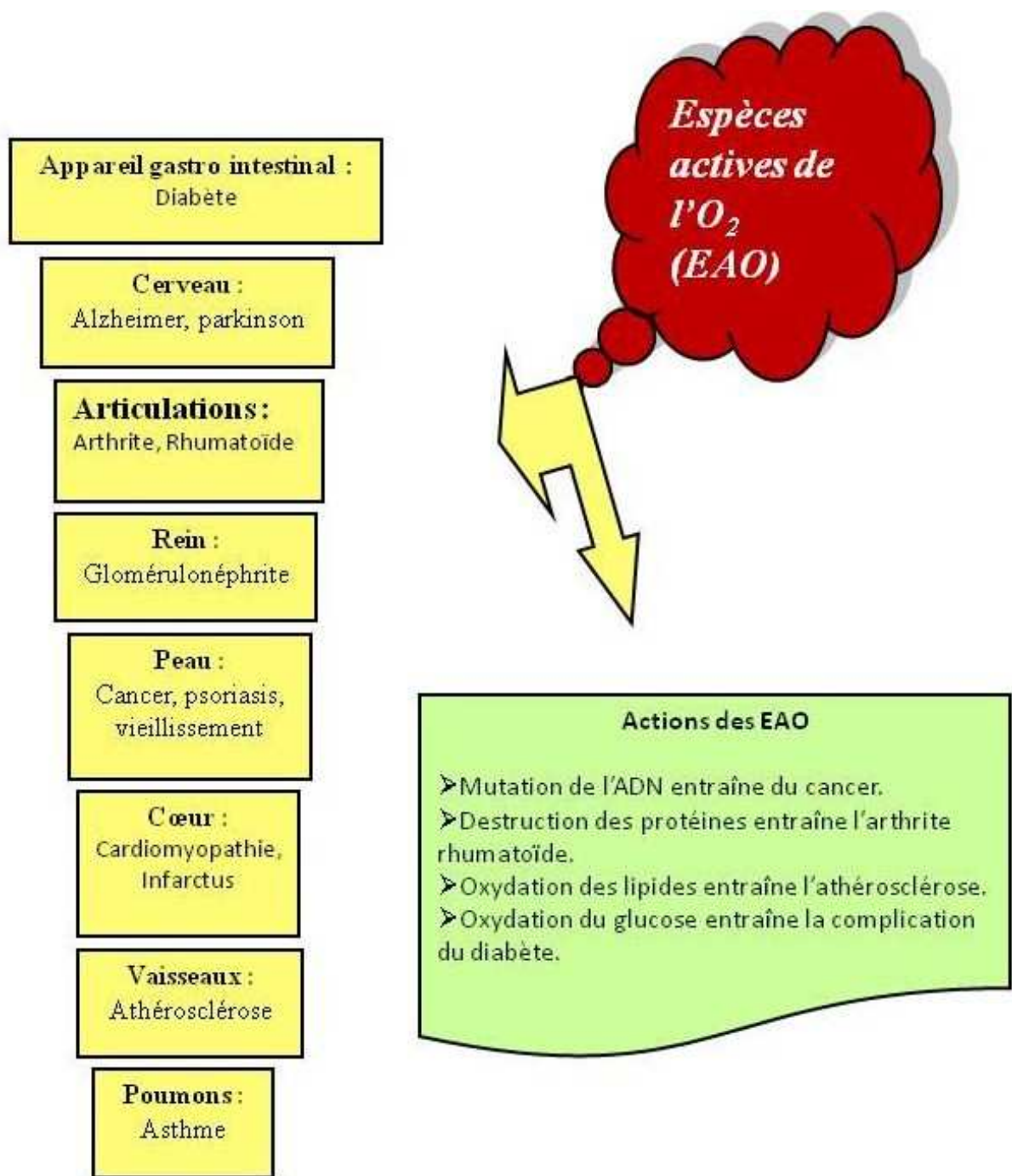


Figure 9 : Les différentes pathologies dans lesquelles les EAO sont impliquées.

Le peroxyde d'hydrogène, formé secondairement par dismutation de l'O₂^{°-}, 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 (Collins *et al.*, 1995) et qui peut réagir avec l'anion superoxyde pour donner des peroxy-nitrites (ONOO^-), composés fortement oxydants à l'origine des radicaux OH° (Mates et Sanchez-Jimenez, 2000).

Enfin, l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est une molécule d'oxygène en état d'excitation, apparaissant surtout dans les processus de photosensibilisation par les 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 ultraviolets (UV) et 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' $\text{O}_2^{\circ-}$ 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' $\text{O}_2^{\circ-}$. Ainsi toute substance capable d'augmenter ou de bloquer l'activité de la chaîne respiratoire, induit la production d'EAO dans la cellule.

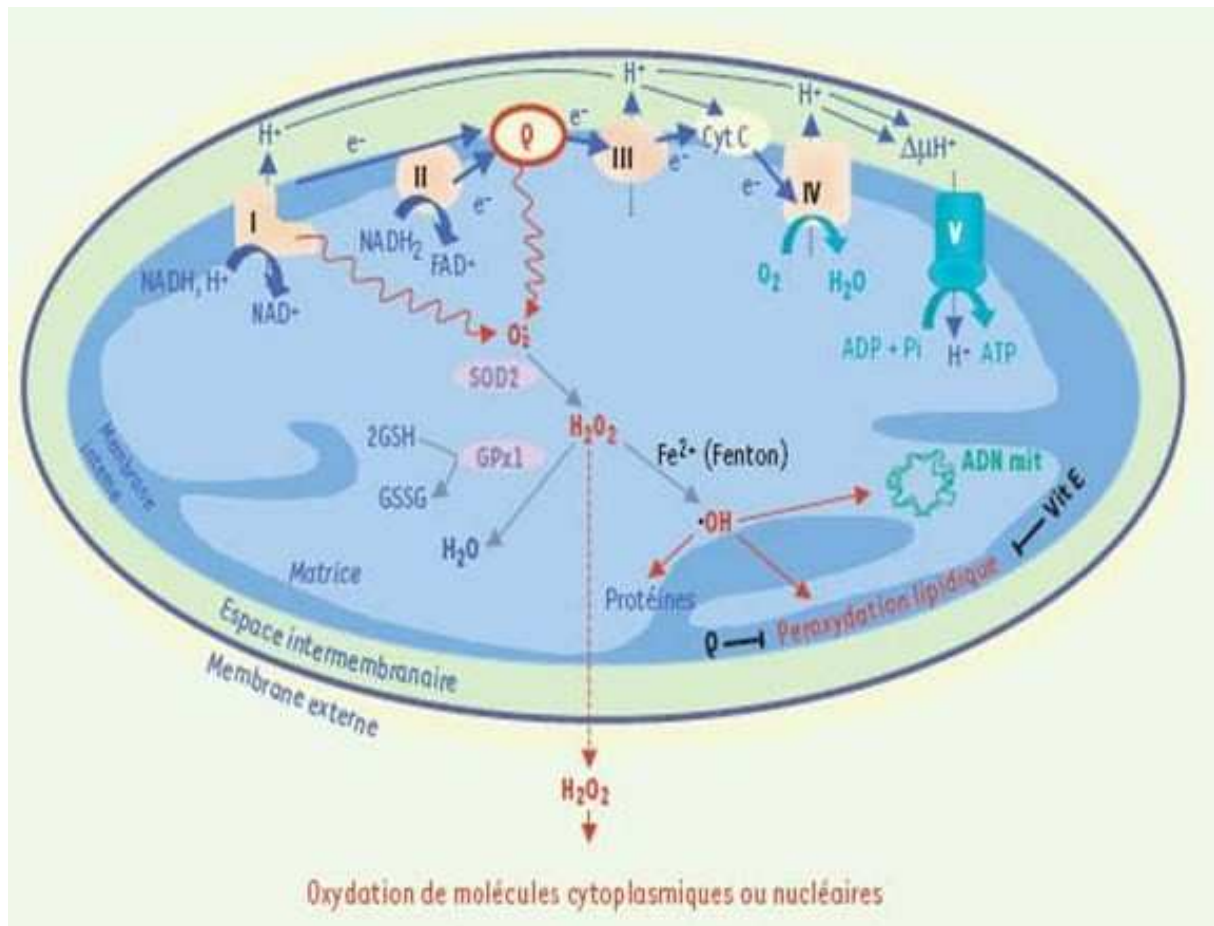


Figure 10 : Production mitochondriale et prise en charge de l’anion superoxyde.

Au cours du transfert des électrons, dans des conditions physiologiques, il peut y avoir des fuites d’électrons et production d’anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par le complexe I et le coenzyme Q. $O_2^{\cdot-}$ est métabolisé par la superoxyde dismutase (SOD2, ou SOD Mn, étant l’isoforme spécifiquement localisée dans la matrice mitochondriale) en peroxyde d’hydrogène (H_2O_2). Celui-ci peut être décomposé en H_2O par la glutathion peroxydase (GPx1), en présence de glutathion réduit (GSH), se transformer en radical hydroxyle ($\cdot OH$) 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 les protéines, ou l’ADN (mitochondrial et nucléaire), et induire la peroxydation lipidique (elle-même limitée par des piègeurs de radicaux libres, de nature lipophile, tels que la vitamine E ou le coenzyme Q). Il est important de souligner ici la dualité d’action du coenzyme Q : piègeur de radicaux libres, sous forme réduite, dans les membranes biologiques, il est la source essentielle d’ $O_2^{\cdot-}$ dans la chaîne respiratoire.

(D’après Carrière *et al.* 2006).

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, libèrent 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’ $O_2^{\cdot-}$. 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 $O_2^{\circ-}$ 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' $O_2^{\circ-}$ 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 (Mitrinen 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' $O_2^{\circ-}$ grâce à la présence d'une enzyme membranaire, la NADPH oxydase. Cet $O_2^{\circ-}$ 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 (Mates et Sanchez-Jimenez, 2000).

2.2.2 Les défenses antioxydantes

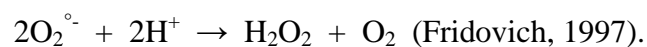
Afin d'éviter l'accumulation des EAO à l'origine d'effets délétères, chaque cellule de l'organisme possède des protéines enzymatiques et non enzymatiques, ainsi que des molécules d'origine alimentaire et métabolique qui les éliminent.

2.2.2.1 Les protéines enzymatiques éliminant les EAO

Les protéines enzymatiques antioxydantes constituent la 1^{ère} 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.

2.2.2.1.1 Les superoxydes dismutases

Les SOD catalysent la dismutation de l'O₂^{°-} en H₂O₂ selon la réaction suivante :



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 (2.3) de cette étude bibliographique. Il existe une 3^{ème} forme localisée dans le milieu extracellulaire, dont l'activité dépend du cuivre et du zinc (SOD3) (Mates 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.

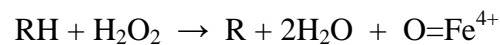
L'activité de la SOD Cu/Zn intracellulaire (SOD1) représente 80% de l'activité SOD totale d'une cellule. C'est une protéine dimérique d'environ 36 kDa, dont chaque unité possède un site catalytique actif contenant un atome de cuivre et un atome de zinc (Banci *et al.*, 1998). Seul le cuivre sous forme Cu²⁺ 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 boîte TATA et CCAAT et des éléments de réponse de différents facteurs de transcription, qui explique qu'il peut être inductible par divers facteurs (Cho *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 1994 ; Minc *et al.*, 1999 ; Yoo *et al.*, 1999 ; Zelko *et al.*, 2002)

La SOD Cu/Zn extracellulaire (SOD 3) est glycosylée et sécrétée dans l'espace extracellulaire (Marklund, 1982). Cette enzyme est tétramérique (135 kDa) dont les sous-unités sont 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

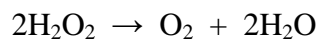
région promotrice possède des séquences régulatrices dont celles correspondantes à la réponse antioxydante ou ARE pour « Antioxidant Response Element » (Zelko *et al.*, 2002).

2.2.2.1.2 *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'H₂O₂. Elle est formée de quatre sous-unités, chacune ayant un groupement héminique au sein duquel le fer est sous forme ferrique (Fe³⁺). Cette enzyme de 240 kDa est active sous forme tétramérique et possède une double activité, dépendante de la concentration en H₂O₂ (Nordberg et Arner, 2001). A faible concentration, elle réduit l'H₂O₂ en oxydant des substrats donateurs d'hydrogène (phénols et alcools) selon la réaction suivante :



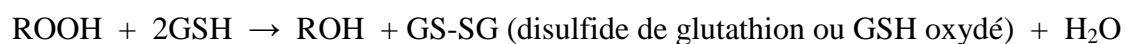
Pour des fortes concentrations en H₂O₂, elle catalyse sa transformation en eau et en dioxygène (Nordberg et Arner, 2001), selon la réaction suivante :



Le mécanisme de régulation de la catalase est encore peu connu chez les eucaryotes. Il est seulement décrit une régulation post-transcriptionnelle, qui correspond à la fixation d'une protéine dans la partie 3' non traduite de l'ARNm de la catalase, lorsque la concentration en H₂O₂ est faible et qui se détache pour favoriser la traduction de cet ARNm lorsque la concentration en EAO est forte (Sato *et al.*, 1992).

2.2.2.1.3 *Les glutathions peroxydases*

La glutathion peroxydase ou GPX est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélélocystéine (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 (Mates et Sanchez-Jimenez, 2000), selon la réaction suivante :



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, sélénio-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 faible concentration 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**). (Mates et Sanchez-Jimenez, 2000).

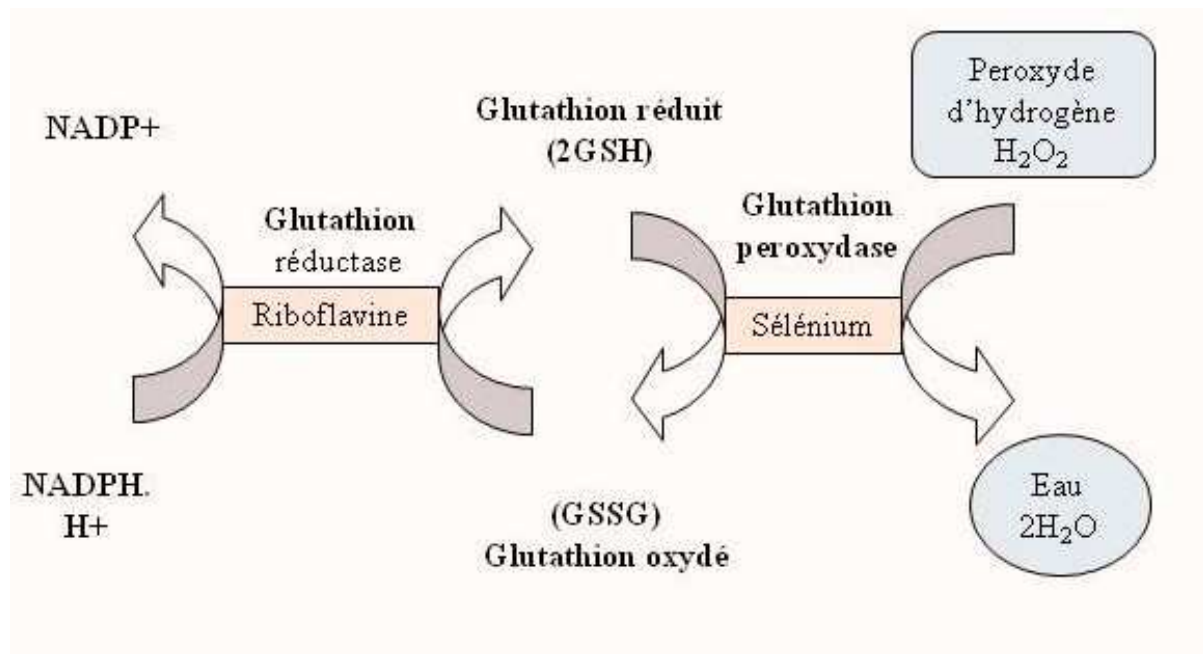


Figure 11 : Cycle oxydo-réducteur du glutathion

Une molécule de peroxyde d'hydrogène est réduite 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.

2.2.2.1.4 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 se localisent dans tous les compartiments cellulaires selon les sous-classes : les 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 , elle se retrouve 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- κ B (Watson *et al.*, 2004).

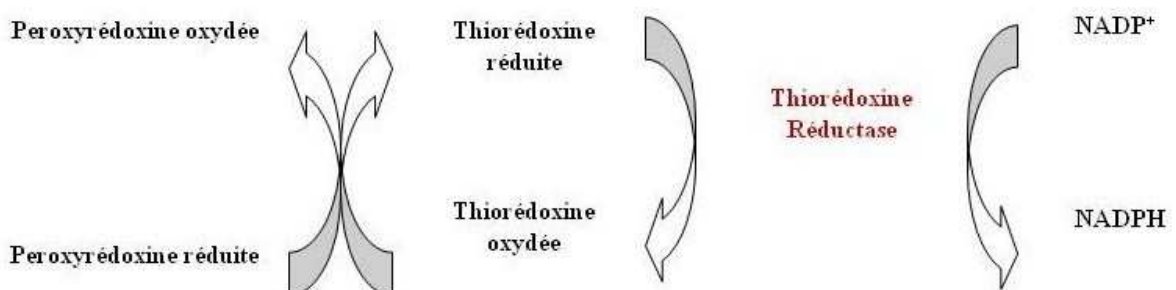


Figure 12: Le système de régénération des peroxyrédoxines par les thiorédoxines

2.2.2.2 Les autres protéines et molécules antioxydantes

La 2^{ème} barrière de la défense antioxydante dans la cellule est formée par les enzymes dégradant les produits issus de la peroxydation lipidique ou 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 », situé 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 métabolique, comme l'ubiquinone et l'acide urique participent également à la défense cellulaire (Mates 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).

2.2.2.3 Les protéines de réparation des dommages oxydatifs

Les enzymes de réparation représentent la dernière barrière de la défense antioxydante dans la cellule, et leur expression est indispensable afin d'éviter l'accumulation des dégâts provenant de l'oxydation des molécules biologiques, responsable de la mort ou de la transformation cellulaires. Les méthionines oxydées en sulfoxyde 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, 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 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.

2.2.2.4 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- κ B qui interviennent également dans la régulation des gènes codant des enzymes antioxydantes (Moscow *et al.*, 1992; Okuda *et al.*, 1988; St Clair *et al.*, 2002; Van Remmen *et al.*, 1998), 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, suivie 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 protein1), s'en libère lors d'une augmentation d'EAO ou après activation de la voie des MAPK, puis migre

dans le noyau pour former un complexe avec c-Jun ou 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 (Nioi et Hayes, 2004; Wolf *et al.*, 2001).

Conditions normales

Induction par des pro-oxydants

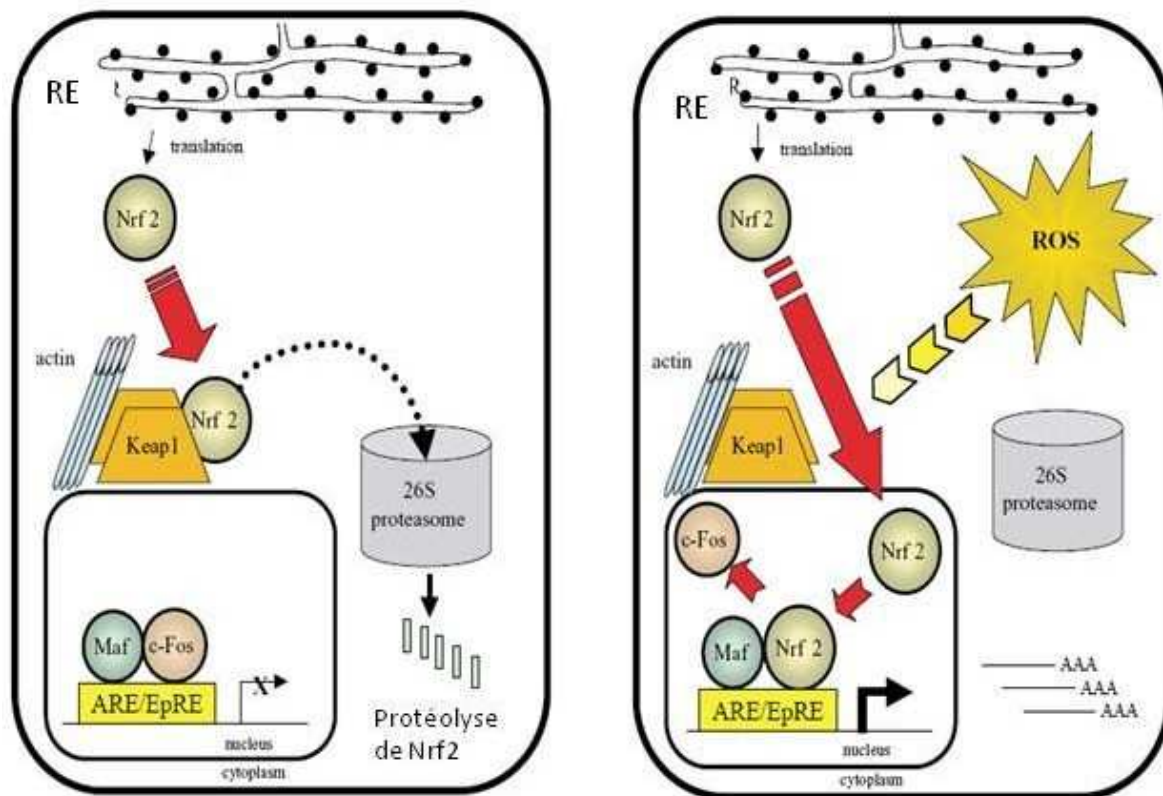


Figure 13 : Facteurs de transcription recrutés sur l'Antioxydant Response Element ou dans des conditions normales ou lors d'un stress oxydant.

Dans des conditions ARE homéostatiques, la protéine 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 dégradé 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. (RE : Réticulum Endoplasmique). (Modifiée d'après Nioi et Hayes 2004).

2.2.3 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.

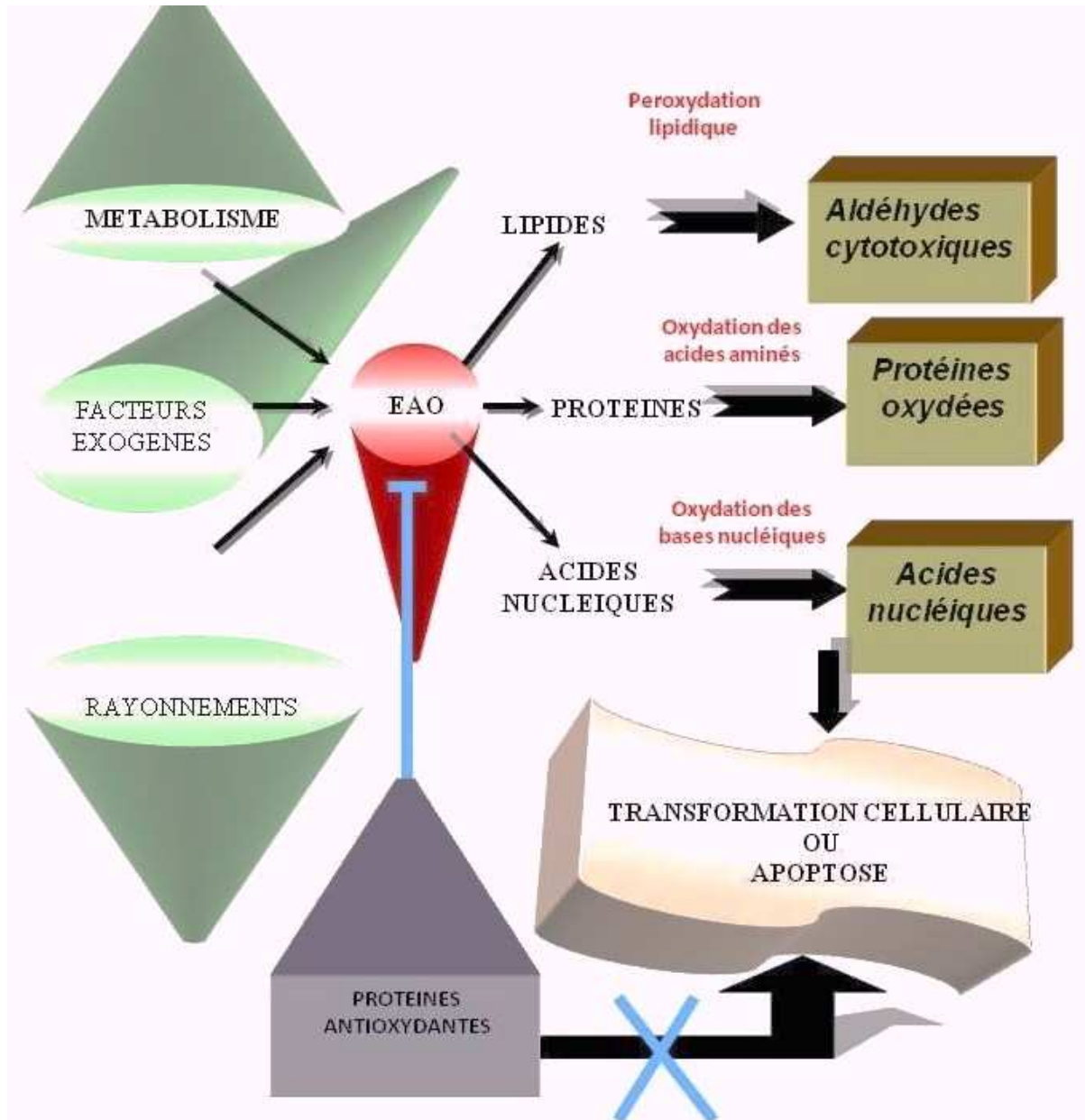


Figure 14 : Origines et cibles intracellulaires des EAO

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 peroxyde, ROOH ou hydroperoxyde et RO° ou alkoxyde). Cet ensemble d'oxydation 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 nonéanal (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 intramoléculaires, 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 (Mates et Sanchez-Jimenez, 2000). La réaction des aldéhydes cytotoxiques avec certaines bases nucléiques, conduit à la formation d'adduits 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, ou 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 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 (Cooke *et al.*, 2003; Marnett, 2000). Ces altérations aux niveaux 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 induite 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 structures glycaniques 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 (Mates et Sanchez-Jimenez, 2000).

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

2.2.4.1 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 la 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 (Carew et Huang, 2002; Golden et Melov, 2001). 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 grande quantité d'O₂^{°-} (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 messenger 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, responsable 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).

2.2.4.2 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 leur implication biologique dans la prolifération et la migration cellulaires est clairement 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'epidermal growth factor » engendre également la production d'EAO dans les cellules (Xie, 2003).

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 homology deleted on chromosome TEN (Kwon *et al.*, 2004 ; Leslie *et al.*, 2003). 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. 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 CDC 25C pour cell division cycle 25 homolog C (Sommer *et al.*, 2002).

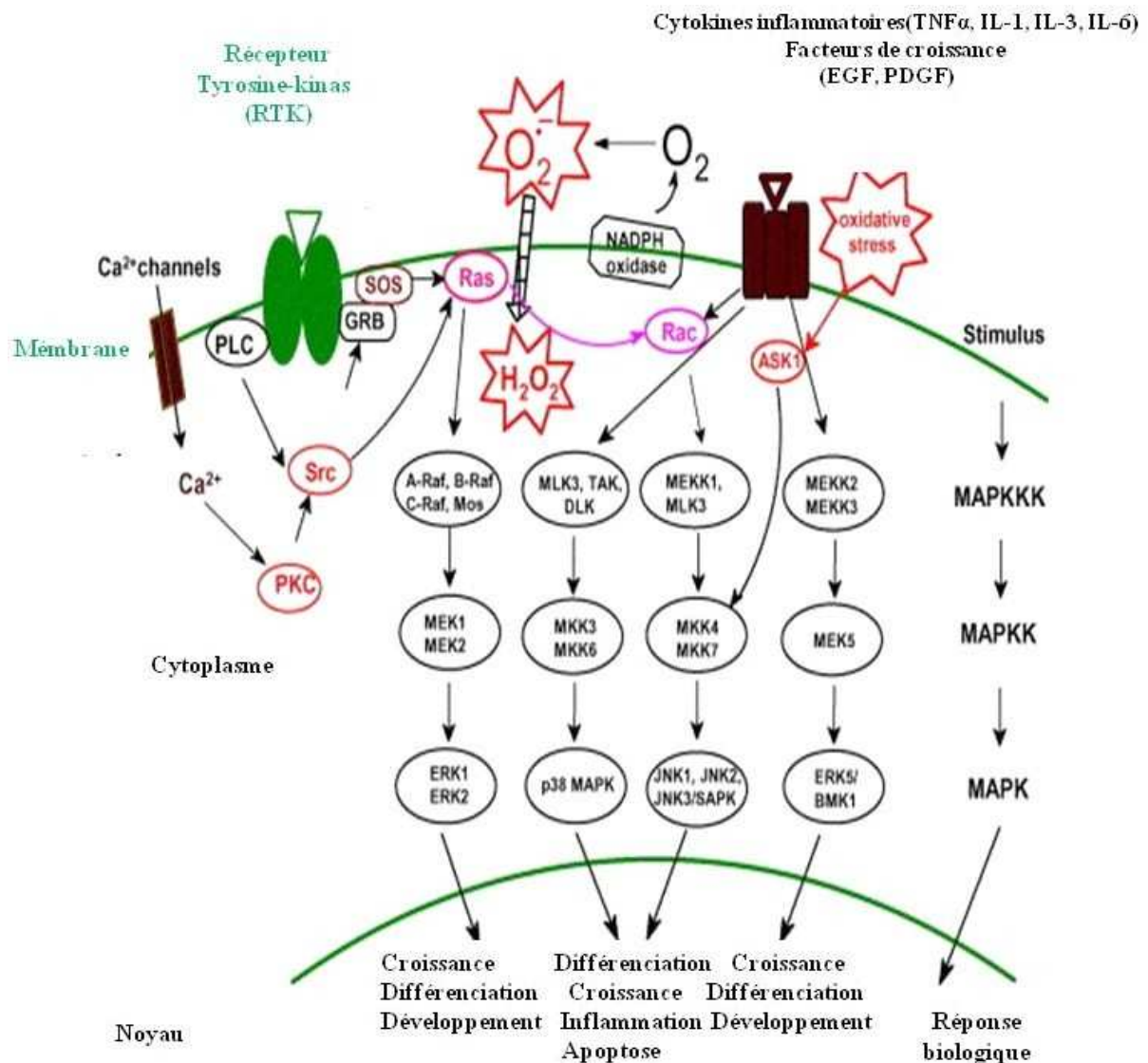


Figure 15 : Voies de signalisation des MAPK induite par les EAO

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 (TNF α , IL-1, IL-3, IL-6) (Modifiée d'après Valko *et al.* 2007).

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- κ B), qui sont activés lorsque l'équilibre oxydo-réducteur intracellulaire est plus oxydant. Le complexe AP-1, constitué d'un dimère des 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 (Dalton *et al.*, 1999; Xanthoudakis et Curran, 1996). 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- κ B 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 I κ B ou avec l'ADN. En absence de stimuli, les dimères Rel/NF- κ B associés à une protéine inhibitrice I κ B, sont maintenus sous une forme inactive dans le cytoplasme de nombreux types cellulaires. Lors d'une stimulation par l'EGF par exemple, mais dont la nature peut être très diverse (cytokines pro-inflammatoires, ultraviolets ou UV, xénobiotiques), l'activation d'une cascade de kinases aboutit à la phosphorylation de la protéine I κ B, qui se détache du complexe Rel/NF- κ B, avant d'être dégradée par le protéasome (**Figure 16**). Le complexe Rel/NF- κ B 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) (Kucharczak *et al.*, 2003; LaCasse *et al.*, 1998).

Au contraire d'AP-1 et de NF- κ B, 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).

2.2.4.3 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).

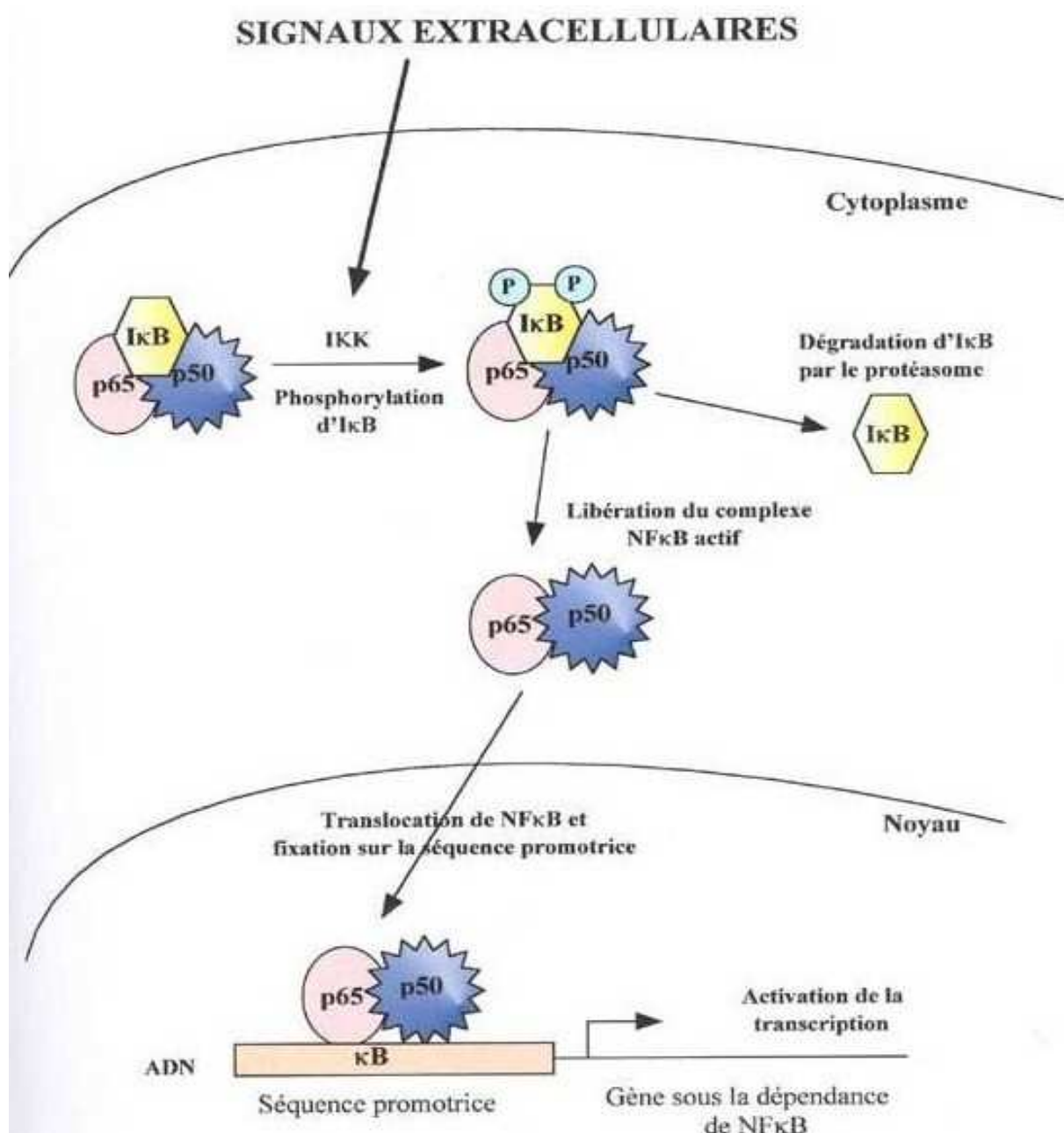


Figure 16 : Représentation du mode d'action du complexe NF-κB dans la transactivation de la transcription de gènes sous sa dépendance, suite à des signaux extracellulaires.

(Illustration de Collot-Teixeira 2003).

En dehors des protéines kinases, les EAO, en particulier l'H₂O₂, 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.*, 2002c).

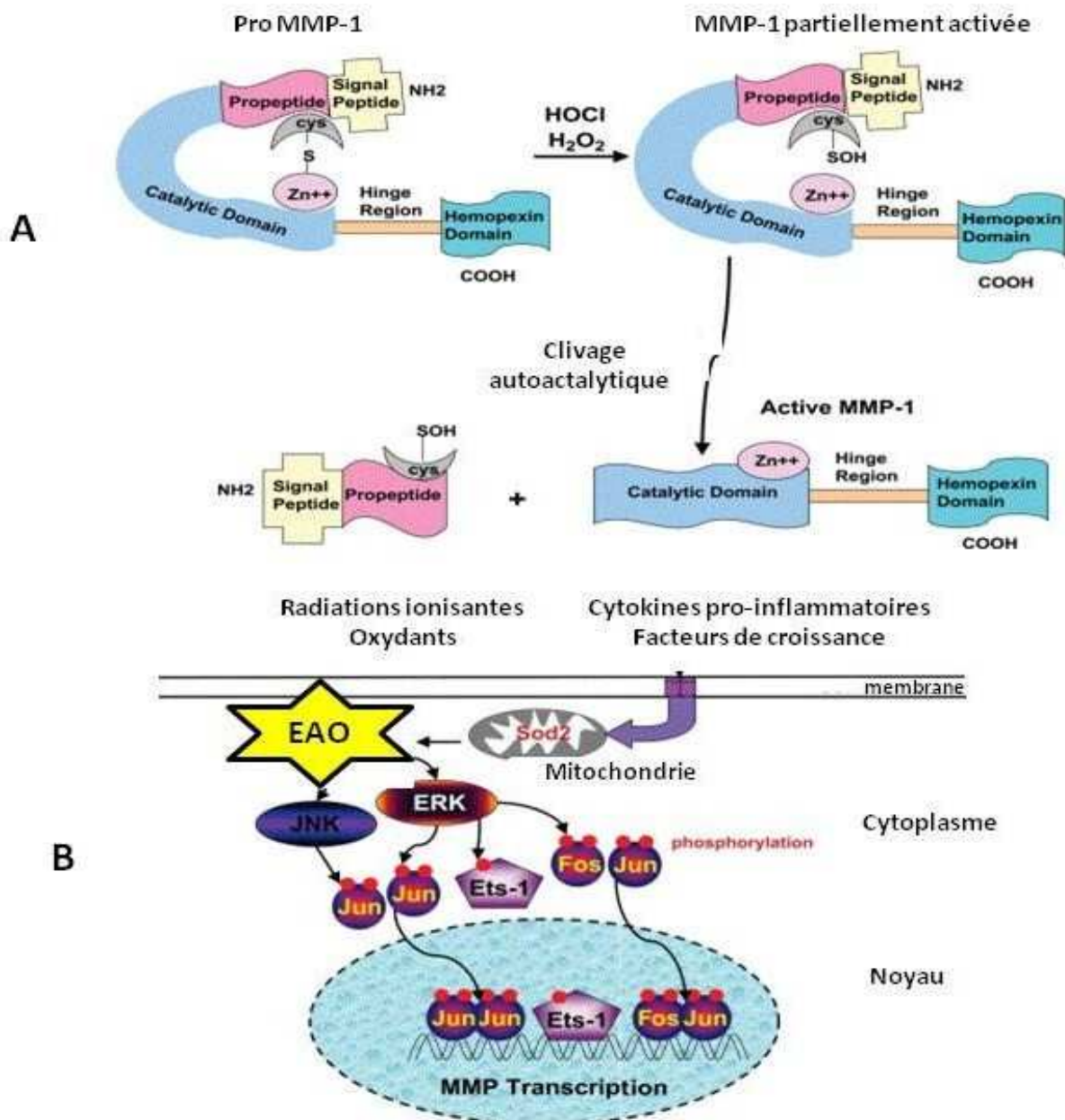


Figure 17 : Activation oxydative de la Métalloprotéase-1 (MMP-1) et contrôle redox de la signalisation cellulaire menant à l'activation des MMP

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).

L'activation de NF- κ B 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) (Baldwin, 2001; Bours *et al.*, 2000; Collins et White, 1995). La migration et l'adhésion cellulaire 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 et 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 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'H₂O₂ ou par l'activation dépendante des EAO des protéines Src et Ras (Gao *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 1999). Ce facteur de transcription constitue une famille de facteurs de transcription, HIF-2 α , HIF-3 α , ARNT2, ARNT3. HIF-1 est le plus prépondérant et existe sous forme d'un hétérodimère HIF-1 α et HIF-1 β (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 O₂ (Semenza, 2001).

2.2.4.4 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 (Grzenkiewicz-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'O₂^{o-} (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 tumorale, ou encore des cytokines ou des EAO provenant des macrophages infiltrants 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 NADPH oxydase à la surface des cellules endothéliales. Les EAO libérées de 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 néovaisseaux (Ushio-Fukai et Nakamura, 2008). Souvent, la néovascularisation 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- κ B 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).

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

Selon les types de cancer, 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 (Ahn *et al.*, 2006; Cox *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2005; Ravn-Haren *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' $O_2^{\circ-}$ 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). 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 de facteurs de transcription (AP-1 et NF- κ B), tandis qu'il inactive des phosphatases comme PTEN (Ridnour *et al.*, 2004). 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), tandis que la surexpression de la GPX entraîne est surexprimée dans les cellules tumorales du pancréas, leur prolifération est diminuée de 50% (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 phase II, et sont ainsi plus sensibles aux carcinogènes et développent plus rapidement des tumeurs que les souris normales (Giudice et Montella, 2006; Ramos-Gomez *et al.*, 2001).

Dans le cas du cancer du sein, la plupart des enzymes antioxydantes sont surexprimées dans les tumeurs mammaires, à l'exception de la catalase et de la SOD Mn (**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).

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.

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

Tableau 1 : 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 portées sur moins de 5 échantillons tumoraux sont exclues.

2.3 La Superoxyde Dismutase dépendante du Manganèse (SOD Mn ou SOD2)

2.3.1 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 l' H_2O_2 et par les peroxyinitrites (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 -terminale, 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).

2.3.2 Structure et régulation du gène de la SOD Mn

2.3.2.1 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).

2.3.2.2 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-2 α » ou AP-2 α (St Clair *et al.*, 2002).

Dans une lignée de cellules d'hépatocarcinomes ou dans des fibroblastes pulmonaires de fœtus humains, le facteur Sp1 agit positivement sur l'expression constitutive de la SOD Mn (Xu *et al.*, 2002; Yeh *et al.*, 1998), alors qu'AP-2 α 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). Très récemment, il a été identifié au sein du laboratoire, un nouvel élément de réponse à une protéine, dont l'activité comme régulateur de la transcription n'était pas connue. Il s'agit de la protéine Damaged DNA Binding 2 protein (DDB2), qui est impliquée dans le maintien d'une expression constitutive faible dans les cellules tumorales mammaires hormono-dépendantes (Minig *et al.*, 2009), et dont nous reparlerons dans la partie (2.4) de cette analyse bibliographique.

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).

2.3.2.3 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 (St Clair *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 1994), tels que :

- des cytokines (interféron γ , TNF α ou IL-1 β) (Harris *et al.*, 1991; Masuda *et al.*, 1988; Tsan *et al.*, 1991; Tsan *et al.*, 1992),
- les radiations ionisantes et les ultraviolets A (Poswig *et al.*, 1999; St Clair *et al.*, 1992; Suresh *et al.*, 1994),
- 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 (Doroshov *et al.*, 1991; Mantymaa *et al.*, 2000; Negoro *et al.*, 2001; St Clair *et al.*, 1991),

- l'acide arachidonique (Bianchi *et al.*, 2002).

Parmi les éléments de réponse bien caractérisés, le « Manganese Superoxide TPA Response Element » (MSTRE), située 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 - κ B sur laquelle se fixe le facteur de transcription NF- κ B, 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-1 β , le TNF α ou encore les esters de phorbol (Bernard *et al.*, 2001; Darville *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 1999a). (**Figure 18**). Une étude menée dans des fibroblastes modifiés a permis de préciser que l'activation de NF- κ B par ces esters de phorbol est possible grâce à une inhibition de la synthèse de I κ B α (Inhibitory κ B α). Les esters de phorbol sont capables d'activer la protéine kinase C (PKC), qui phosphoryle I κ B α , entraînant ainsi sa dégradation (Kinningham *et al.*, 2004).

L'activation du facteur de transcription NF- κ B 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- κ B a été mise en évidence dans des fibroblastes transformés

(Dhar *et al.*, 2004). Cette protéine assure le lien entre NF- κ B 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 rapport également que la p53, qui est présente dans le complexe Sp1/NPM/NF- κ B, 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).

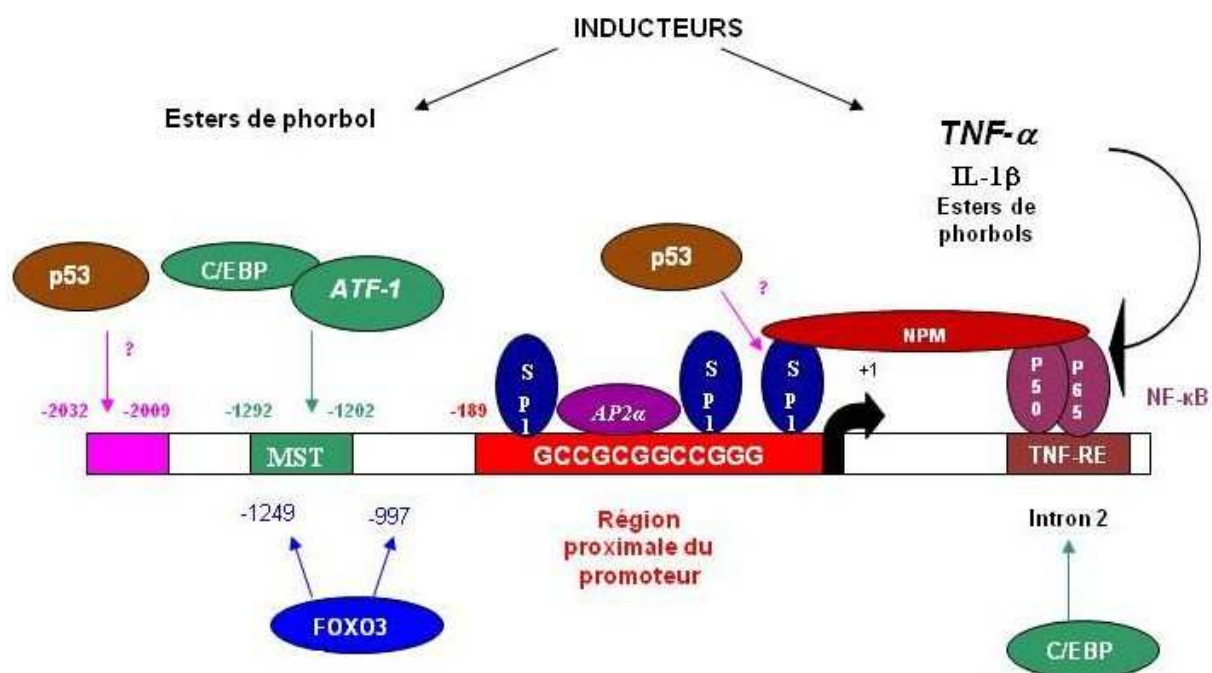


Figure 18 : Localisation sur le promoteur du gène de la SOD Mn des sites de fixation des facteurs de transcription régulant l'expression constitutive (Sp1, AP-2 α) ou induite par diverses substances (TNF α , IL-1 β , esters de phorbols) de la SOD Mn.

Voir texte détaillé paragraphe (2.3.2.3)

2.3.2.4 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.

2.3.2.5 Les voies de transduction de la régulation de l'expression de la SOD Mn

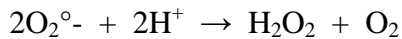
Les voies de transduction activées par les inducteurs de l'expression du gène *SOD2* ne sont pas toutes élucidées. En présence d'esters de phorbol ou de molécules anti-cancéreuses, l'induction dépend dans les cellules tumorales de l'activation de la protéine Kinase C (PKC) (Das *et al.*, 1998). Au laboratoire, 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 TNF α 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-1 β est dépendante de NF- κ B, 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 messenger 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.

2.3.3 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'O₂^{•-} et 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'O₂^{°-}, principalement formé dans le compartiment mitochondrial, en catalysant sa dismutation en H₂O et H₂O₂, selon la réaction suivante :



L'enzyme joue ainsi un rôle anti-apoptotique car l'élimination de l'O₂^{°-} de la mitochondrie est associée à la transformation de l'H₂O₂ 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 (Kinningham *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 (Babior *et al.*, 1973; Salin et McCord, 1975). Elle protège également contre les effets d'un épisode d'hypoxie ou d'hyperoxie (McCord, 1985), à l'origine d'une surproduction d'O₂^{°-} 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'H₂O₂, 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).

2.3.4 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.

2.3.4.1 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 (Aida *et al.*, 1994; Church *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1998a; Safford *et al.*, 1994; St Clair *et al.*, 1992; Weydert *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 1997), 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 (Chung-man Ho *et al.*, 2001; Izutani *et al.*, 1998; Izutani *et al.*, 1996; Janssen *et al.*, 1998; Korenaga *et al.*, 2003; Toh *et al.*, 2000a; Toh *et al.*, 2000b), pour les cancers de l'ovaire, de la thyroïde, pour des mésothéliomes, ou encore des tumeurs d'origine neuroépithéliale (Cobbs *et al.*, 1996; Kahlos *et al.*, 1998; Kahlos *et al.*, 2000; Kinnula *et al.*, 1996; Landriscina *et al.*, 1996; Nakata *et al.*, 1992; Nishida *et al.*, 1993; Ria *et al.*, 2001), ainsi que dans les cellules métastatiques du foie (Skrzycki *et al.*, 2008).

2.3.4.2 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 d'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.*, 1999b; Arsova-Sarafinovska *et al.*, 2008; Mitrunen *et al.*, 2001; Stoehlmacher *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001).

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-2 α . 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 (St Clair *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Yeh *et al.*, 1998). De plus, des mutations mises en évidence dans la région proximale du promoteur font apparaître de nouveaux sites de fixation au facteur de transcription AP-2 α 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'IL1 α et le TNF α , sécrétées par les macrophages infiltrant spécifiquement les tumeurs, induirait l'expression de leur gène codant la SOD Mn *via* l'activation de NF- κ B (Chung-man Ho *et al.*, 2001).

2.3.4.3 Rôle de la SOD Mn dans la prolifération des cellules tumorale

Le rôle de la SOD Mn dans la carcinogenèse et dans la croissance tumorale dépend essentiellement de l'action décrite précédemment de l'O₂^{°-} et de l'H₂O₂, 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'O₂^{°-}, une EAO qui agit comme un second messenger dans les cellules tumorales, en activant l'oncoprotéine Ras et en inhibant l'activité de la protéine p53 (Oberley, 2005; Yang *et al.*, 1999), 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'O₂^{°-} 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 (Li *et al.*, 1998b; Yan *et al.*, 1996) et de diverses cellules tumorales (Church *et al.*, 1993; Cullen *et al.*, 2003; Li *et al.*, 1998b; Ough *et al.*, 2004; Safford *et al.*, 1994; Weydert *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 1997).

Cependant, l'accumulation d'H₂O₂ 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'H₂O₂ 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 cellules de gliomes humains (Li *et al.*, 2000). L'H₂O₂ peut affecter le fonctionnement des mitochondries (Kim *et al.*, 2001a), 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 carcinogénèse de la peau (St Clair *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2001), 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 est 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, 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. 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- κ B (Nelson et Melendez, 2004). Cependant, l'activation par H_2O_2 n'est pas aussi efficace sur la prolifération que celle activée par l' $\text{O}_2^{\circ-}$, 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 l'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 infiltrants les tumeurs, induisent l'expression de la SOD Mn, sont donc susceptibles de contribuer à la croissance tumorale (Kinnula et Crapo, 2004; Pani *et al.*, 2004). Ces données récentes suggèrent que la SOD Mn ne serait pas un suppresseur de tumeur dans toutes les cellules.

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 de l' H_2O_2 , qui affecte le fonctionnement des mitochondries

(Kim *et al.*, 2001b). L'expression basale faible du gène de la SOD Mn dans les cellules tumorales suggère donc que l' $O_2^{\circ-}$ participerait aux signaux favorisant leur prolifération (Figure 19).

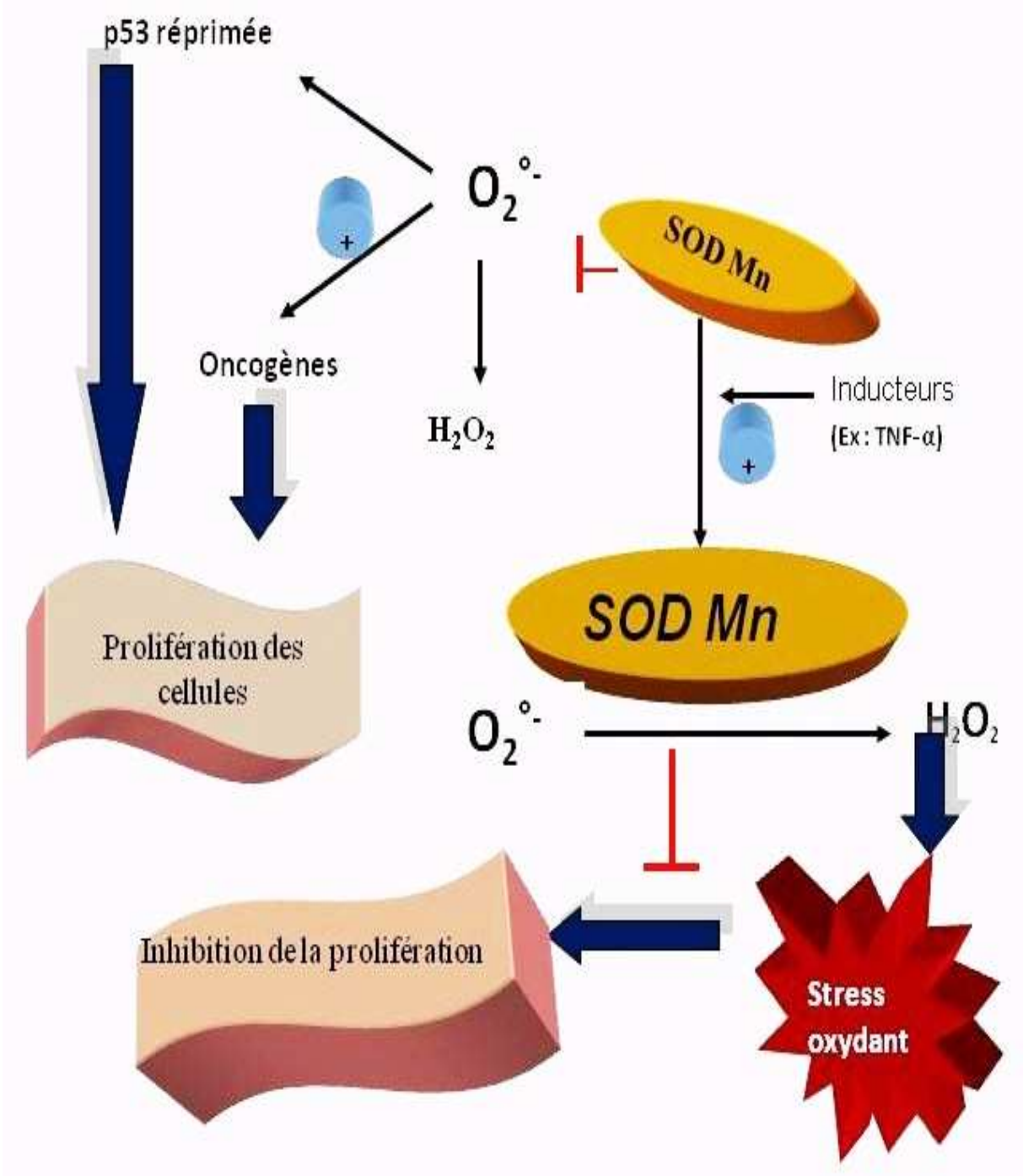


Figure 19 : Mécanismes moléculaires mis en jeu *in vitro* dans les cellules tumorales ayant la SOD Mn faiblement exprimée.

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 (Galeotti *et al.*, 2005) (Figure 20).

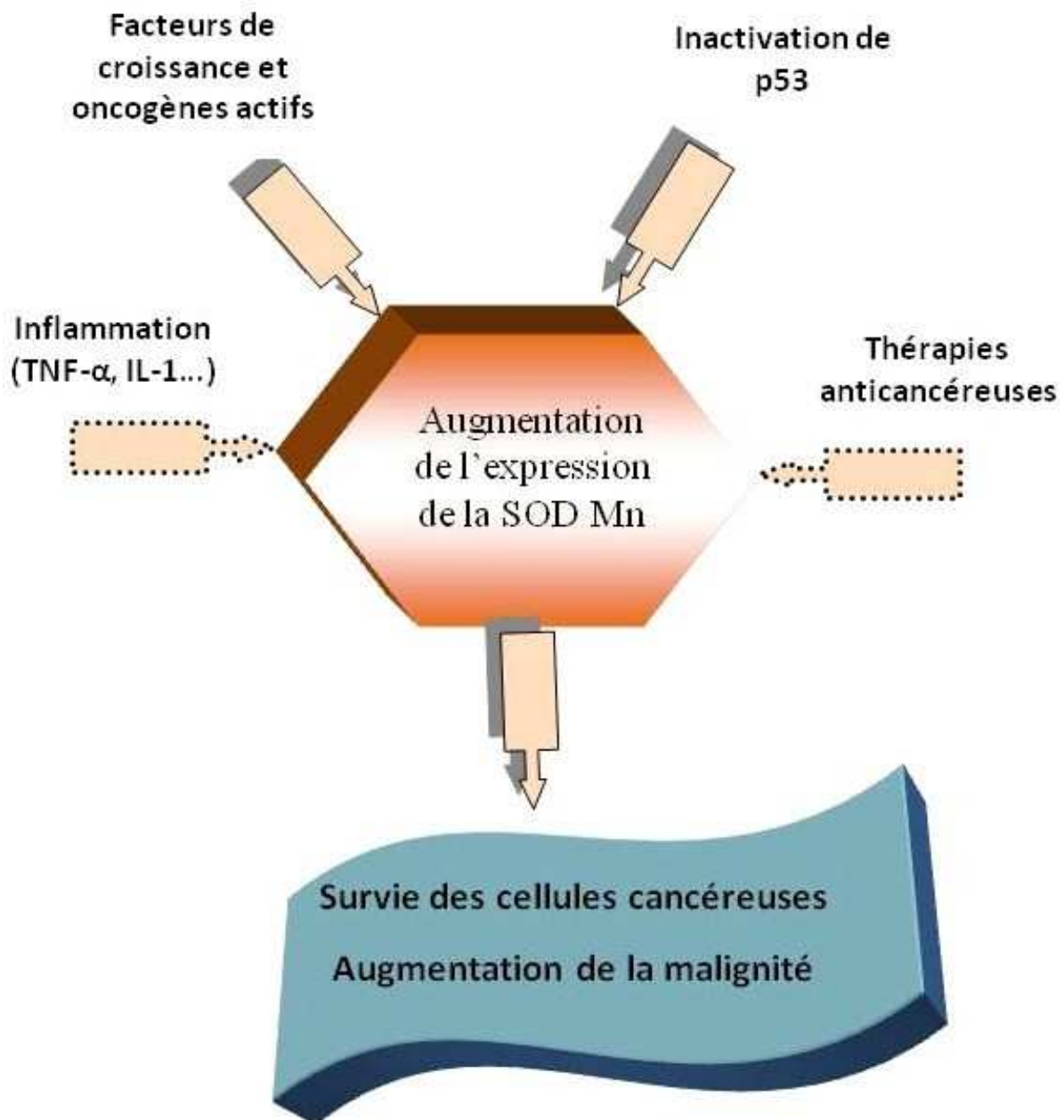


Figure 20 : Mécanismes possibles conduisant à une expression basale élevée de la SOD Mn dans certaines cellules cancéreuses.

(Modifiée d'après Pani *et al.*, 2004)

2.3.4.4 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 (Janssen *et al.*, 1998 ; Kahlos *et al.*, 1998 ; Nakata *et al.*, 1992; Nishida *et al.*, 1993 ; Ria *et al.*, 2001; Toh *et al.*, 2000b), 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'H₂O₂. Ce dernier est responsable, *via* l'activation de voie de signalisation et/ou de facteur de transcription comme AP-1, d'une induction de l'expression des enzymes de dégradation (MMP 1 et 2) ou de protéines constituant de la matrice extracellulaire dans des lignées cancéreuses, dont le pouvoir invasif est ainsi augmenté (**Figure 21**) (Nelson *et al.*, 2003; Ranganathan *et al.*, 2001; Wenk *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002a). Cette action est atténuée lorsque le gène de la SOD Mn est co-transfectée avec celui codant la catalase (Connor *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2003).

2.3.4.5 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 produits. Le développement des tumeurs nécessite un apport important en O₂ et en nutriments, qui est possible par une stimulation d'une néoangiogenèse. Une expression faible de la SOD Mn favorise une accumulation d'O₂^{°-}, 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'O₂^{°-} intracellulaire empêche l'activation de HIF-1 α et donc l'expression du VEGF, comme cela a été démontré dans les cellules tumorales mammaires MCF-7 (Kaewpila *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005). Cependant, une étude révèle qu'une accumulation d'H₂O₂ 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).

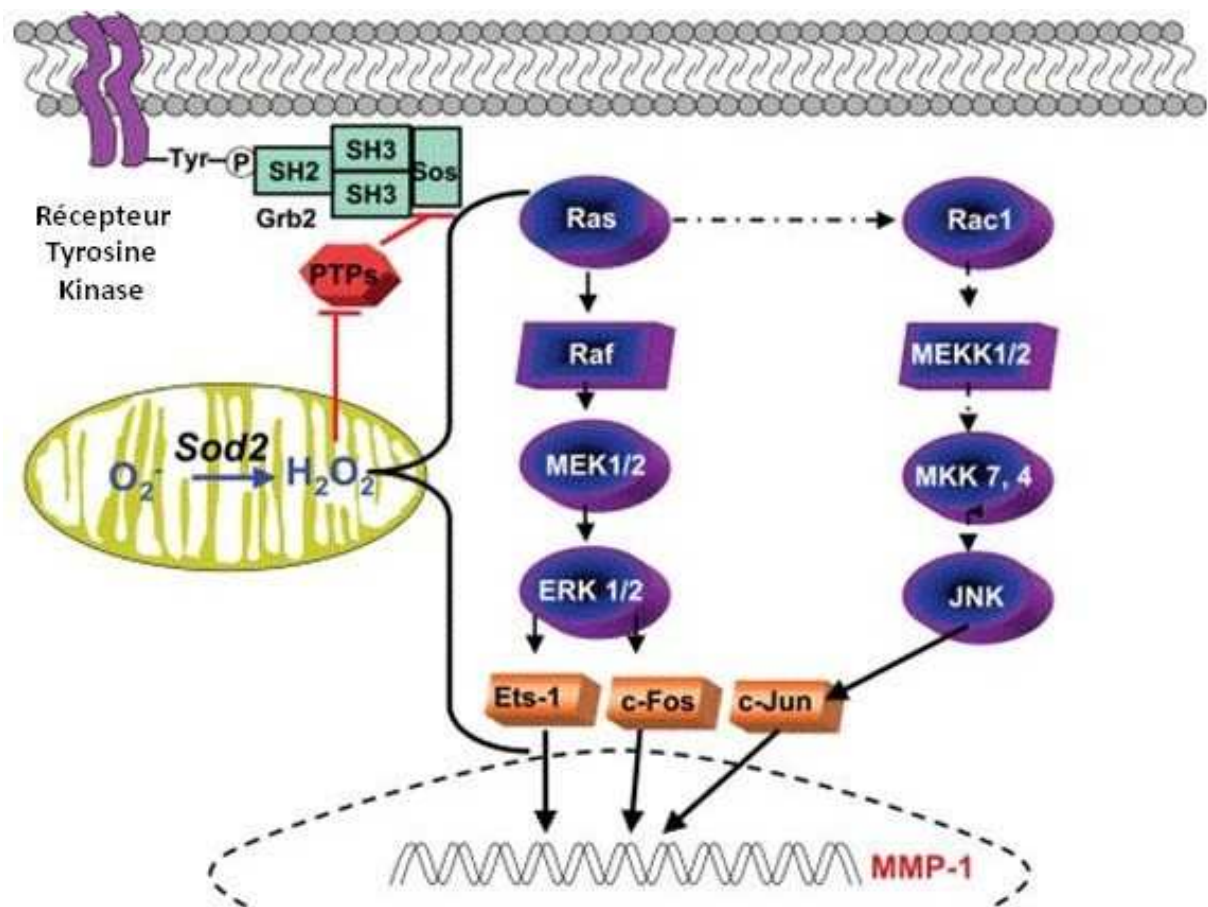


Figure 21 : Rôle possible de la SOD Mn dans l'invasion tumorale

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 Kinase, *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 (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).

2.3.5 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 (Doroshov *et al.*, 1991; Kinnula *et al.*, 1998; Mantymaa *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; Martin *et al.*, 2007; Murley *et al.*, 2002; Suresh *et al.*, 2003). De plus, l'introduction expérimentale du gène de l'enzyme antioxydante confère une résistance aux cellules vis-à-vis de molécules anticancéreuses, telle 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'O₂ en produisant des O₂^{°-}, 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 (Hirose *et al.*, 1993; Motoori *et al.*, 2001; St Clair *et al.*, 1992; Suresh *et al.*, 1994; Takada *et al.*, 2002; Urano *et al.*, 1995).

Le mécanisme d'induction de la SOD Mn par les substances anticancéreuses est mal défini. Il semble que l'O₂^{°-} soit en partie responsable de cette induction. Une étude rapporte également que l'exposition des cellules tumorales au TNF α leur confère une résistance acquise vis-à-vis des anthracyclines ou des radiations ionisantes (Benlloch *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 1994; Wong, 1995). 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 TNF α chez des patients atteints de leucémies (Kobayashi *et al.*, 1997). Ces résultats laissent à penser que les macrophages infiltrants 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 TNF α . Ce dernier est un activateur du complexe NF- κ B, qui 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 ont montré très récemment que la sous-unité RelB du facteur de transcription NF- κ B, est impliquée dans la réponse adaptative des cellules de carcinome de la prostate aux radiations ionisantes, en induisant l'expression de la SOD Mn (Guo *et al.*, 2003; Josson *et al.*, 2006; Murley *et al.*, 2004).

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).

2.3.6 Rôle de la SOD Mn dans le cancer du sein

2.3.6.1 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 $_2^{\circ-}$ 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- κ B 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* (Duan *et al.*, 2003; Manna *et al.*, 1998), ou des protéines impliquées dans la réparation des cassures de l'ADN (Li *et al.*, 2000). Parmi les gènes réprimés, il a été mis en évidence ceux codant le *VEGF1*, *IL1 β* , celui de l'enzyme convertissant le TNF α (Li *et al.*, 2000) 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'H₂O₂ 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 corrélée 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.

2.3.6.2 Régulation de l'expression du gène SOD2 dans les cellules tumorales mammaires

La régulation de l'expression du gène 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 *et al.*, 1999b; Bica *et al.*, 2008; Millikan *et al.*, 2004; Mitrunen *et al.*, 2001). 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 accessible les sites de fixation des facteurs de transcription présents dans la région proximale du gène de la SOD Mn (Hitchler *et al.*, 2008). Dans les cellules MCF-7, il convient également d'ajouter la régulation négative de l'expression de la

SOD Mn imposée par la fixation de la protéine DDB2 sur son site de fixation dans la région promotrice du gène de l'enzyme antioxydante (Minig *et al.*, 2009).

2.3.6.3 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 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 TNF α conduit à une réponse adaptative des cellules MCF-7 aux anthracyclines (Zyad *et al.*, 1994) ou aux radiations ionisantes (Guo *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 1993; Siemankowski *et al.*, 1999). Enfin, une étude récente montre que l'induction de l'expression de la SOD Mn par le tamoxifène, un antagoniste du récepteur aux œstrogènes, 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, le rôle de la SOD Mn dans le développement des tumeurs dépend en partie de son expression constitutive. Cependant, le(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans la régulation de cette expression constitutive n'est décrit dans les cellules tumorales, en particulier d'origine mammaire. Néanmoins dans le laboratoire, une étude récente a mis en évidence que la protéine Damaged DNA-Binding 2 protein (DDB2) est impliquée dans la régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires.

2.4 La protéine Damaged DNA-binding 2 (DDB2)

2.4.1 Structure du gène et de la protéine DDB2

La protéine humaine “Damaged DNA-binding 2 (DDB2), a été identifiée pour la 1^{ère} 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, qui sont 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 proximal du gène est situé à 292 pb du site d’initiation de la transcription, et ne possède pas

de boîte 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).

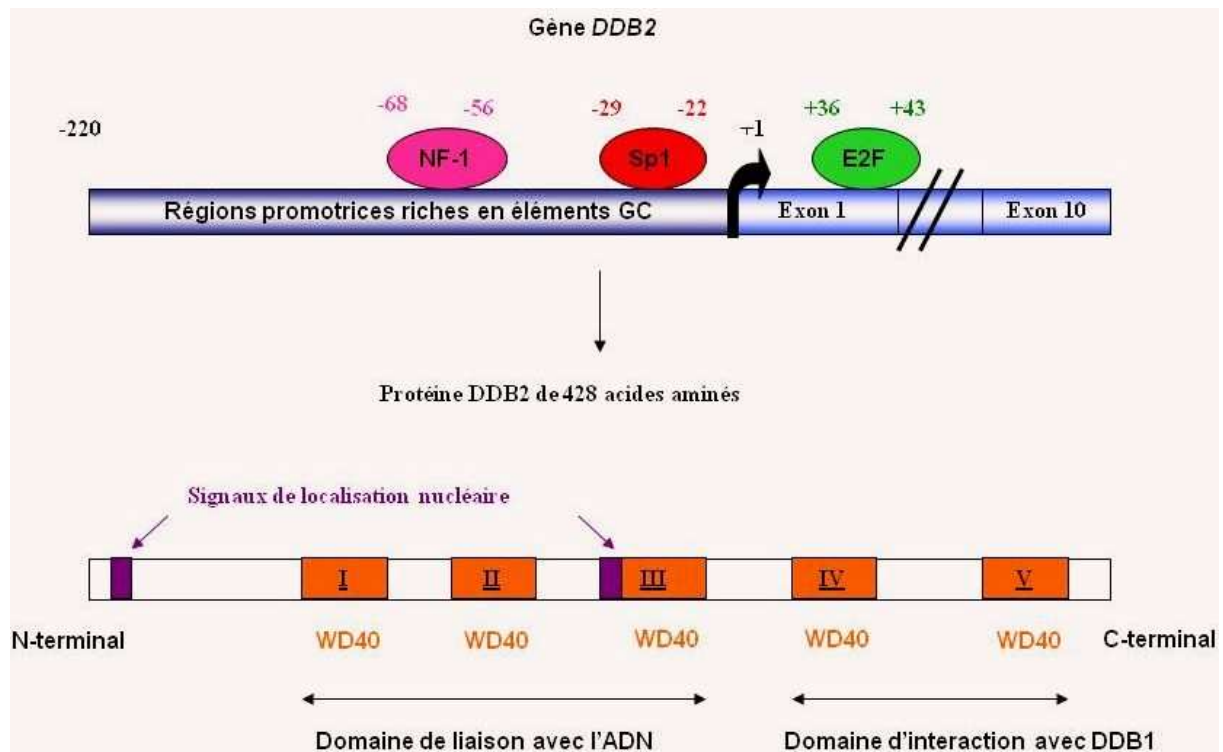


Figure 22 : Représentation schématique de la structure du gène et de la protéine DDB2 humaine.

(D'après Raptic-Ortin *et al.* 2003 et Nicols *et al.* 2003).

2.4.2 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 (Moser *et al.*, 2005; Tang et Chu, 2002). 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, 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* (Itoh *et al.*, 1999; Nichols *et al.*, 2000; Nichols *et al.*, 1996). L'injection 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).

2.4.3 Rôle biologiques de la DDB2

2.4.3.1 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, qui possède une activité E3 ligase (Angers *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006a ; Nag *et al.*, 2001). 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).

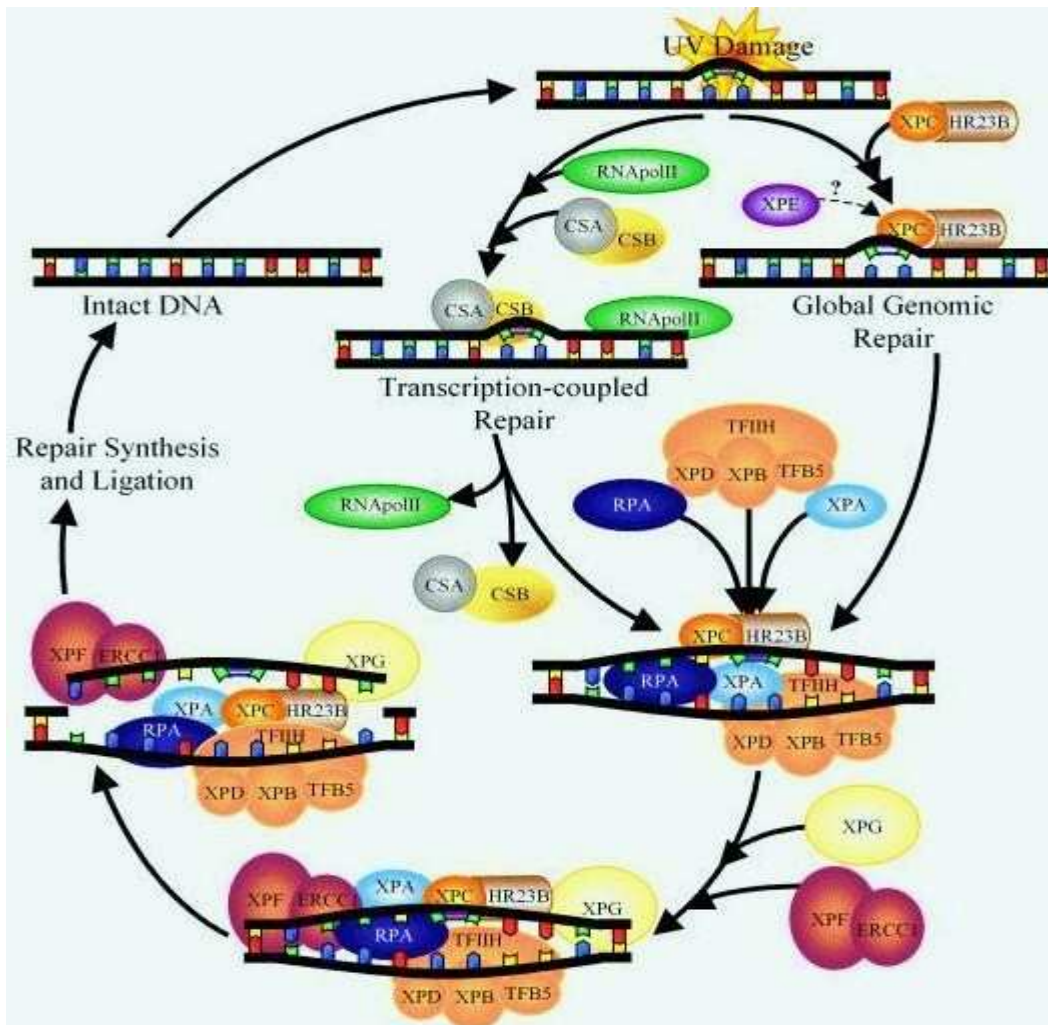


Figure 23 : Mécanisme de réparation par excision de nucléotide (NER).

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).

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 (Fitch *et al.*, 2003b; Rapic Otrin *et al.*, 1998). 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 Culline-4A (Cul-4A), dont l'activité est dépendante d'une phosphorylation par l'oncoprotéine tyrosine kinase c-Abl (Chen *et al.*, 2006; El-Mahdy *et al.*, 2006; Matsuda *et al.*, 2005; Rapic-Otrin *et al.*, 2002). 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 1^{ère} 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 Cul4A-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 (Kim et Kipreos, 2007; Senga *et al.*, 2006). La dégradation de CDT1 conduit à un blocage de la réplication. De même, la 2^{ème} 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 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).

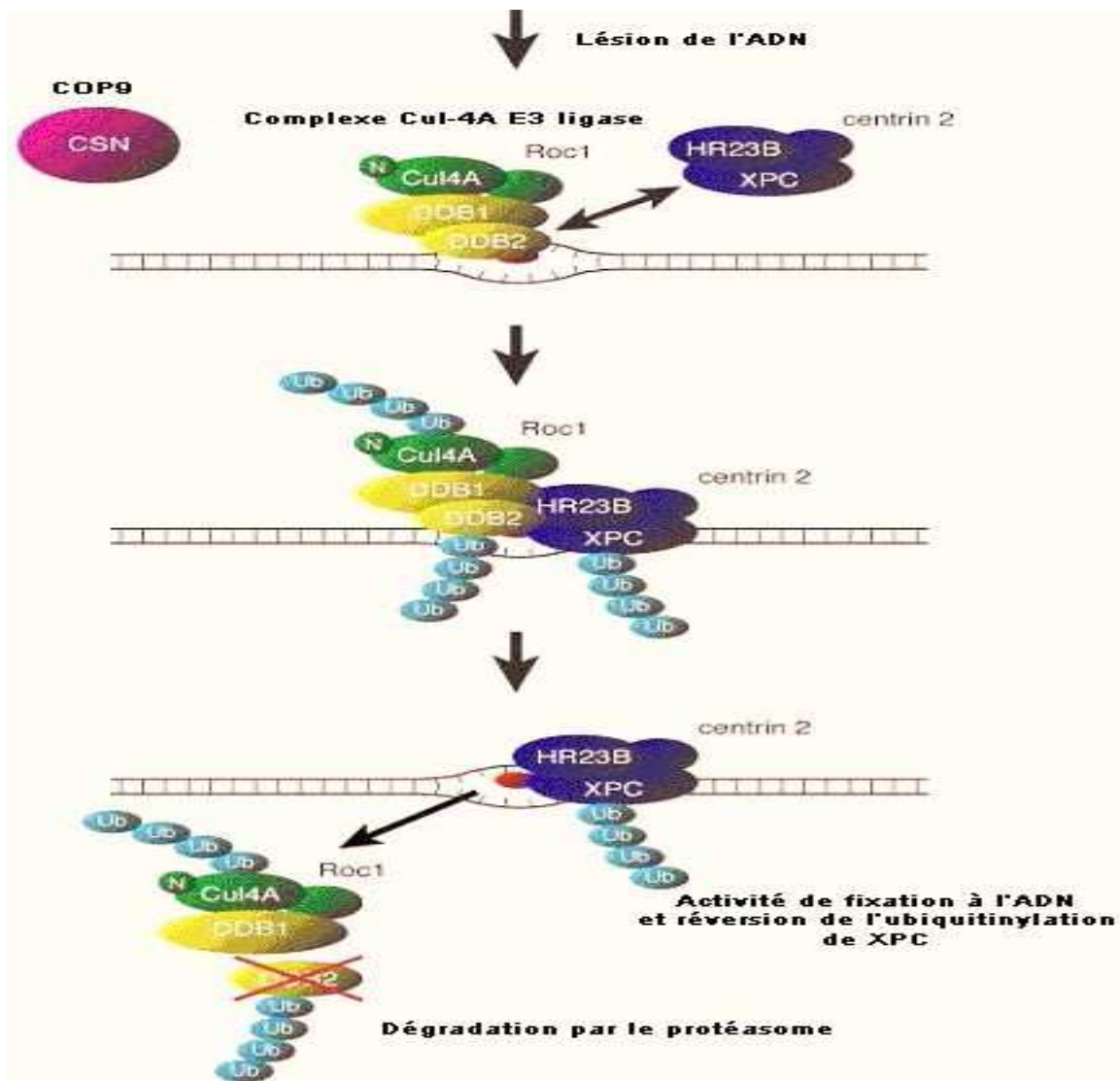


Figure 24 : : Processus d'ubiquitinylation de DDB2 par la Culline-4A lors de lésions sur l'ADN provoquées par une irradiation.

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 polyubiquitinylation 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).

L'activité du complexe DDBP dépend de BRCA1 et 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).

2.4.3.2 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 (Datta *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2001; Otrin *et al.*, 1997). 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 Ropic-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-Cul4A-ROC1* sur le remodelage de la chromatine, d'une façon indépendante de la *DDB2*, puisque ce complexe a été montré, d'une part interagir avec plusieurs protéines ayant des domaines répétés de type WD40, d'autre part réguler la méthylation des histones H3 (Higa *et al.*, 2006).

2.4.3.3 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 (Nag *et al.*, 2001; Shiyanov *et al.*, 1999a). C'est le cas également de l'interaction entre la DDB2 et le domaine d'activation d'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 p21Waf1/Cip1 et la p27 Kip1, ceci indépendamment de la DDB2 (Bondar *et al.*, 2006; Cang *et al.*, 2007; Nishitani *et al.*, 2006).

2.4.3.4 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; Itoh *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2005). 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.

2.4.3.5 Régulation de la transcription

La protéine DDB2 possède plusieurs domaines structuraux, en particulier les domaines répétés de type WD40, qui se retrouvent 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; Shiyarov *et al.*, 1999b), la protéine CBP/p300 et le complexe STAGA (Datta *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2001; Otrin *et al.*, 1997). Les deux derniers complexes protéiques appartiennent à la famille des histones acétyltransférases. L'ensemble de ces interactions suggèrent que la DDB2 participerait 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 favoriser l'accès des protéines de réparation au niveau des lésions de l'ADN (Kapetanaki *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006), mais également pour la transcription des gènes en absence de lésions induites par les UV (Datta *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2001; Otrin *et al.*, 1997).

Très récemment, il a été montré dans le laboratoire, que la DDB2 contribue à la régulation de l'expression de la SOD Mn, en maintenant une transcription constitutive faible du gène. Cette activité dépend de la fixation spécifique de la DDB2 sur un élément de réponse localisé dans la région promotrice du gène codant l'enzyme antioxydante (Minig *et al.*, 2009). Cet élément de réponse correspond à un pentanucléotide répété et séparé par deux nucléotides charnières. Ces résultats suggèrent l'existence d'autres domaines dans la structure de la DDB2, qui lui permettent d'assurer cette nouvelle activité biologique. D'autres gènes cibles sont d'ailleurs en cours de caractérisation dans le laboratoire.

3 OBJECTIF 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. Dans le cas de la DDB2, plusieurs études tendent à montrer que cette protéine serait impliquée dans d'autres fonctions biologiques, alors que son rôle exact dans la réparation de l'ADN n'est pas clairement défini. Cependant, l'implication biologique de cette protéine dans le développement des tumeurs n'est pas connue.

Le travail présenté dans cette thèse repose sur des résultats préliminaires, qui ont montré une expression distincte de la SOD Mn selon l'état métastatique des cellules tumorales mammaires. L'expression constitutive de la SOD Mn est faible dans les cellules non métastatiques et ER-positives, mais est fortement élevée dans les cellules métastatiques et ER-négatives, suggérant une implication biologique différente de l'enzyme antioxydante selon la malignité des cellules tumorales mammaires. Des études entreprises dans le laboratoire ont également montré dans une lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire, qu'il existe une relation entre la DDB2 et la SOD Mn, sur la base de la mise en évidence d'une interaction entre la 1^{ère} et une région du promoteur du gène codant l'enzyme antioxydante. Les conséquences de cette interaction sur l'expression de la SOD Mn dans les cellules tumorales mammaires feront prochainement l'objet d'une autre thèse de Doctorat réalisée dans le laboratoire.

Sur la base de ces résultats, les objectifs principaux de la présente Thèse étaient donc de montrer l'importance biologique à la fois de la SOD Mn et de la DDB2, dans la prolifération 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-22TM) et **T-47D** (numéro ATCC® : HTB-133TM) non métastatiques, qui expriment le

récepteur aux œstrogènes (ER+) et la protéine p53 fonctionnels (Brooks *et al.*, 1973; Keydar *et al.*, 1979),

- les lignées épithéliales d'adénocarcinomes mammaires **MDA-MB231** (numéro ATCC® : HTB-26TM) et **SK-BR-3** (numéro ATCC® : HTB-30TM), métastatiques, qui expriment une p53 mutée et non fonctionnelle, mais pas le récepteur aux œstrogènes (ER-) (Cailleau *et al.*, 1978; Trempe, 1976).

CHAPITRE 2

RESULTATS

4 RESULTATS

4.1 Implication de la SOD Mn dans la croissance et les propriétés invasives des cellules tumorales mammaires humaines oestrogènes-indépendantes

4.1.1 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, oestrogènes 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 oestrogènes indépendantes, qui sont invasives et métastatiques, contrairement aux cellules oestrogènes dépendantes. Dans d'autres types de cellules cancéreuses, l'expression constitutive forte est corrélée avec les propriétés invasives et métastatiques de ces cellules tumorales (Malafa *et al.*, 2000; Toh *et al.*, 2000a).

4.1.2 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, aux niveaux transcriptionnel et traductionnel (Western blot et activité sur gel), 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 SKBR3.

La surexpression de la SOD Mn est associée à un taux faible des enzymes comme la catalase et la GPX, mais pas la peroxyrédoxine 3, et s'accompagne ainsi d'une production importante d'H₂O₂ dans les cellules MDA-MB231, comparativement aux cellules MCF-7. Le rôle de la SOD Mn surexprimée dans les cellules MDA-MB231 a été étudiée à partir d'un modèle de cellules tumorales dont l'expression de l'enzyme antioxydante est inhibée grâce à la construction d'un vecteur plasmidique réalisé dans le laboratoire et permettant la

transcription d'ARN antisens correspondants. L'inhibition de l'expression de la SOD Mn a été vérifiée à la fois par western blot et par évaluation de l'activité de l'enzyme antioxydante sur gel. Aucun changement dans l'expression de la SOD Cu/Zn n'a été observé.

Dans les cellules MDA-MB231 dont l'inhibition de l'expression de la SOD Mn est estimée à 50%, nous avons observé, 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 (diminution du temps de doublement), associée à une diminution de l'expression du marqueur PCNA mais sans une 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, l'addition au milieu de culture d'antioxydants (NAC, pyruvate), éliminant spécifiquement 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 significative de l'activité de la gélatinase, la MMP-9.

4.1.3 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 oestrogènes-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.

Article 1 : “Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells.

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 actions 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

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

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 Vandoeuvre-les-Nancy, France
e-mail: Philippe.Becuwe@sbiol.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

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 $O_2^{\cdot-}$ 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% CO₂. 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 $17,000 \times g$ 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 μ M 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 μ g) 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 H₂O₂ substrate remaining after the action of catalase. One unit of catalase was defined as 1 μ mole of H₂O₂ degraded into O₂ and H₂O/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'-dichlorofluorescein-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 μ M MnTMPyP. For the assays, the culture medium was replaced with PBS containing 50 μ M 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 μ l 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 H₂O₂ for 30 min after incubation with DCFH-DA. To show the specificity of intracellular peroxide measurement, cells were incubated with 50 μ M 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 μ l 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 μ l 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 AGCTCTAGAGTTTACTTTTTCGAAGCCATG-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 *Kpn*I and *Xba*I 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 \times 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 CaCl₂, 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 Merrill et al. [32].

Statistical analysis

Measurements from DCF fluorescence, enzyme and GSH assays, cell growth and colony formation were expressed as means \pm 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 \pm SD. Results from Western blotting and SOD activities were expressed as fold increases of values from MCF-7 cells \pm SD. Results from three separate experiments of the invasion assays were expressed as percentages \pm 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

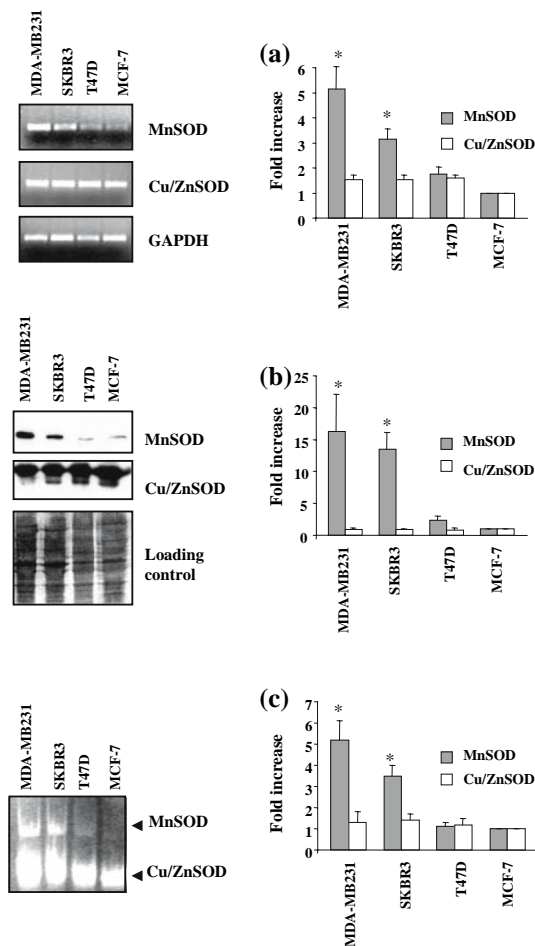


Fig. 1 MnSOD and Cu/ZnSOD expressions in human estrogen-independent and dependent breast cancer cells. **(a)** Total RNA was extracted from cells, then subjected to RT-PCR analysis. The relative levels of MnSOD and Cu/ZnSOD mRNAs were normalized to those of GAPDH mRNA. **(b)** MnSOD and Cu/ZnSOD proteins were analyzed in the total proteins (50 μ g) 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 * $P < 0.05$

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.

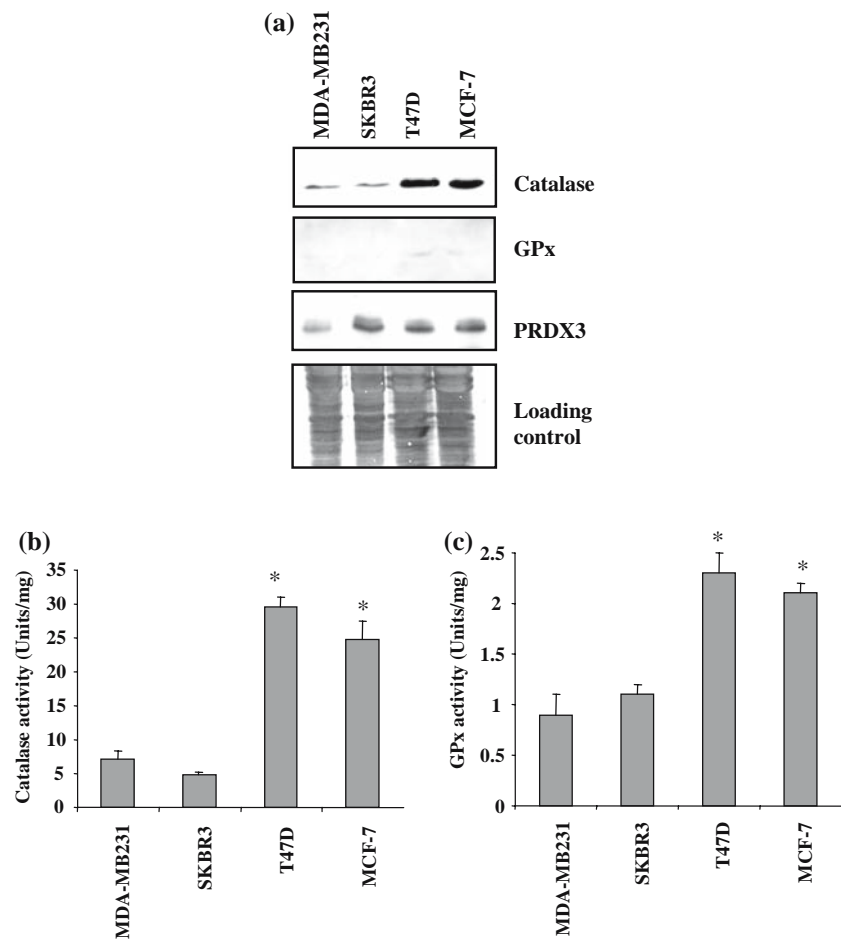
H₂O₂-detoxifying enzymes exhibit a low-basal expression in estrogen-independent breast cancer cells

As with the MnSOD content, expression of the major H₂O₂-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 \pm 2.74) and T47D (29.65 \pm 1.34) than in MDA-MB231 (7.11 \pm 1.31) and SKBR3 cells (4.78 \pm 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 \pm 0.10 and 2.31 \pm 0.22, respectively) was higher than in MDA-MB231 and SKBR3 cells (0.92 \pm 0.19 and 1.13 \pm 0.12, respectively).

High MnSOD content in MDA-MB231 cells is associated with high level of intracellular H₂O₂

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 H₂O₂ 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 H₂O₂-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 H₂O₂.

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 H₂O₂ 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).

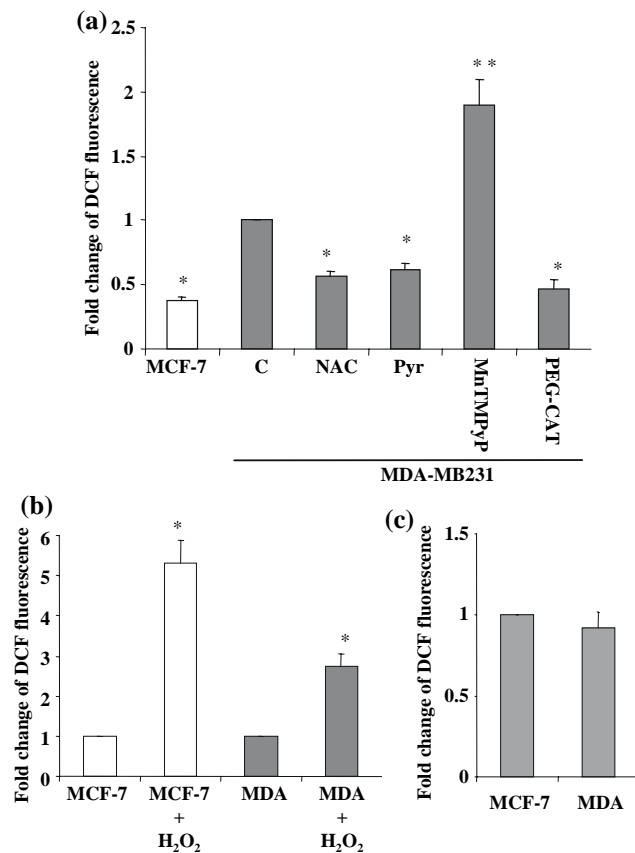


Fig. 3 Intracellular peroxide production in MDA-MB231 cells. **(a)** MDA-MB231 cells either treated or not for 24 h with 5 mM NAC, 10 mM pyruvate (Pyr), 2 μ M MnTMPyP or 200 U/ml PEG-CAT and untreated MCF-7 cells were stained with the oxidation-sensitive fluorescent probe DCFH-DA. The DCF fluorescence intensities, corresponding to the levels of intracellular H₂O₂, 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 $10.9 \pm 1.2\%$). No significant difference was observed between control Wt and Neo cells (plating efficiency value of $13.5 \pm 2.9\%$).

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

We investigated the role of H₂O₂ 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 $9.9 \pm 1.5\%$). These results suggest that H₂O₂ plays an important role in MDA-MB231 cell growth.

MnSOD modulates the invasive properties of MDA-MB231 cells through H₂O₂ production

To investigate the effects of MnSOD down-regulation and of H₂O₂ 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

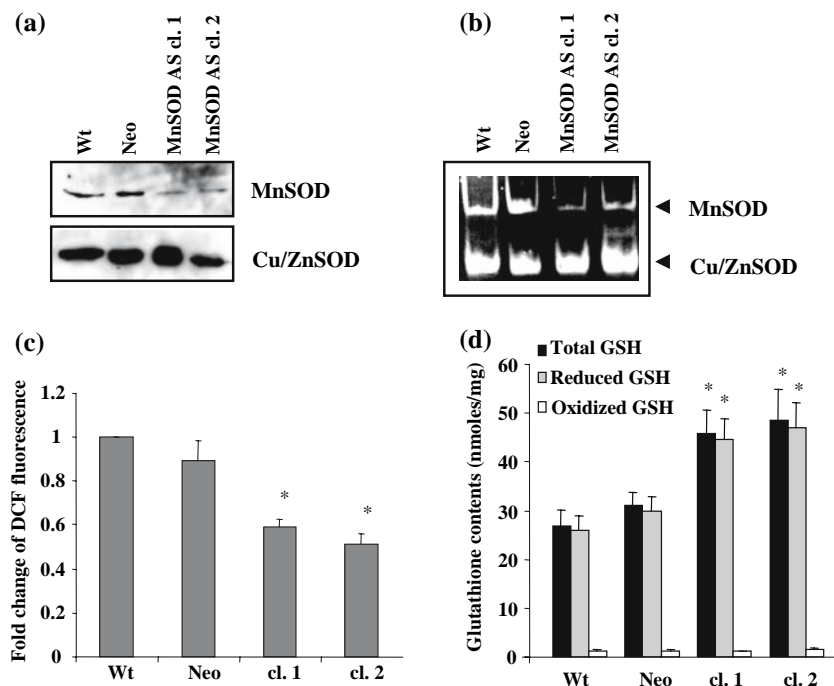


Fig. 4 MnSOD protein and activity levels and intracellular H_2O_2 and GSH contents in MnSOD antisense-transfected MDA-MB231 cells. **(a)** MnSOD protein level was assessed by Western blot analysis using equal amounts of protein (50 μ g) extracted from parental cells (Wt), empty vector-transfected cells (*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 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 nmol/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- κ B, 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

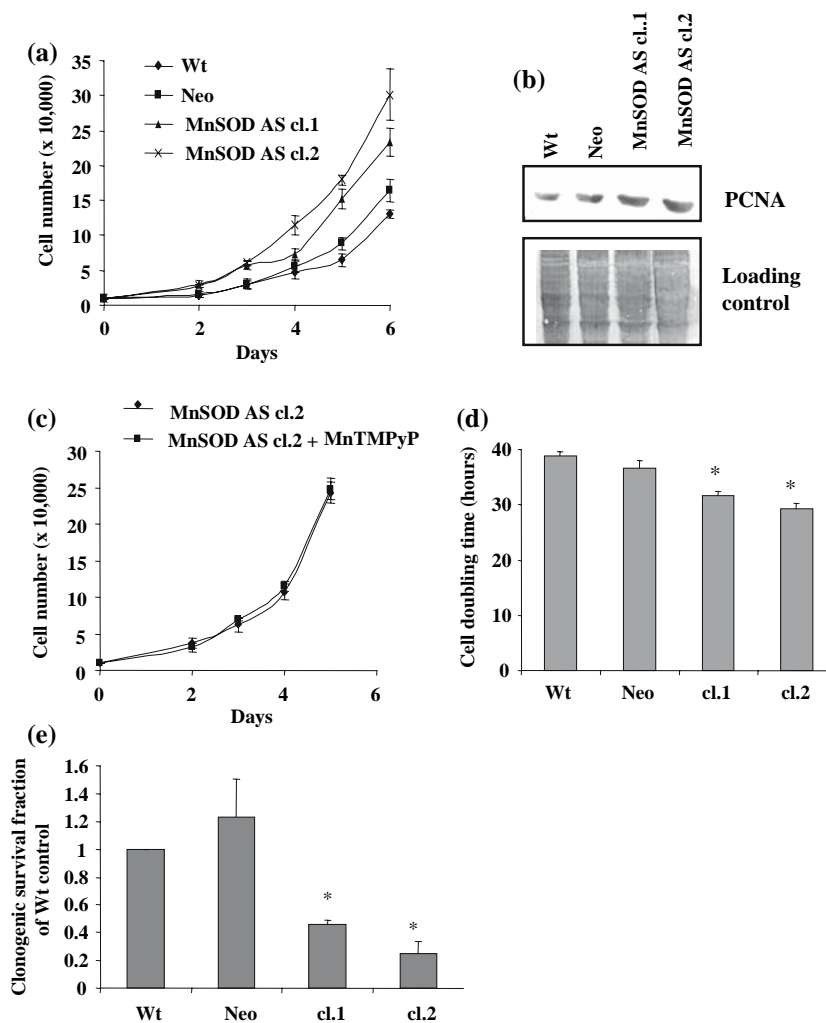


Fig. 5 Effect of MnSOD suppression on growth and colony formation of MDA-MB231 cells. **(a)** Parental cells (Wt), empty vector-transfected cells (*Neo*) and the two MnSOD antisense-transfected cell clones (*MnSOD AS cl.1* and *cl.2*) were plated in 24-well dishes (1×10^4 per well) and cultured in complete 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 μ g) 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 μ M 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) \times 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

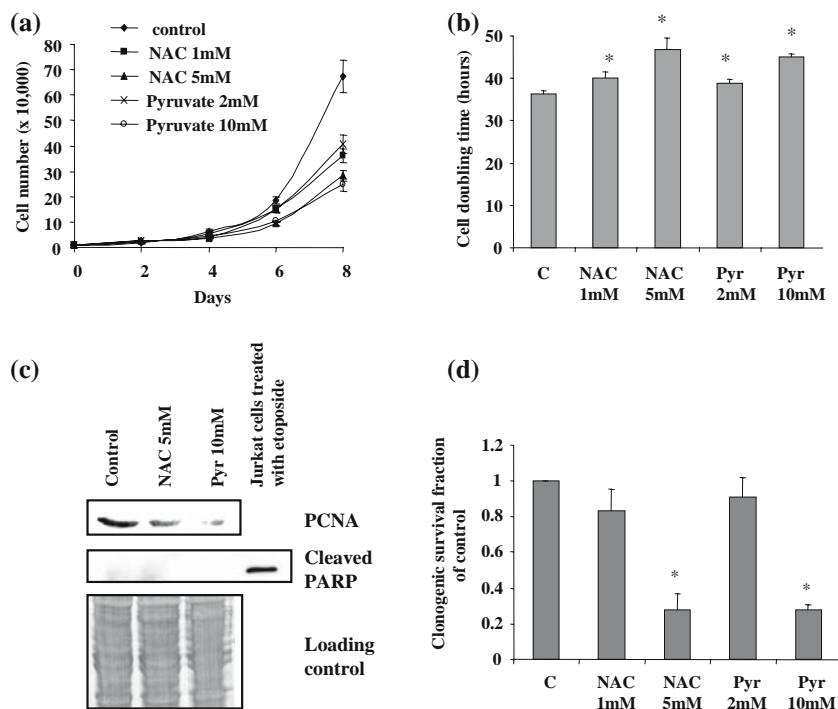


Fig. 6 Effect of H_2O_2 scavengers on growth and colony formation of MDA-MB231 cells. **(a)** MDA-MB231 cells were plated in 24-well dishes (1×10^4 per well) and cultured in complete medium containing H_2O_2 scavengers NAC (1 or 5 mM) or pyruvate (2 or 10 mM). Cell numbers were counted on days 2, 3, 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 μ g) 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) \times 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

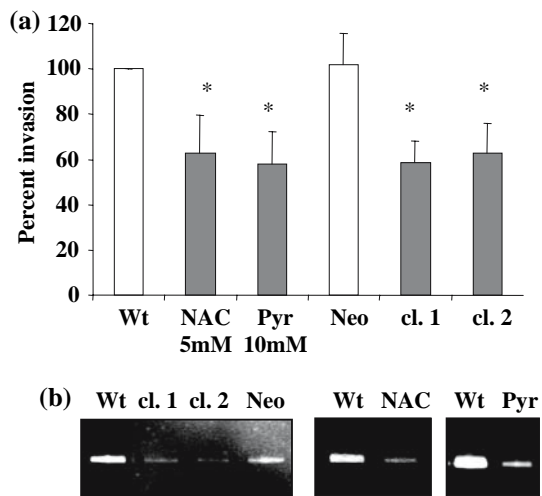


Fig. 7 Effect of MnSOD suppression and H₂O₂ scavengers on MDA-MB231 cell invasion and on MMP-9 activity. **(a)** Parental cells (Wt), empty vector-transfected cells (*Neo*), the two MnSOD antisense-transfected cell clones (MnSOD AS cl.1 and cl.2) and parental cells treated for 8 days with either 5 mM 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-H₂O₂-detoxifying enzyme expression gives rise to an overproduction of H₂O₂ in MDA-MB231 cells. We postulate that the accumulation of H₂O₂ in these cells also plays a role in cell growth. We demonstrated this by experiments using the antioxidants NAC and pyruvate, specific H₂O₂ 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ is an important mediator in cell proliferation, because this ROS activates the MAPK-dependent signaling pathway and transcription factors such as NF- κ B 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 H₂O₂ levels, and leads to a decline in cell growth, and

that this tumor suppressive effect of MnSOD was reversed with addition of H₂O₂ scavengers or by co-expression of GPx or catalase [5, 17]. This suggests a distinct sensitivity of cancer cells to H₂O₂, 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ in a conditioned medium of cultured smooth muscle cells and macrophages [52]. It is likely that H₂O₂ modulates the MMP-9 activity in MDA-MB231 cells through the MAPK and transcription factors AP-1 and NF- κ B 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

- Matés JM (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153:83–104
- 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
- Kinningham 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
- 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
- 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
- Bravard A, Sabatier L, Hoffschir F, Ricoul M, Luccioni C, Durtillaux B (1992) SOD2: a new type of tumor-suppressor gene? *Int J Cancer* 51:476–480
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Cobbs CS, Levi DS, Aldape K, Israel MA (1996) Manganese superoxide dismutase expression in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 56:3192–3195
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Oberley LW (2005) Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression. *Biomed Pharmacother* 59:143–148
- 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
- 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
- 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
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- 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. Merrill CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH (1981) Ultra-sensitive 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, Siple 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

4.2 Rôle de la DDB2 dans la croissance tumorale mammaire

4.2.1 Introduction

La protéine DDB2 est connue pour son rôle dans le système de réparation des lésions de l'ADN par excision de nucléotides, en s'associant avec la protéine DDB1 pour former le complexe UV-DDB (Nag *et al.*, 2001). Elle agirait en interagissant avec des protéines, comme la CBP/p300, un membre de la famille des histones acétyltransférases et le complexe STAGA, sur le remodelage de la chromatine, afin de rendre les lésions de l'ADN plus accessible aux protéines de réparation.

Dans les cellules normales, la DDB2 est considérée comme un suppresseur de tumeur, car l'inactivation de son gène entraîne chez la souris non seulement une sensibilité importante vis-à-vis des UV, mais également l'apparition de tumeurs spontanées (Alekseev *et al.*, 2005; Itoh *et al.*, 2004; Itoh *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2005). Certaines données dans la littérature laissent supposer que la DDB2 joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire, car son expression est régulée durant les phases du cycle cellulaire et n'est pas détectable dans les cellules ne se divisant pas (Nag *et al.*, 2001). De plus, la DDB2 interagit avec des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, comme la culline-4A et le facteur de transcription E2F1 (Hayes *et al.*, 1998; Nag *et al.*, 2001; Shiyanov *et al.*, 1999a ; Shiyanov *et al.*, 1999b).

A côté de ces données de la littérature, l'interaction entre la DDB2 et E2F1, un marqueur de la prolifération bien décrit dans la croissance des tumeurs mammaires (Zhang *et al.*, 2000), nous a conduit à émettre l'hypothèse de travail, que la sous-unité du complexe UV-DDB pouvait jouer un rôle dans le développement du cancer du sein. En parallèle dans le laboratoire, la présence de la DDB2 a été révélée dans la lignée de cellules tumorales mammaires MCF-7.

4.2.2 Résultats obtenus

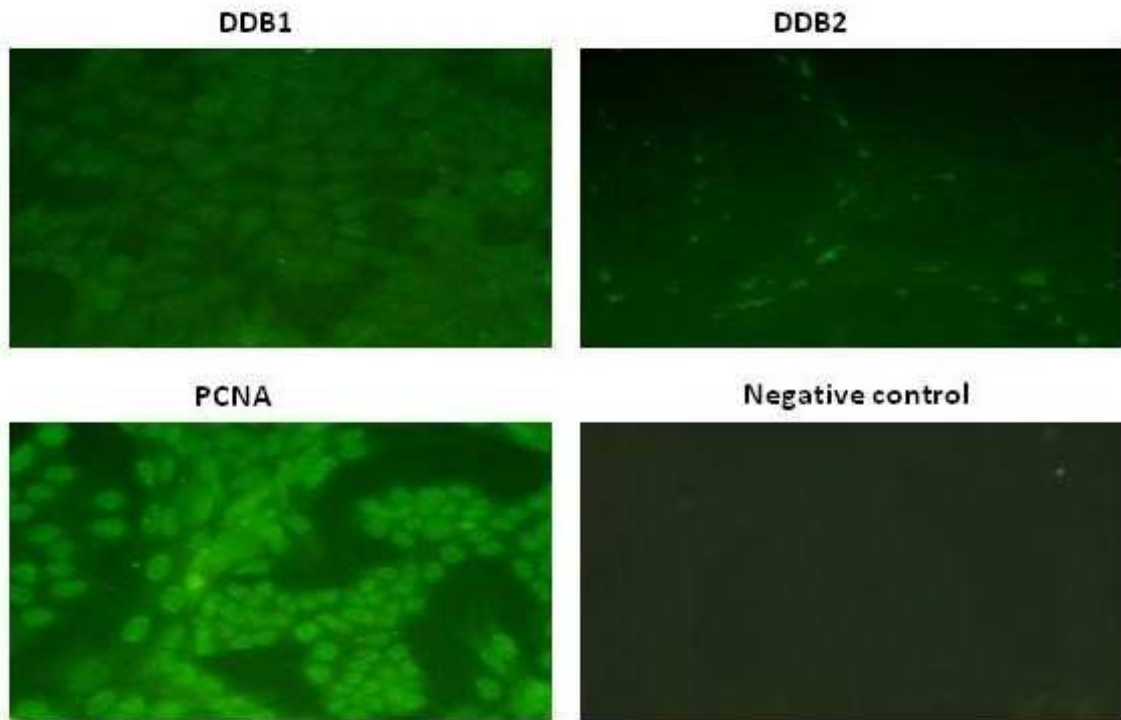
4.2.2.1 Etude de l'expression de DDB2 dans les lignées de cellules tumorales et dans les tumeurs mammaires

L'expression de la protéine DDB2 a été réalisée aux niveaux transcriptionnel par RT-PCR et traductionnel par Western blot, sur plusieurs lignées de cellules tumorales mammaires ER-positives et négatives, et comparée à une lignée de cellules épithéliales mammaires normales HMEC. Les résultats montrent que le gène codant la DDB2 est surexprimée au

niveau transcriptionnel dans les cellules tumorales mammaires, ainsi que dans les tumeurs mammaires (8 sur 16 au total, avec un $p = 0,0208$) exprimant le récepteur aux œstrogènes. De même, à partir du développement récent dans le laboratoire, d'anticorps polyclonaux reconnaissant spécifiquement la protéine DDB2, nous avons également montré que la protéine DDB2 est fortement présente dans les cellules tumorales mammaires ER-positives. Cette expression est cependant très faible mais pas nulle dans les cellules tumorales n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes, ainsi que dans les cellules épithéliales normales HMEC. En revanche, l'expression de la DDB1 est relativement constante au niveau transcriptionnel entre les différentes lignées cellulaires, mais est significativement plus forte au niveau traductionnel dans les cellules ER-positives et les HMEC que dans les cellules ER-négatives.

La localisation de la protéine DDB2 a été mise en évidence par la méthode d'immunofluorescence et par fractionnement cellulaire suivi d'une analyse par Western blot. L'analyse par immunofluorescence révèle que la protéine DDB2 est strictement localisée dans le noyau des cellules MCF-7, sous forme de points condensés, tandis que la protéine DDB1 s'observe à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau sous une forme diffuse (**Figure 25A**). De même, l'analyse par Western blot met en évidence la protéine DDB2 uniquement dans la fraction nucléaire et non cytoplasmique (**Figure 25B**).

A



B

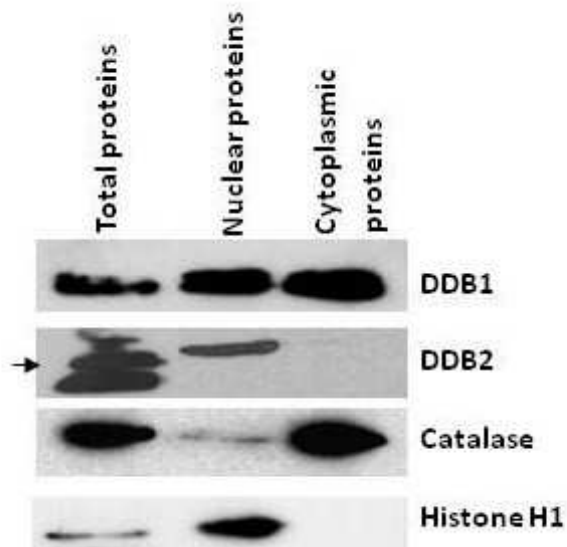


Figure 25 : A. Présentation de la localisation de la DDB1 et de la DDB2 par l'immunofluorescence. B. Analyse par Western blot.

4.2.2.2 Développement des modèles cellulaires transgéniques

Afin d'étudier l'importance biologique de la protéine DDB2 dans les cellules tumorales mammaires, nous avons développé des modèles cellulaires transgéniques, dans lesquels le gène codant cette protéine est soit inhibé par la stratégie de l'ARN interférence, soit surexprimé après introduction de l'ADNc correspondant.

A partir de trois séquences d'ARN interférants (ARNi), proposés selon le logiciel algorithmique de la Société Eurogentec, nous avons testé par transfection transitoire, leur efficacité à inhiber l'expression du gène *ddb2* après 24 heures, dans les cellules MCF-7 parentales, mais également dans les cellules épithéliales de rein de singe (COS-7) ayant reçu le gène codant une protéine DDB2 étiquetée par les épitopes correspondant à Myc et plusieurs Histidines (vecteur plasmidique préalablement construit dans le laboratoire). Dans les deux types cellulaires, les résultats montrent que l'ARNi correspondant à la séquence 3 présente la plus grande capacité à inhiber l'expression du gène de la DDB2 (**Figure 26**). La séquence correspondante à cet ARN interférant a été introduite dans un vecteur plasmidique de type pSIREN, qui porte un gène de sélection à la puromycine. Les cellules MCF-7 parentales, transfectées avec cette construction plasmidique, ont été sélectionnées afin d'observer l'ARN interférence de façon stable sur l'expression de la DDB2. Parmi une trentaine de clones cellulaires isolés, nous en avons retenu deux, appelées clone 2 et clone 3, dont l'expression de la DDB2 est inhibée au niveau transcriptionnel et traductionnel à plus de 80% (**Figure 27**). Des cellules MCF-7 témoins ont été transfectées avec le plasmide pSIREN contenant une séquence permettant la synthèse d'un ARNi non spécifique (contrôle siRNA).

La construction antérieure à ce travail d'un vecteur plasmidique qui contient l'ADNc codant la DDB2 et un gène de sélection à la néomycine, a permis de développer une lignée de cellules MDA-MB231, qui surexprime cette protéine. A partir de 70 clones, sélectionnés durant 3 semaines et isolés par dilution limite, puis analysés par Western blot a pour leur niveau d'expression de la DDB2, nous avons pu obtenir une lignée stable de cellules MDA-MB231 appelé MDA-DDB2. Les cellules témoins ont été transfectées avec le vecteur plasmidique ne contenant pas d'ADNc et ont été sélectionnées par la néomycine de façon identique (MDA Neo).

Les modèles cellulaires transgéniques, que nous avons développés dans ce travail, dont l'expression de la DDB2 est modulée, ont contribué à la mise en évidence du rôle de cette protéine dans la régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn dans les

cellules tumorales mammaires, dont l'ensemble des résultats est présenté dans l'article 3 (Voir ANNEXE).

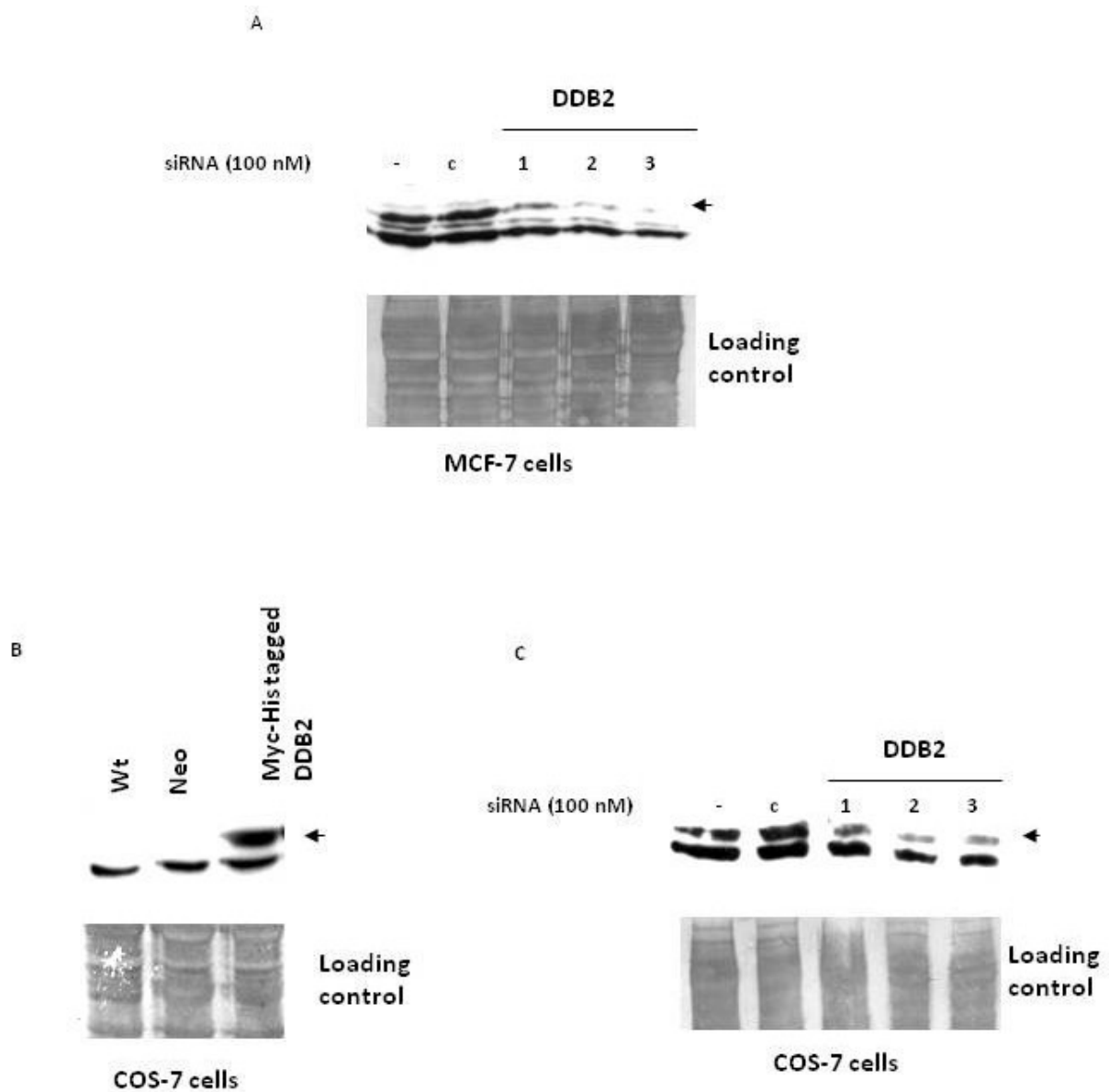


Figure 26 : Analyse par western blotting

A, C. Analyse par western blot du taux de protéine DDB2 dans les cellules d'adénocarcinome mammaire humaine MCF-7 et dans les cellules épithéliales rénales de singe immortalisées COS-7 transfectées avec d'une concentration de 100nM d'ARNi pendant 24h. B. représentation par western blot la surexpression de la DDB2 étiquetée par les épitopes correspondant à Myc et plusieurs Histidines.

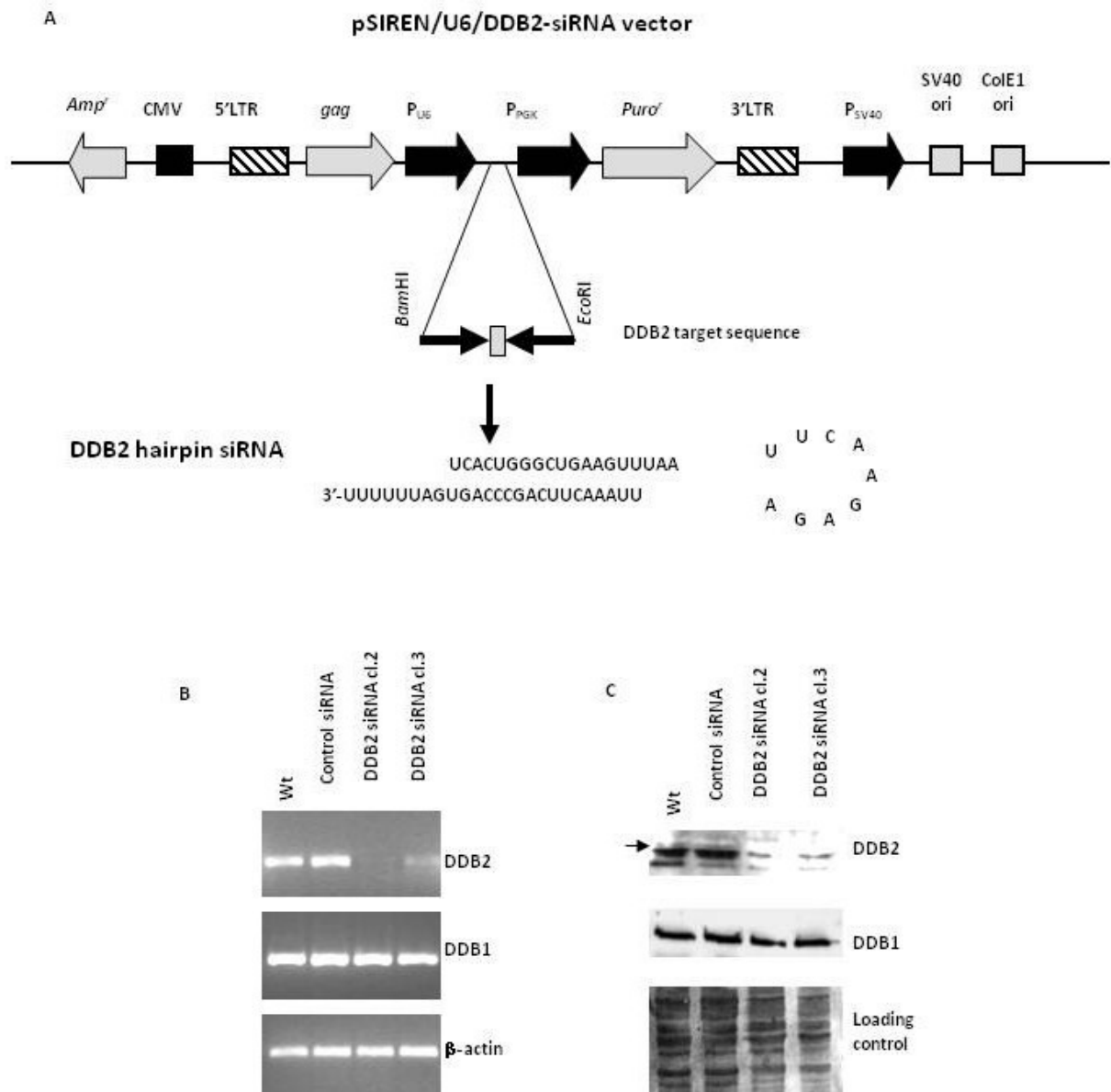


Figure 27 : A. Carte du vecteur plasmidique pSIRN/U6/DDB2-siRNA. B, C. Présentation de l'inhibition de la surexpression de la DDB2 dans les cellules MCF-7 transfectées avec le plasmide à l'origine des ARNi par PCR et Western blot.

4.2.2.3 Rôle de la DDB2 dans la prolifération cellulaire

L'inhibition par ARN interférence de l'expression de DDB2 entraîne une inhibition de la croissance des cellules MCF-7, caractérisée à la fois par une augmentation du temps de doublement (de 18 pour les cellules témoins à environ 25 heures pour les clones 2 et 3), et par une diminution significative de la capacité à former des colonies en culture (de 53% pour les cellules témoins à 8% pour le clone 2 et à 18% pour le clone 3). Par ailleurs, cette inhibition de la prolifération cellulaire est associée à une diminution très significative de l'expression de

gènes au niveau transcriptionnel, tels que la cycline E, le PCNA et la DHFR pour Dihydrofolate réductase, dont les produits respectifs sont impliqués dans la croissance cellulaire.

A l'inverse, la surexpression de la DDB2 dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB231 ne l'exprimant naturellement qu'à un niveau très faible, stimule leur prolifération. Ces résultats se traduisent par une diminution du temps de doublement (de 38 pour les cellules témoins à 29 heures pour MDA-DDB2) et par une augmentation de la capacité à former des colonies pour les cellules surexprimant la DDB2 (de 6-8% pour les cellules témoins à environ 25% pour les MDA-DDB2).

En culture, les cellules déficientes en DDB2, en plus de leur prolifération plus lente, s'agencent différemment des cellules témoins. Comme le montre la (**Figure 28**), les cellules déficientes en DDB2 (clones 2 et 3) sont plus allongées et forment des petits lobules, ne renfermant jamais d'autres cellules. Au contraire, les cellules témoins délimitent des lobules plus larges et toujours remplies d'autres cellules, contrairement aux précédentes.

4.2.2.4 Rôle de la DDB2 dans la régulation du cycle cellulaire

A partir des résultats précédents, une étude plus précise du rôle de la DDB2 dans la prolifération cellulaire a été réalisée par la technique de cytométrie en flux. Elle a consisté à synchroniser les cellules tumorales mammaires en phase G1 à environ 75% et en G2 à environ 25%, après privation de sérum dans le milieu de culture durant 48 heures, puis à analyser, à la fois la distribution des cellules dans toutes les phases du cycle cellulaire après marquage de l'ADN et leur progression dans la phase G1/S et S par mesure de la vitesse d'incorporation de la 5 bromodéoxyuridine, ceci après l'addition de sérum dans le milieu de culture à différents temps (0, 3, 12 et 18 heures). Cette analyse a porté sur les cellules MCF-7 dont l'expression de la DDB2 est inhibée par ARN interférence d'une façon stable dans le temps, et est comparée aux cellules témoins (parentales et transfectées avec le plasmide produisant un ARNi non spécifique).

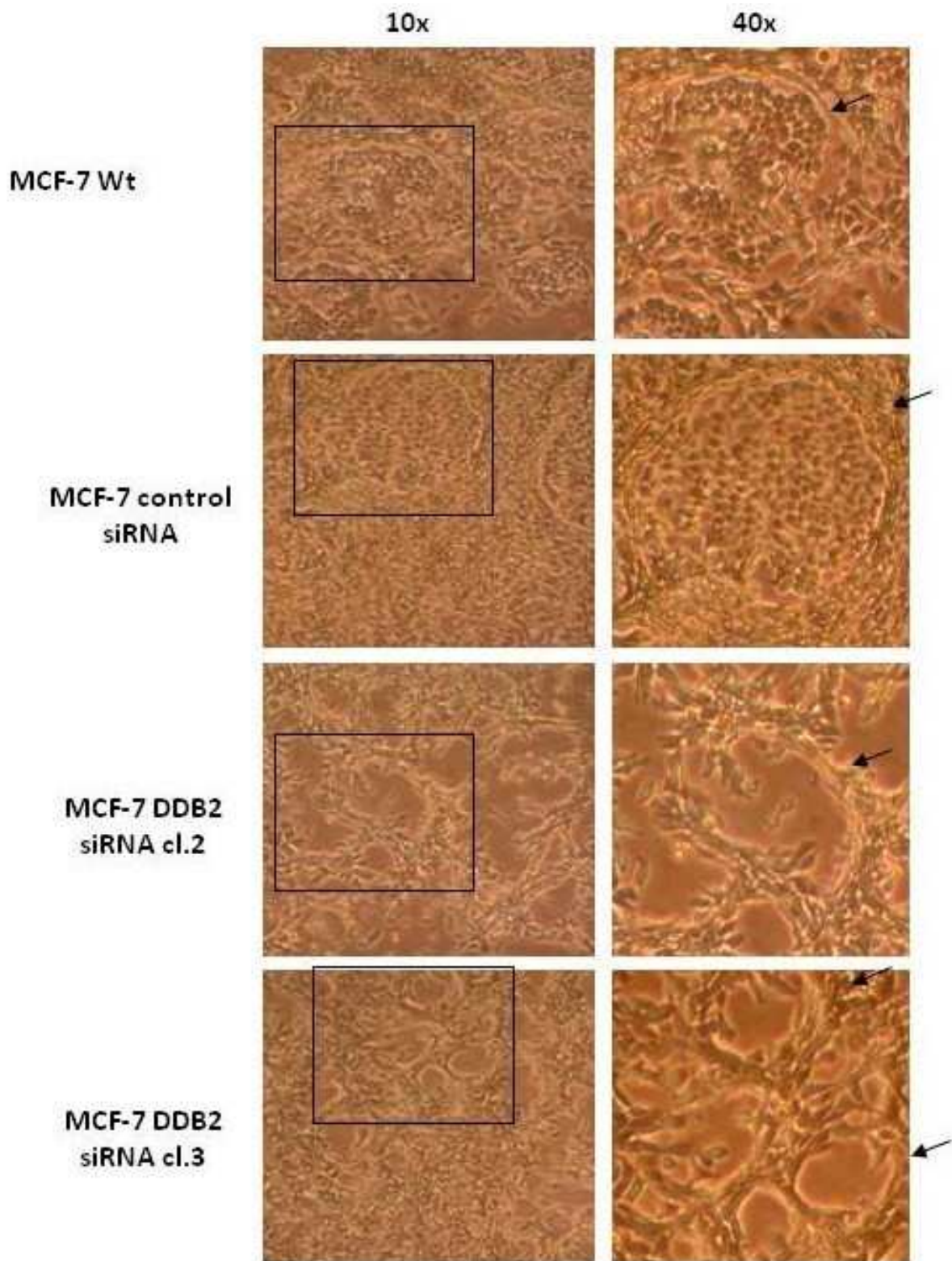


Figure 28 : présentation l'agencement des cellules MCF-7 témoins (WT, control) et les cellules MCF-7 DDB2 siRNA cl.2, cl.3 en culture.

Les résultats obtenus montrent que seules les cellules témoins synchronisées rentrent à nouveau dans le cycle cellulaire après 3 heures d'incubation avec le sérum (9 à 11% en phase S), contrairement aux cellules déficientes en DDB2 (0 à 1% en phase S). Après 12 et 18 heures de contact avec le sérum, aucune cellule MCF-7 déficiente en DDB2 n'est observée en phase G2, contrairement aux cellules témoins qui sont distribuées dans toutes les phases du cycle cellulaire.

L'analyse de l'incorporation de la 5 bromodéoxyuridine dans les cellules synchronisées puis mises en contact avec du sérum dans le milieu sur différents temps, révèle que les cellules déficientes en DDB2 sont significativement ralenties dans la phase de transition G1/S et dans leur progression dans la phase S du cycle cellulaire. En effet, au temps 0, aucune incorporation de 5 bromodéoxyuridine n'est observée dans toutes les cellules MCF-7, indiquant que ces dernières sont bien synchronisées. A partir de 3 heures de contact avec le sérum, seules les cellules témoins rentrent en phase S, tandis que les cellules déficientes en DDB2 restent bloquées en phase G1, puisqu'aucune incorporation de 5 bromodéoxyuridine n'est détectée. Après 12 et 18 heures de contact avec le sérum, nous observons une accumulation des cellules déficientes en DDB2 dans la phase de transition G1/S. Seule une fraction de ces cellules (d'environ 5% à 12 heures à 20% à 18 heures, par rapport à 35% à 12 heures et 80% à 18 heures pour les cellules témoins) est capable de passer la phase de transition G1/S et de progresser lentement dans la phase S, contrairement aux cellules témoins qui présentent un cytogramme normal d'incorporation de la 5 bromodéoxyuridine. Ces résultats sont corrélés avec l'analyse par Western blot de l'expression de la protéine PCNA (Proliferating Cell Antigen Nuclear), qui intervient exclusivement lors de l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire. Cette expression est beaucoup plus faible dans les cellules déficientes en DDB2 que les cellules témoins, quelque soit le temps de contact avec le sérum depuis la synchronisation.

4.2.3 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 impliquée dans la croissance des cellules tumorales, en particulier en stimulant leur entrée en phase S du cycle cellulaire. L'action de DDB2 sur la prolifération des cellules tumorales mammaires est étroitement associée à l'expression de gènes clefs de la phase de transition G1/S et de la progression dans la phase S. A l'issue de ces résultats, nous pouvons

en conclure que la DDB2, par sa surexpression et son rôle sur la prolifération cellulaire, présente les propriétés d'une oncoprotéine dans le développement des tumeurs mammaires exprimant le récepteur aux oestrogènes.

Ces résultats sont développés dans l'article suivant, publié dans PLOS ONE en 2008.

Article 2: "Damaged DNA Binding protein 2 plays a role in breast cancer cell growth."

Damaged DNA Binding Protein 2 Plays a Role in Breast Cancer Cell Growth

Zilal Kattan¹, Sophie Marchal², Emilie Brunner¹, Carole Ramacci³, Agnès Leroux³, Jean Louis Merlin³, Lionel Domenjoud¹, Michel Dauça¹, Philippe Becuwe^{1*}

1 Laboratoire de Biologie Cellulaire du Développement, EA 3446 Université Henri Poincaré-Nancy Université, Vandoeuvre-lès-Nancy, France, **2** Centre Alexis Vautrin, UMR 7039 Institut Polytechnique de Lorraine/Université Henri Poincaré-Nancy Université/ CNRS, Vandoeuvre les Nancy, France, **3** Unité de Biologie des Tumeurs du Centre Alexis Vautrin, EA3452 Nancy Université, Vandoeuvre lès Nancy, France

Abstract

The Damaged DNA binding protein 2 (DDB2), is involved in nucleotide excision repair as well as in other biological processes in normal cells, including transcription and cell cycle regulation. Loss of DDB2 function may be related to tumor susceptibility. However, hypothesis of this study was that DDB2 could play a role in breast cancer cell growth, resulting in its well known interaction with the proliferative marker E2F1 in breast neoplasia. DDB2 gene was overexpressed in estrogen receptor (ER)-positive (MCF-7 and T47D), but not in ER-negative breast cancer (MDA-MB231 and SKBR3) or normal mammary epithelial cell lines. In addition, DDB2 expression was significantly (3.0-fold) higher in ER-positive than in ER-negative tumor samples ($P = 0.0208$) from 16 patients with breast carcinoma. Knockdown of DDB2 by small interfering RNA in MCF-7 cells caused a decrease in cancer cell growth and colony formation. Inversely, introduction of the DDB2 gene into MDA-MB231 cells stimulated growth and colony formation. Cell cycle distribution and 5 Bromodeoxyuridine incorporation by flow cytometry analysis showed that the growth-inhibiting effect of DDB2 knockdown was the consequence of a delayed G1/S transition and a slowed progression through the S phase of MCF-7 cells. These results were supported by a strong decrease in the expression of S phase markers (Proliferating Cell Nuclear Antigen, cyclin E and dihydrofolate reductase). These findings demonstrate for the first time that DDB2 can play a role as oncogene and may become a promising candidate as a predictive marker in breast cancer.

Citation: Kattan Z, Marchal S, Brunner E, Ramacci C, Leroux A, et al. (2008) Damaged DNA Binding Protein 2 Plays a Role in Breast Cancer Cell Growth. PLoS ONE 3(4): e2002. doi:10.1371/journal.pone.0002002

Editor: Mikhail V. Blagosklonny, Ordway Research Institute, United States of America

Received: January 23, 2008; **Accepted:** March 5, 2008; **Published:** April 23, 2008

Copyright: © 2008 Kattan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding from Ligue contre le Cancer comité Meuse and Meurthe et Moselle, from Association pour la Recherche sur le Cancer, and from Henri Poincaré's University.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: becuwe@scbiol.uhp-nancy.fr

Introduction

Damaged DNA Binding protein 2 (DDB2) is a 48-kDa protein originally identified as a component of the damage-specific DNA-binding heterodimeric complex DDB, which is involved in nucleotide excision repair of UV-induced DNA damage through interaction with DDB1 (127-kDa protein) or CSA proteins [1]. It works also in association with other proteins of the repair system, including the XPC-hHR23B heterodimer, XPA and replication protein A [2,3]. DDB2 shares homology with chromatin reorganizing proteins [4] and interacts with the CBP/p300 histone acetyl transferases and STAGA complex [5,6], consistent with a function in the remodelling of chromatin to allow efficient repair in the vicinity of DNA lesions. In addition, DDB2 participates in global NER by recruiting ubiquitinating enzymes, such as the E3 ubiquitin ligase cullin 4A [7].

Human DDB2 is involved in other cellular processes, including transcription and cell cycle regulation. It has been demonstrated that DDB2 acts as a co-factor of the transcription factor E2F1 [8] and that it is associated with the transcriptional coactivator protein CBP/p300 and the chromatin-acetylating transcription coactivator STAGA complex [5,6]. DDB2 is a downstream target of BRCA1 and p53, which regulate its gene expression [9–11],

suggesting that DDB2 could also be involved in cell cycle regulation. DDB2 is a cell cycle-regulated protein in normal cells since it is undetectable in nondividing cells but its level increases in the mid-G1 phase and peaks at the G1/S boundary, before dropping significantly in the S phase [12]. The cell cycle-regulation of DDB2 levels involves ubiquitin-proteasome pathway-mediated proteolysis, through the interaction between DDB2 and cullin 4A [7,12,13].

Loss of DDB2 function in normal cells is related to tumor development susceptibility. Mutations in the DDB2 gene leading to its loss of function are responsible for the phenotypic features of xeroderma pigmentosum group E (XP-E) patients, characterized by malignant skin tumors [14–16]. In addition, DDB2-deficient mice not only were hypersensitive to UV-induced skin carcinogenesis but also developed a high rate of broad spectrum spontaneous malignant tumors in internal organs, in the absence of UV irradiation or added carcinogen. These observations suggested that DDB2 may play a role as a downstream mediator in the tumor suppression pathways of p53 and BRCA1 [17,18]. This suggests a role of DDB2 as a tumor suppressor in normal cells, through protecting against cancer by regulating the cell cycle and by increasing apoptosis rather than by direct participation in the repair of DNA damage [19].

Even if DDB2 is considered as a tumor suppressor, we proposed that this protein could play a role in breast cancer. This hypothesis was based on a previous study showing an interaction between DDB2 and the transcription factor E2F1, a proliferative marker in breast carcinoma [20]. Also, the aim of this study was to examine the expression of the DDB2 gene in various breast cancer cell lines and in tumors from patients. The surprising results showing an overexpression of DDB2 in ER-positive but not in ER-negative breast cancers led us to investigate the role of this protein in breast cancer cells. This study provides evidence for the first time that DDB2 plays an important role in cell cycle progression of breast cancer cells.

Results

DDB2 gene is overexpressed in ER-positive breast cancer cell lines

The expression of DDB2 was assessed in both the ER-negative (MDA-MB231 and SKBR3) and ER-positive (MCF-7 and T47D) breast cancer cells and was compared to that in the normal human mammary epithelial cells (HMEC), at both the transcriptional and the translational levels (Figure 1). The DDB2 mRNA level estimated by RT-PCR analysis was 9.1-fold higher for MCF-7 and 5.1-fold higher for T47D cell lines than for HMEC cells (Figure 1A). No significant difference was observed between the DDB2 mRNA levels of the ER-negative (MDA-MB231 and SKBR3) cancer cells and the HMEC cells. These results correlated with the DDB2 protein content. Western blot analysis showed that the MCF-7 and T47D cells had similar and very high levels of DDB2 protein, in contrast to the very low levels in MDA-MB231, SKBR3 and HMEC cells (Figure 1B). No significant difference was observed between the DDB1 mRNA levels of the cell lines studied. However, the MCF-7 cells had respectively 3.7- and 2.5-fold higher levels of DDB1 protein than the SKBR3 and MDA-MB231 cells. No significant difference was observed between the DDB1 protein levels of the MCF-7, T47D and HMEC cell lines. The MCF-7 cells expressing the highest basal DDB2 levels were submitted to *in situ* immunofluorescence in order to analyse the subcellular localization of DDB1 and DDB2. Whereas DDB1 was localized in both the nucleus and the cytoplasm, DDB2 was exclusively found in the nucleus (see Supplemental Figure S1).

DDB2 gene is expressed in human breast tumors

As DDB2 appeared to be detected strongly in ER-positive breast cancer cell lines, we next examined the DDB2 mRNA level in breast cancer samples from 16 patients (eight positive and eight negative for ER expression) using semiquantitative RT-PCR. In concordance with the results from breast cancer cell lines, the relative DDB2 mRNA level was significantly 3.0-fold higher in ER-positive than in ER-negative breast tumor samples ($P=0.0208$). The mean value of relative DDB2 mRNA level was 1.55 ± 0.82 for ER-positive breast tumors as compared to 0.53 ± 0.54 for ER-negative breast tumors. Five of the eight ER-positive samples showed a higher relative DDB2 mRNA level than the mean value, whereas one sample did not express DDB2 (Figure 2).

DDB2 knockdown leads to a decrease in the growth of ER-positive breast cancer cells

To understand the role of DDB2 in breast cancer cell growth, we applied RNA interference technology to knock down the overexpression of DDB2 in the MCF-7 cells. Three different duplexes of siRNA, targeting various sequences of DDB2

mRNA, were transfected individually into the MCF-7 cells at 100 nM for 24 h and the DDB2 protein level was analyzed by immunoblotting. All the DDB2 siRNA duplexes were able to knock down the expression of DDB2, albeit to varying degrees. This efficiency of these siRNA duplexes in the depletion of DDB2 expression was confirmed in COS-7 cells expressing stably Myc-His tagged DDB2 (see Supplemental Figure S2). The siRNA duplex 3, which exhibited the highest efficiency (about 90%) to deplete cellular DDB2 protein, was introduced into the RNAi-ready pSIREN vector for stable DDB2 suppression in the MCF-7 cells. Two stably DDB2 siRNA-transfected MCF-7 cell clones (cl.2 and cl.3) were isolated, where the DDB2 expression was strongly suppressed in contrast to that in the parent cells (Wt) and in the stably transfected cells with a scrambled siRNA duplex sequence (control siRNA) which were used as controls (Figure 3A and B). The expression of DDB1 was not affected in the transfected cells, in contrast to that in the Wt MCF-7 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 daily over a 4-day period. The two DDB2 deficient MCF-7 cell clones 2 and 3 showed an approximately similar growth rate and grew significantly more slowly than the Wt and the control siRNA-transfected MCF-7 cells. At day 4 after plating, the clones 2 and 3 exhibited respectively approximately 2.3- and 2.1-fold fewer cells than the control siRNA-transfected MCF-7 cells (Figure 3C). No significant difference was observed between the Wt and control siRNA-transfected MCF-7 cells. Cell population doubling times were calculated from the cell growth curves (Figure 3D). In accordance with the growth rates, the doubling times of the DDB2 deficient MCF-7 cell clones 2 and 3 (23.3 and 22.6 h, respectively) were longer than those observed for the Wt and control siRNA-transfected MCF-7 cells (18.0 and 17.8 h, respectively). As shown in Figure 3E and F, the decreases in cell growth rates were accompanied by a strong decrease in colony formation for the DDB2 deficient MCF-7 cell clones 2 and 3 (8.4 and 19.4%, respectively) compared to those of the Wt and control siRNA-transfected MCF-7 cells (52.4 and 45.5%, respectively). The decreases in cell growth rate and colony formation were associated with a decrease in the level of mRNA encoding specific S-phase markers, such as DHFR, cyclin E and PCNA, in the DDB2-deficient MCF-7 cell clones 2 and 3 (Figure 3A).

DDB2 overexpression increases the growth of ER-negative breast cancer cells

The involvement of DDB2 in breast cancer cell growth was confirmed by introduction of the DDB2 gene into MDA-MB231 cells. These cells (MDA DDB2), control parent (MDA Wt) and empty vector-transfected cells (MDA Neo) were seeded in 24-well tissue culture plates at 1×10^4 cells/well. The growth curve of the isolated MDA-MB231 cells overexpressing DDB2 (MDA DDB2) (Figure 4A) was assessed and compared to those of both control cell lines (MDA Wt and MDA Neo). The cells were then counted daily over a 9-day period. The MDA DDB2 cells grew faster, with approximately 1.7-fold more cells than the control Wt and Neo cell lines by day 9 after plating (Figure 4B). No significant difference was observed between the Wt and Neo control cells. In consequence, the cell population doubling time of the MDA DDB2 cells (29.4 h) was shorter (Figure 4C) than those observed for the MDA Wt and MDA Neo (37.7 and 37.9 h, respectively). In addition, colony formation was stimulated in the MDA DDB2 cells (23.5%) compared to that in the Wt and Neo control cells (5.3 and 7.5%, respectively) (Figure 4D and E).

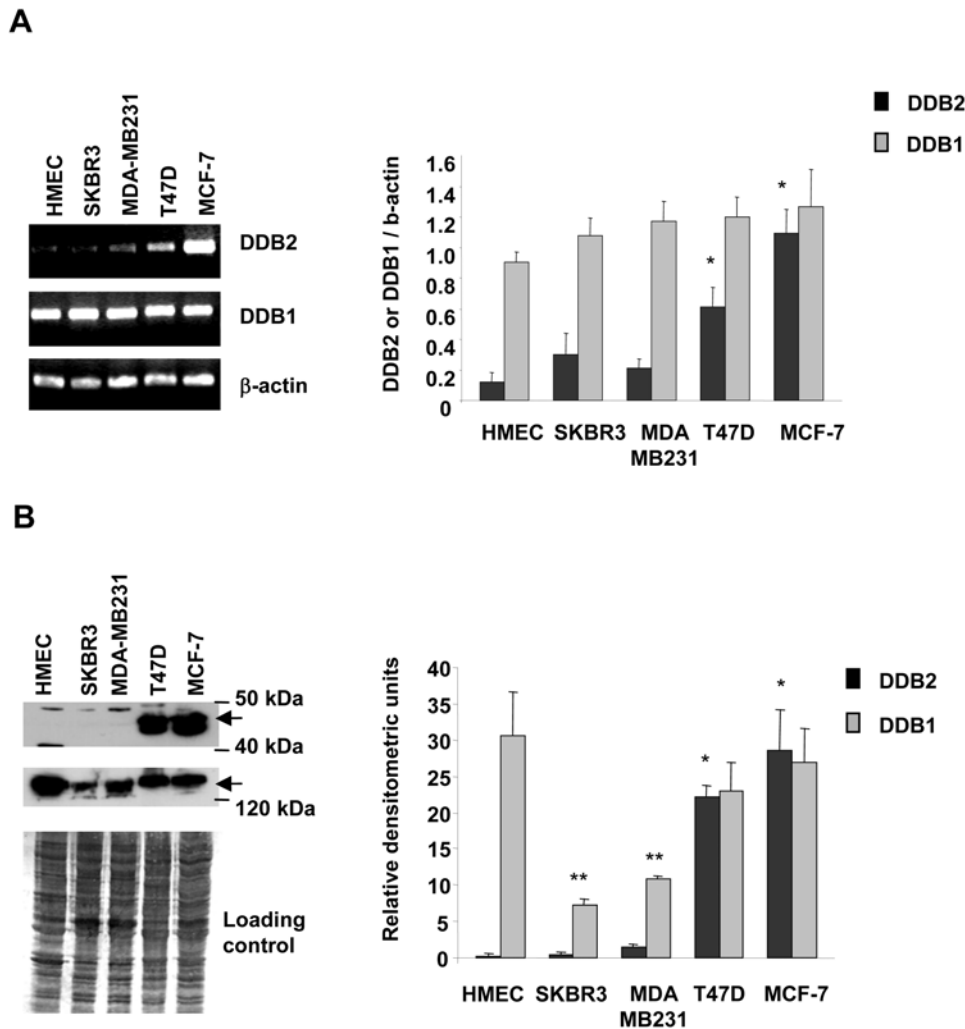


Figure 1. DDB2 is overexpressed in human ER-positive breast cancer cell lines. (A) Total RNA was extracted from cells, then subjected to semiquantitative RT-PCR analysis. The relative levels of DDB1 and DDB2 mRNAs were normalized to those of β -actin mRNA. **(B)** DDB1 and DDB2 proteins were analysed in the total protein (50 μ g) extracted from cells by Western blotting, using polyclonal anti-DDB1 and anti-DDB2 antibodies. Coomassie blue membrane staining was used as the protein loading control. Results are representative of three independent experiments. Relative band intensities for RT-PCR and Western blot analysis were quantified by densitometry. Data from RT-PCR analysis are expressed as the ratio for DDB1 or DDB2 mRNA levels/ β -actin mRNA levels. Data from Western blot analysis are expressed as relative densitometric units. Statistically significant differences from the HMEC values for DDB1 and DDB2 are indicated as ** and * P <0.05, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0002002.g001

DDB2 knockdown promotes a decline in cell cycle progression at the G1/S transition in ER-positive breast cancer cells

To explain the finding of DDB2 knockdown causing reduced growth and a prolonged doubling time of MCF-7 cells, cell cycle analysis was performed by flow cytometry, after PI staining. Wt, siRNA control and DDB2-deficient MCF-7 cells were synchronized by serum starvation for 48 h and then induced to re-enter the cell cycle by the addition of serum. The cell lines were exposed to added serum over 0, 3, 12 or 18 h. The cell cycle distribution of the cell lines was determined by quantifying DNA content, after PI staining (Figure 5). After PI staining, serum depletion for 48 h was shown to result in G1/G0 and G2/M arrests of at least 98% in control (Wt and siRNA control) and DDB2-deficient MCF-7 cells (cl.2 and cl.3). At 3 h after serum addition, no change in cell cycle distribution was observed for the DDB2-deficient MCF-7 cell lines, while the S-phase fraction increased in the Wt and siRNA control cells (11 and 9%, respectively). With the time release from

serum addition (12 and 18 h), we observed that both DDB2-deficient MCF-7 cell lines re-entered the cell cycle, with a loss of G1 cells and the appearance of a high S-phase fraction, but no G2 cell presence. The high peak corresponding to the S-phase fraction shifted slightly between 12 and 18 h after serum addition. However, the control MCF-7 cells were distributed in all phases of the cell cycle, with a lower S-phase fraction and a significant peak corresponding to about 19% and 14% G2 cells after 12 and 18 h addition of serum, respectively, compared to the DDB2-deficient MCF-7 cell lines. These results suggest that the DDB2 deficient MCF-7 cells advanced in the cell cycle more slowly than the control cells. These results were confirmed by 5 BrdU incorporation into cells growing synchronously after serum starvation. The cell fractions in G1/S and S-phases were estimated by flow cytometry analysis (Figure 6). A lack of labeling index (LI) corresponding to a lack of 5 BrdU incorporation was observed, indicating no cells were in the S-phase after 48 h of serum starvation. An alteration of cell cycle progression was observed in

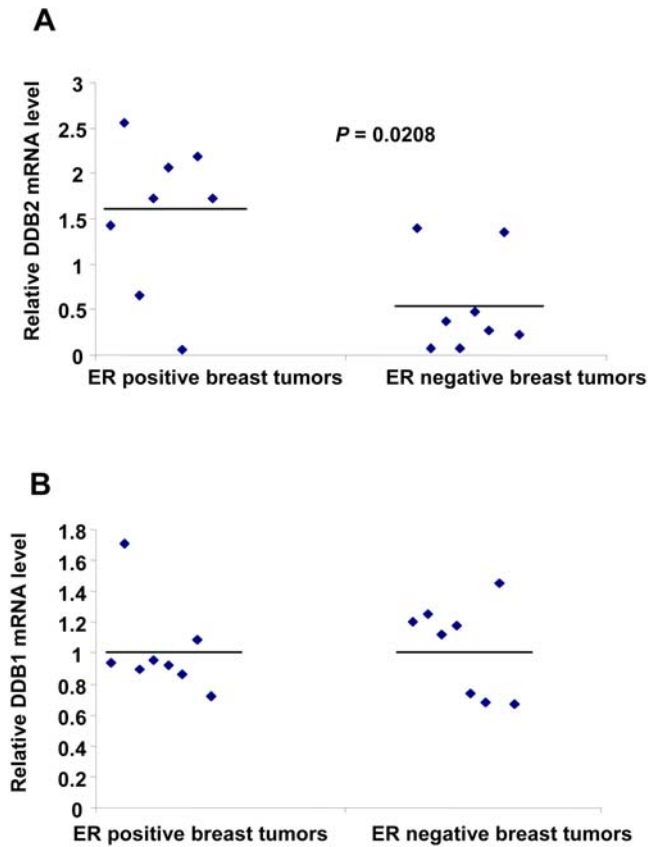


Figure 2. DDB2 is expressed in human breast tumors from patients. Total RNA was extracted from eight ER-positive and eight ER-negative breast cancer samples, then subjected to semiquantitative RT-PCR analysis. The relative levels of DDB1 and DDB2 mRNAs were normalized to those of β -actin mRNA. Statistically significant differences between ER-positive and ER-negative samples are indicated as $P < 0.05$. The mean values are indicated by a bar in the graph for each group of tumors and DDB1 or DDB2 mRNA levels.
doi:10.1371/journal.pone.0002002.g002

the DDB2 deficient MCF-7 cells 3 h after the addition of serum. Similar to the finding by cell cycle analysis after PI staining, no 5 BrdU incorporation was quantified for both DDB2-deficient MCF-7 cell lines, whereas the LI for the Wt and siRNA control MCF-7 cells (6.6% and 9.3%, respectively) revealed important S-phase fractions in these lines. Then, % 5 BrdU-positive cells corresponding to the LI for DDB2 deficient cells was strongly increased and was similar to the control MCF-7 cells at 12 and 18 h after release from serum depletion. Compared to that of the control cells, this LI indicated an important pool of DDB2-deficient cells which started to re-enter the cell cycle and which corresponded to an essentially G1/S subpopulation. The DDB2-deficient MCF-7 cell clones 2 and 3 showed S-phase fractions respectively 6.8- and 4.2-fold less than that of the control MCF-7 cells, at 12 and 18 h after release from serum depletion. In addition, no G2 fraction was detected for both DDB2-deficient MCF-7 cell clones. These results demonstrate that DDB2 knockdown led to a delayed G1/S transition phase entry and a slowed MCF-7 cell progression through the S phase. These results were confirmed by an investigation of the PCNA protein level. Regardless of the time from release of serum depletion, the PCNA protein level was greatly reduced in both DDB2-deficient MCF-7 cell lines, compared to that of tubulin, used as a loading control (Figure 7).

Discussion

In addition to its role in DNA repair, DDB2 could play an important role in cell cycle regulation in normal cells, when associated with proteins regulating the cell cycle [7,8]. Previous studies showed that mutations in the DDB2 gene, which lead to a deficiency in the NER system, increased susceptibility to develop cancer [21] and a DDB2 deficiency promoted spontaneous malignant tumors in mice [17,22]. Taken together, these results provided evidence that DDB2 could play a role as a tumor suppressor in normal cells. However, strong evidence for the functional interaction between DDB2 and E2F1, a proliferative marker in many cancers led us to speculate that DDB2 could be involved also in cancer cell growth [8,20].

The present study reports for the first time that DDB2 is overexpressed in ER-positive breast cancer cell lines, compared to the constitutive DDB1 expression. As described already in other cell types, DDB2 was localized strictly in the nucleus, as demonstrated by the presence of several nuclear localization signals in its amino acid sequence [23], whereas DDB1 protein, which is expressed constitutively in cells, was found to be localized also in the cytoplasm and nucleus [24]. DDB2 was detected as two bands by Western blot analysis in MCF-7 and T47D cells, but only the one with the higher molecular weight was found in the nuclear extract: the second was suspected to be non-specific and the result of cross-reaction with anti-DDB2. The basal DDB2 level was very low or undetectable in ER-negative breast cancer cells and in the nontumorigenic epithelial mammary HMEC cell line. In addition, a correlation between DDB2 expression and ER status was observed also in breast tumor samples from patients. Taken together, we postulate that a high DDB2 content is associated with the oestrogen receptor (ER) status in breast cancer.

Expression of the DDB2 gene has been detected also in some tumor cell lines such as colon carcinoma cell lines and HeLa cells [11,25]. It is known that the DDB2 gene is expressed at a low baseline level in many human normal cells and is induced following UV irradiation to participate in the repair of DNA lesions [15,23]. Regulation of DDB2 expression is not well known. A recent study identified Sp1, NF1 and E2F response elements in the promoter of the DDB2 gene, and showed that mutations of these response elements reduced strongly the basal transcription of the DDB2 gene [24,26]. In addition, it has been found that p53 and BRCA1 were able to activate the DDB2 gene [9,10]. In the present study, we observed that the DDB2 gene was upregulated in ER-positive breast cancer cells, compared to the very low expression of DDB2 in the nontumorigenic epithelial mammary HMEC cell line. The mechanism by which DDB2 expression is dysregulated in ER-breast cancer cells is not known. Moreover, the molecular mechanism involved in the loss of DDB2 gene expression in ER-negative breast cancer cells will need to be defined in the future. One hypothesis would suggest the involvement of BRCA1. The ER-positive breast cancer cells, such as MCF-7 and T47D cells, express BRCA1, whereas the ER-negative tumor cells, such as SKBR3 and MDA-MB231 cells are BRCA1 negative [27]. Involvement of ER and other transcription factors or other molecular mechanisms are not excluded and future investigations will need to elucidate the regulation of DDB2 expression during breast tumor progression.

The surprising evidence that the high DDB2 content correlated with the high proliferation rate of MCF-7 and T47D cells compared to MDA-MB231 and SKBR3 cells, along with a number of studies reporting a role of DDB2 in the cell cycle regulation of normal cells, led us to investigate the role of this protein in tumor growth. The result of the inhibition of DDB2

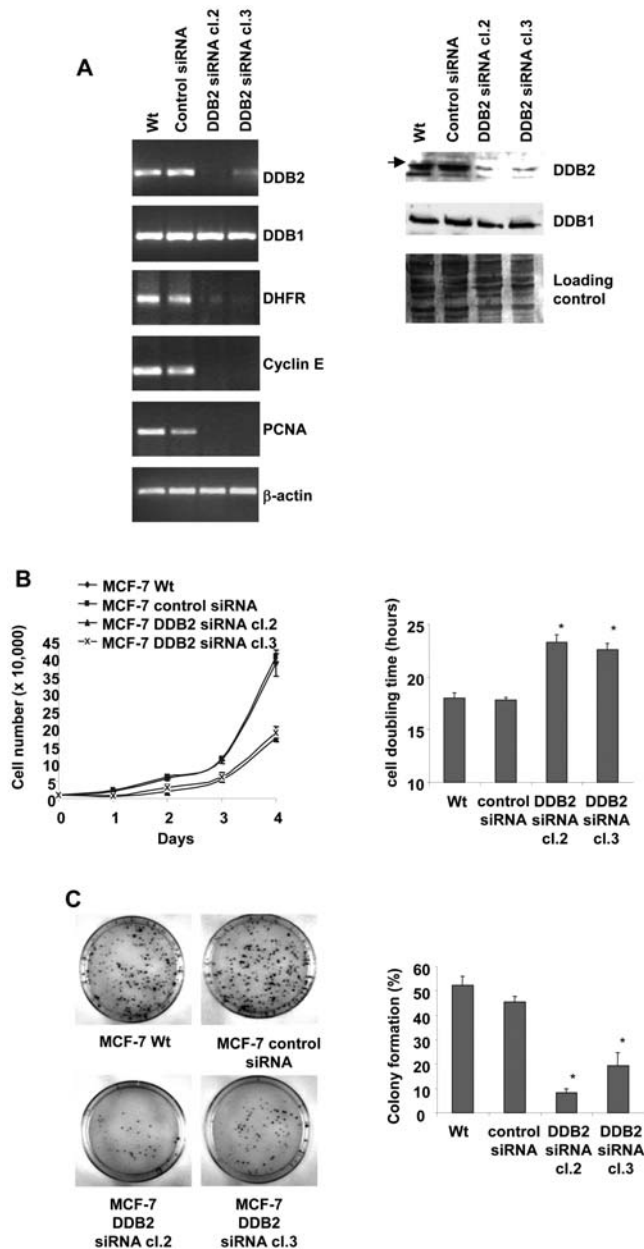


Figure 3. DDB2 knockdown affects the growth and colony formation of MCF-7 cells. (A) Generation of MCF-7 cell clones stably expressing DDB2 siRNA. Total RNA was extracted from parental MCF-7 cells (Wt) and from cells stably transfected with either the DDB2-siRNA vector (clones cl.2 and cl.3) or the scrambled siRNA vector (control siRNA), then subjected to RT-PCR analysis. The relative levels of DDB1, DDB2, DHFR, cyclin E and PCNA mRNAs were normalized to those of β -actin mRNA. DDB1 and DDB2 protein levels were analysed in the total protein (50 μ g) extracted from MCF-7 cell clones stably expressing DDB2 siRNA and from control cells, by Western blotting using polyclonal anti-DDB1 and anti-DDB2 antibodies. Coomassie blue membrane staining was used as the protein loading control for Western blot analysis. (B) Parent cells (Wt), control siRNA-transfected MCF-7 cells and the two DDB2 siRNA-transfected cell clones (DDB2 siRNA cl.2 and cl.3) were plated in 24-well dishes (1×10^4 per well) in complete medium and cell numbers were counted for 4 days. Means are shown for three experiments. Cell population doubling time was calculated from the cell growth curve during the exponential growth phase. (C) Wt cells, control siRNA and DDB2 siRNA transfected cells were seeded (500 cells) in 100-mm dishes and grown for 12 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) \times 100%. Statistically significant differences from the parental (Wt) cell value are indicated as * $P < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0002002.g003

expression, through the strategy of small interfering RNA (siRNA), gave a significant reduction of the growth rate and clonogenicity of the MCF-7 cells and an increased cell doubling time. Inversely, introduction of the DDB2 gene into MDA-MB231 cells increased their growth rate and clonogenicity and decreased their cell doubling time. We demonstrated that the increase in the doubling time of DDB2-deficient MCF-7 cells resulted in a slowing of their entry into G1/S transition and of their progression through the S phase of cell cycle. Moreover, no G2 fraction was detected 18h after release from serum depletion for both DDB2-deficient MCF-7 cell clones compared to control cells. These data suggest that DDB2 may play a role as an activator of breast tumor cell proliferation at the G1/S transition and during the S-phase progression of the cell cycle. The involvement of DDB2 at this checkpoint of the cell cycle correlates with the fact that it is well expressed in dividing and undamaged normal cells in the mid-G1 phase and peaks at the G1/S boundary, before dropping significantly in the S phase [12].

A strong decrease in the expression of DHFR, cyclin E and PCNA genes, which are required for DNA synthesis and more generally for proliferation, was observed in DDB2-deficient MCF-7 cells. These results suggest that DDB2 deficiency, by promoting a down-regulation of the replication genes during tumor cell growth, leads to the slowed entry into the G1/S transition and the S phase of the cell cycle. Expression of these genes is controlled by E2F1, a transcription factor which stimulates cell cycle progression at G1 to S phase [28]. This role is well documented in tumor cells, and particularly in breast cancer cells where E2F1 and its E2F1-target genes, including DHFR, PCNA and cyclin E, are overexpressed [20,29]. Also, one mechanism by which DDB2 plays a role in tumor cell proliferation could be related to its interaction with E2F1. Indeed, in association with DDB1, DDB2 has a functional interaction with E2F1, leading to the stimulation of the E2F1-target gene expression [8]. However, no significant correlation between E2F1-target genes and DDB2 was observed in our breast tumor samples (see Supplemental Figure S3). This preliminary clinical study was probably limited by the small number of samples. Also, further investigation with larger breast tumor samples will be necessary.

The present study provides new insights showing that DDB2 plays a novel biological function. DDB2 functions as a tumor suppressor in normal cells, at least in part by regulating cell proliferation and controlling p53-mediated apoptosis. Deletion of DDB2 in normal cells promotes spontaneous tumor growth in the absence of UV- or carcinogen-induced DNA lesions, probably due to an accumulation of unrepaired DNA lesions, leading to cell transformation [17]. In this study, DDB2 exhibited in vitro oncogenic properties in ER-positive breast cancer cells, through the stimulation of cell proliferation. These results suggest that the overexpression of DDB2 imparts a growth advantage for ER-positive breast cancer cells. We can consider that DDB2 exhibits ying and yang activity, as does E2F1. Under normal circumstances, E2F1 plays a role in stimulating growth through its regulation of the expression of genes required for cell cycle progression in breast cancer cells [20,30]. On the other hand, E2F1 can also play a role in cell cycle arrest and apoptosis, in response to DNA damage [31].

Our results describe an association between DDB2 and ER status in breast cancer as well as in preclinical models and in

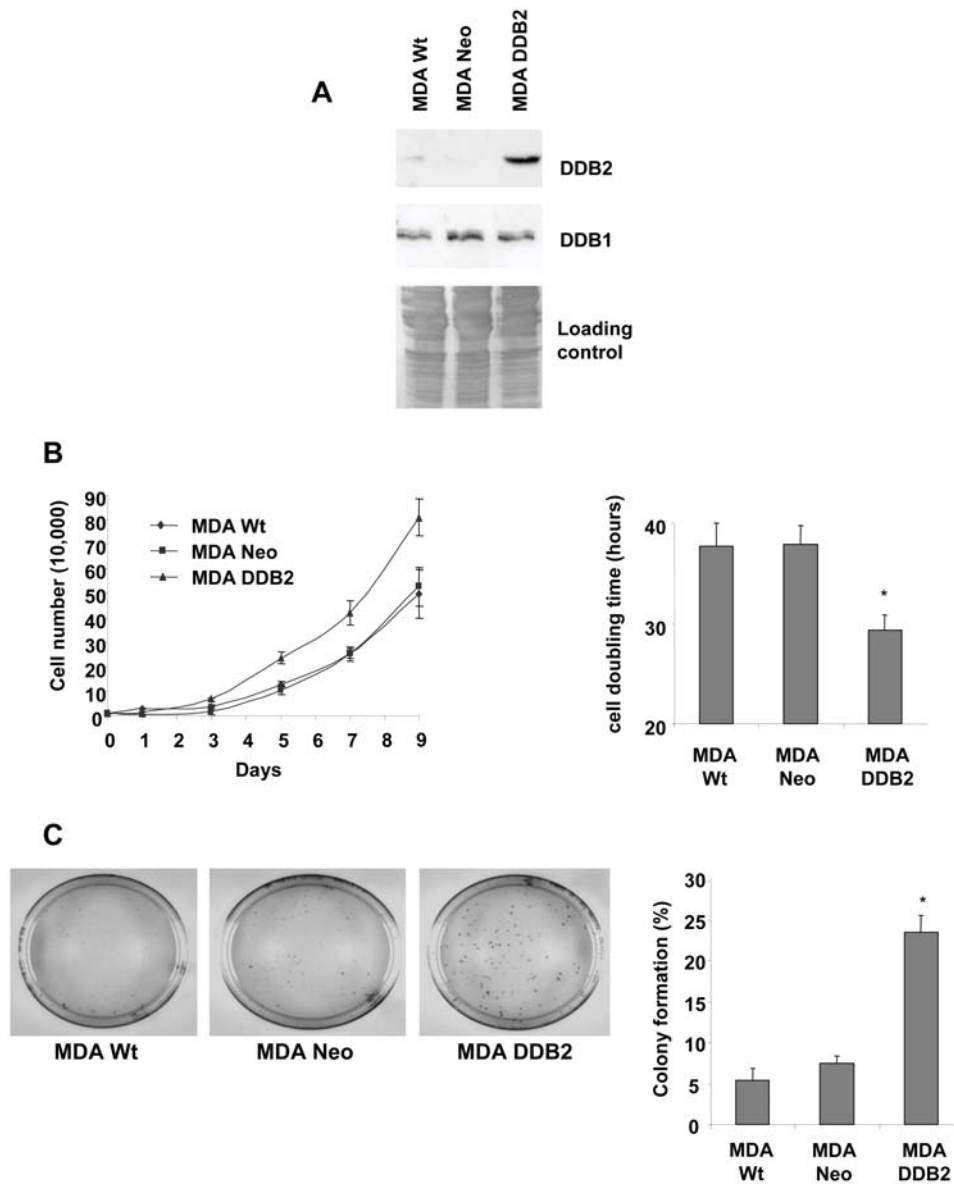


Figure 4. DDB2 overexpression increases the growth and colony formation of MDA-MB231 cells. (A) MDA-MB231 cells were stably transfected with the pcDNA 3(+) expression vector containing either DDB2 cDNA (MDA DDB2) or no insert (MDA Neo). The DDB2 protein level was assessed by Western blot analysis, using equal amounts of protein (50 μ g) extracted from parent cells (MDA Wt), empty vector-transfected cells (MDA Neo) and DDB2-overexpressing cells (MDA DDB2), and using DDB2 polyclonal antibody. Coomassie blue membrane staining was used as the protein loading control. (B) Parent cells (MDA Wt), empty vector-transfected cells (MDA Neo) and DDB2-transfected cell clone (MDA DDB2) were plated in 24-well dishes (1×10^4 per well) and cultured in complete medium. Cell numbers were counted on days 1, 3, 5, 7 and 9. Means are shown for three experiments. Cell population doubling times were calculated from the cell growth curves during the exponential growth phase. (C) MDA Wt, MDA Neo and MDA DDB2 cells were seeded (500 cells) in 100-mm dishes and grown for 12 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) \times 100%. Statistically significant differences from the MDA Wt cell value are indicated as * $P < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0002002.g004

clinical specimens. It is known that the absence of ER in breast tumor cells is associated with a poor prognosis and an aggressive phenotype. The ER-negative breast cancer cell models used in this study, such as MDA-MB231 and SKBR3 cells are aggressive and highly metastatic estrogen-independent breast cancer cells because of high invasive ability, despite a slow growth rate. The increase in MDA-MB231 cell proliferation, which was observed after introduction of the DDB2 gene, suggests that DDB2 protein is a candidate oncogene when it is overexpressed, whatever the breast cancer cell phenotype. Also, the down-regulation of the DDB2 gene observed in these cells may reflect tumor progression to a

metastatic phenotype. It is not excluded that the decrease in DDB2 expression is associated with a decrease in the NER system and an accumulation of unrepaired DNA damage, leading to an invasive cancer phenotype [32]. In addition to causing impairment in the DNA repair function, the loss of DDB2 gene expression, leading to a slowed growth of aggressive breast cancer cells, may be proposed as an important step in mammary carcinogenesis in ER-negative cells. Also, DDB2 may represent an important clinical interest as a prognostic/predictive marker of breast cancer progression towards an aggressive phenotype. A larger clinical investigation is needed to support this hypothesis.

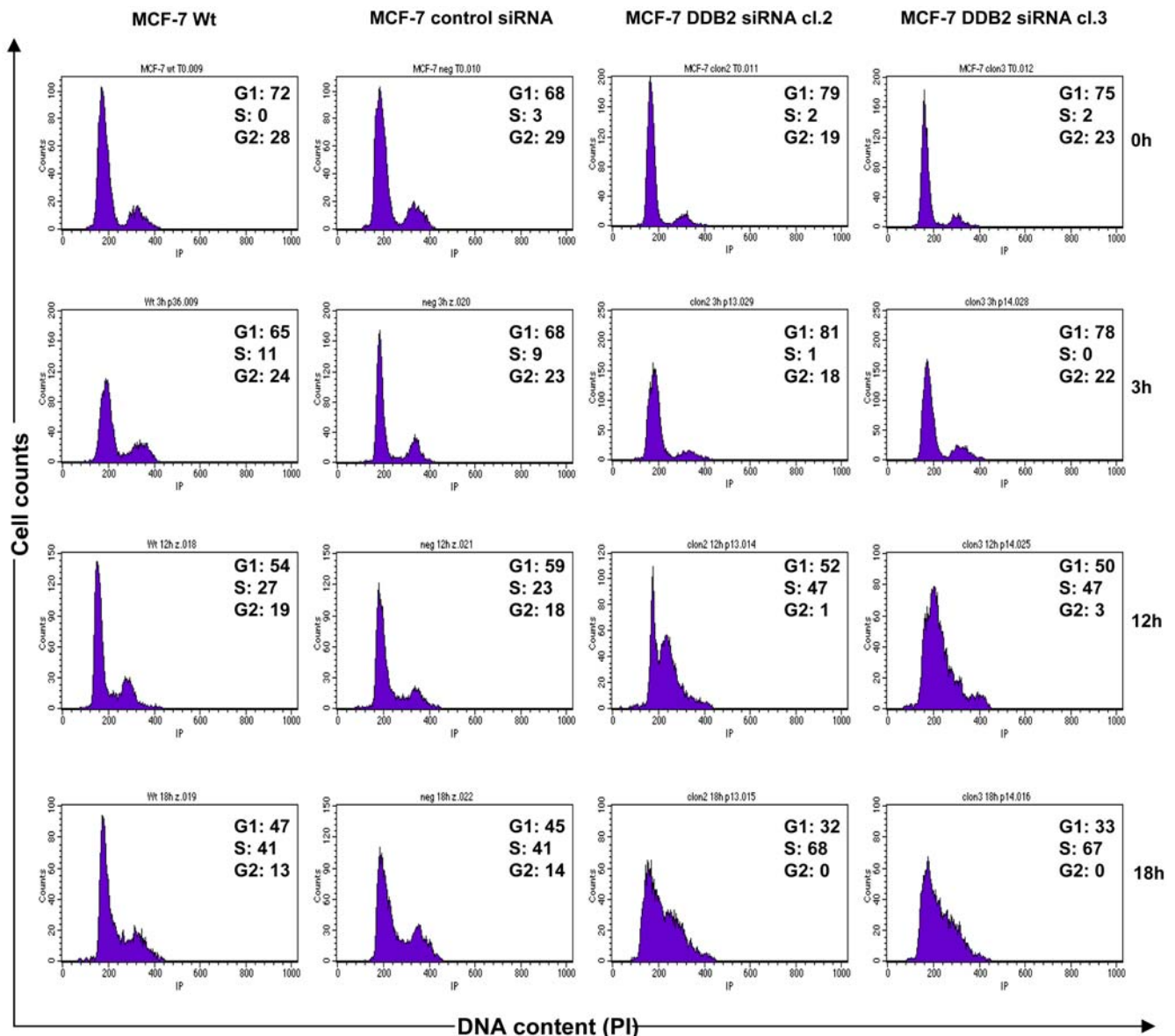


Figure 5. DDB2 knockdown affects cell cycle distribution of MCF-7 cells. Parent cells (Wt), control siRNA-transfected MCF-7 cells and the two DDB2 siRNA-transfected cell clones (DDB2 siRNA cl.2 and cl.3) were synchronized by serum starvation for 48h, and induced to re-enter the cell cycle by the addition of serum for 0, 3, 12 or 18h. MCF-7 cells were harvested for propidium iodide staining and analysed by FACS to determine the cell cycle fraction. FACS plots and data are representative of at least three separate experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0002002.g005

The present study provides for the first time strong evidence that DDB2 is a candidate for oncogene action in breast cancer. It may contribute to a better understanding of breast tumor progression and to provide a valuable tool in the clinical investigation of breast cancer. This conclusion is based on several lines of evidence that DDB2 is highly expressed in the human ER-positive breast tumor samples and in the cell lines we examined, compared to ER-negative status, and plays a significant role as an activator of growth, favouring G1/S transition entry of ER-positive breast cancer cells during their cell cycle. These findings support the assessment of DDB2 status as a prognostic factor for tumor progression and chemosensitivity in breast cancer and, possibly, other cancers. Elevated levels of DDB2, through its ability to activate cancer cell growth, may influence the effectiveness of anticancer drugs. Also, the molecular mechanism by which the factors and the signaling

pathway influencing DDB2 expression in ER-positive breast cancer cells will need to be defined.

Materials and Methods

Cell Lines

Human ER-expressing (MCF-7 and T47D), ER-negative (MDA-MB231 and SKBR3) breast cancer cell lines and normal human mammary epithelial cells (HMEC) from Clonetics (Cambrex) were cultured as described previously [33].

Tumor material

Sixteen anonymous (eight estrogen receptor positive, eight negative), 20-30 mg breast tumor samples were from surgical pieces of infiltrating breast carcinomas from patients in intend to

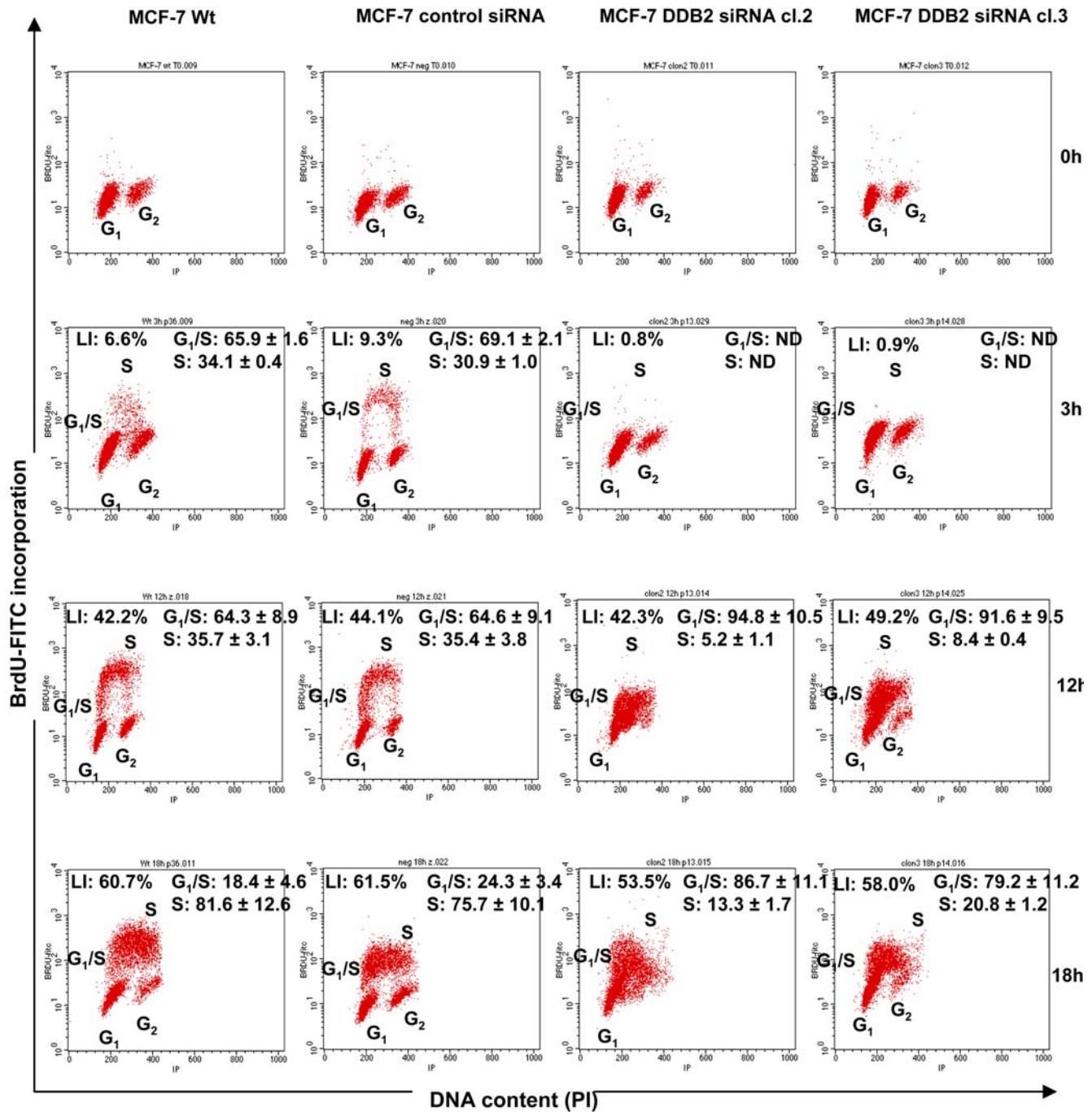


Figure 6. DDB2 knockdown decreases the ability of MCF-7 cells to re-enter the S phase of the cell cycle. Parent cells (Wt), control siRNA-transfected MCF-7 cells and the two DDB2 siRNA-transfected cell clones (DDB2 siRNA cl.2 and cl.3) were synchronized by serum starvation for 48h, and induced to re-enter cell cycle by the addition of serum for 0, 3, 12 or 18h. At the end of each of these periods after serum addition, MCF-7 cells were exposed to 5 BrdU for 20 min and were harvested for propidium iodide staining before being analysed by FACS for determination of the G1/S subpopulation and the S-phase fraction. FACS plots and data are representative of at least three separate experiments. doi:10.1371/journal.pone.0002002.g006

make diagnosis before an appropriate treatment. According to the French bioethical law of august 6, 2004 (number 2004-800), which has been then completed by the law of august 10, 2007 (number 2007-1220, NOR: ESRR 0757 103D), samples used for this retrospective study did not required written consent from patients. These samples were kept in liquid nitrogen frozen specimens and then were certified as tumor material by morphological charac-

terization by a senior pathologist. Estrogen receptor expression was analyzed at diagnosis using routine immunohistochemistry with 6F11 monoclonal antibody determination kit (Novocastra) and revealed using I-View DAB kit (Ventana). Estrogen receptor expression was considered as positive when more than 10% of the nuclei were stained. Semi-quantitative expression values were calculated as % labeled nuclei × staining intensity (0–3).

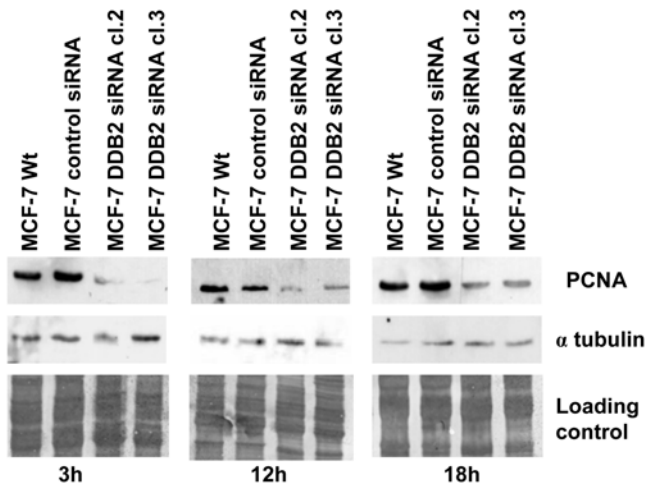


Figure 7. Analysis of PCNA expression in DDB2-deficient MCF-7 cells. Parent cells (Wt), control siRNA-transfected MCF-7 cells and the two DDB2 siRNA-transfected cell clones (DDB2 siRNA cl.2 and cl.3) were synchronized by serum starvation for 48h, and induced to re-enter the cell cycle by the addition of serum for 3, 12 or 18h. PCNA protein levels were analysed in the total protein (50 μ g) extracted from different cells by Western blotting, using specific polyclonal antibodies. Membranes were then probed with specific polyclonal antibodies against tubulin or stained with Coomassie blue as the protein loading control for Western blot analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0002002.g007

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis

Total RNA from breast cancer cell lines and from 16 frozen human tissues samples was isolated with Trizol[®] (Invitrogen). RNA quality from human breast cancers was controlled using RNA nanoLab Chip[®] (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) and used for RT-PCR. One microgram of total RNA was reverse-transcribed for 50 min at 42°C in 20 μ l of PCR buffer with 2.5 mM dNTPs, 5 μ M random hexamer primers, 1.5 mM MgCl₂ and 200 units SuperScript II reverse transcriptase. The primers used (Invitrogen) were selected from published nucleotide sequences in the open reading frames of the human genes encoding DDB1 and DDB2 [34]. The primer sequences used were as follows: DDB1 forward, 5'-GACCTGCCCTACGACTAC-3'; DDB1 reverse, 5'-GACCACCACCATTGAACTTC-3'; DDB2 forward, 5'-GCGACGAAGGCCGTGTGCGTGC-3'; DDB2 reverse, 5'-ACTTTCTTCATTTCCACCTTTGCC-3'; dihydrofolate reductase (DHFR) forward, 5'-TGGCTCACACCTGTAATCC-3'; DHFR reverse, 5'-TAATTCTTCCATCTCAGCTTCC-3'; Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) forward, 5'-TGC-GGCCGGGTTTCAGGAGTCA-3'; PCNA reverse, 5'-CAGG-CAGGCGGAAGGAGGAAAGT-3'; cyclin E forward, 5'-TATTGCAGCCAACTTGAGG-3'; cyclin E reverse, 5'-TTA-GATATGCAACCTGCATGTATAC-3'; β -actin forward, 5'-GGCTCCGGCATGTGCAAGG-3'; β -actin reverse, 5'-AGAT-TTCTCCATGTCGTCC-3'. Each primer was added at a final concentration of 0.5 μ M to 50 μ l reaction mixture in PCR buffer, containing 1 μ l cDNA, 0.25 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, and 2.5 units Taq polymerase. An initial denaturation was carried out for 2 min at 94°C and 30 cycles were performed with the following PCR program: denaturing 94°C-45 s, annealing 50°C for DDB1 and DDB2 or 46°C for DHFR or 56°C for PCNA or 45°C for cyclin E and β -actin-45 s, elongation 72°C-45 s. This program was completed with a final extension of 5 min at 72°C. Preliminary assays have shown that the 30 cycle amplification was

in the exponential phase. Ethidium bromide-stained bands were visualized by UV transillumination and the fluorescence intensity was quantified using a Gel Doc 2000 system (Biorad). The data from PCR reactions were expressed as the relative DDB2 or DDB1 mRNA level, corresponding to the ratio of the quantified fluorescence intensity of DDB1 or DDB2 band/ β -actin band from three independent experiments \pm standard deviations (SD). DNA fragments (with expected sizes of 300 bp for DDB1 and DDB2, 172 bp for DHFR, 348 bp for PCNA, 198 bp for cyclin E and 220 bp for β -actin) were purified with the Prep A gene DNA purification matrix kit (Biorad), and their sequences were determined according to the dideoxy chain-termination method [35] and were found identical to those published previously.

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 X100 and protease inhibitor cocktail, at 4°C for 20 min. After centrifugation at 17,000 g for 20 min at 4°C, the supernatant was collected as total protein extract. Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared as described previously [36]. The cells were rinsed twice with PBS and were scraped with a rubber policeman in PBS. After a brief centrifugation at 100 g for 5 min at 4°C, the cells were resuspended in 10 mM HEPES, pH 7.9, containing 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA and EGTA, 1 mM dithiothreitol, and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and incubated for 15 min on ice. The cells were gently lysed by the addition of 0.6% (v/v) Nonidet P-40 and centrifuged at 200 g and 4°C for 5 min. The supernatant was collected as the cytoplasmic extract. Pelleted nuclei were resuspended and lysed in 20 mM HEPES, pH 7.9, containing 400 mM NaCl, 1 mM EDTA and EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.25% (v/v) Nonidet P-40. After centrifugation at 12,000 g for 10 min and at 4°C, the supernatant was collected as nuclear extract. Protein concentrations were determined in the total, nuclear and cytoplasmic extracts according to Lowry *et al.*, [37], using bovine serum albumin as a standard (Biorad).

Western Blot Analysis

Total proteins (50 μ g), nuclear proteins (20 μ g) and cytoplasmic proteins (30 μ g) were run on SDS-polyacrylamide gels (12%), according to Laemmli [38], and transferred onto a PVDF membrane as described previously [39]. Immunoblot analysis was then carried out using specific polyclonal anti-DDB1, anti-DDB2, anti-Histone H1 (Santa Cruz Biotechnology) and anti-catalase [40] at the optimized dilutions. Bands were detected using an anti-IgG polyclonal antibody conjugated to peroxidase (Sigma), after exposition to a chemiluminescent substrate. Band intensities were quantified by densitometry with a Gel Doc 2000 system (Biorad). The results from Western blots were expressed as relative densitometric units from three independent experiments \pm SD. Equal loading of protein in all experiments was confirmed by Coomassie blue staining of blots.

In Situ Immunofluorescence

The cells were seeded at 1×10^4 cells/well in a 4 chamber slide (NUNC Lab-Tek II, Euromedex) and incubated at 37°C for 5 days before confluence. The cells were rinsed twice with PBS and fixed in 3% formaldehyde in PBS for 10 min and permeabilized in methanol for 20 min at 4°C. After blocking with 0.1% fish gelatin/0.8% bovine serum albumin/0.002% Tween-80, the cells were then exposed to the primary polyclonal antibodies anti-DDB1, anti-DDB2 and anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Santa Cruz Biotechnology), diluted at 1:100, for 30 min

at 37°C. After two washes in PBS, the cells were incubated with FITC-conjugated bovine anti-rabbit immunoglobulins, diluted at 1:100 (Santa Cruz Biotechnology), in PBS for 20 min at 37°C. A negative control was performed without the primary antibody. The cells were then mounted in anti-fading medium (Citifluor, Link Analytical). Images of cellular immunofluorescence were acquired using an epifluorescence microscope Eclipse 80i with 40X objective (488 nm excitation and 518 emission) and captured with a coupled digital camera (Nikon) (See Supplemental data).

DDB2 Expression Vector and Transfection

The full-length human DDB2 cDNA containing the entire open reading frame (1300 bp) was isolated from MCF-7 cells by RT-PCR using the Hi-fidelity Extensor PCR kit (AB Gene), and the forward (5'-GGACTGGGTACCACACGGAGGACGCGATG-GCTC-3') and the reverse primers (5'-CTGAGCTCTAGAT-CACTTCCGTGTCCTGGCTTCC-3'), with *Kpn I* and *Xba I* ends, respectively, according to the manufacturer's instructions. The resulting DDB2 cDNA was inserted between the *Kpn I* and *Xba I* sites into a pcDNA3.1(+) mammalian expression vector (Invitrogen), driven by a cytomegalovirus promoter. The complete sequence of the cDNA was verified by DNA sequence analysis. The DDB2 cDNA was also subcloned into a pEF1/Myc-HisB vector (Invitrogen) between the *Kpn I* and *Xba I* sites, to produce a Myc-polyhistidine-tagged DDB2 protein (See Supplemental data). The expression vectors included a Neo resistance gene driven by the SV40 promoter for clone selection. The size of the recombinant protein was verified by using the wheat germ lysate transcription-translation TNT kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. Four µg of pcDNA3(+) or pEF1/Myc-HisB plasmid containing either DDB2 cDNA or no insert were used for stable transfection of MDA-MB231 or COS-7 cells, with TransPEI reagent (Eurogentec), according to the manufacturer's instructions. The clones were selected with 800 µg/ml of G418 for 4 weeks. Single colonies were isolated and then screened for levels of the expression of DDB2 protein by Western blot analysis. Five days before these experiments, the cells were placed into complete medium without G418 supplement.

DDB2-siRNA Vector and Transfection

siRNA oligonucleotides were obtained from Eurogentec in a purified and annealed duplex form. The sequences targeting the human DDB2 gene are: target 1 for DDB2, 5'-AGAGCGA-GAUCCGAGUUUAA-3' (sense) and 5'-UAAACUCGGAUCU-CGCUCUU-3' (antisense); target 2 for DDB2, 5'-UCAGUUCG-CUAAUGAAUUU-3' (sense) and 5'-AAUUCAUUAAGC-GAACUGAA-3' (antisense); target 3 for DDB2, 5'-UCACUG-GGCUGAAGUUUAA-3' (sense) and 5'-UAAACUUCAGCC-CAGUGAA-3' (antisense). Scrambled siRNA with the following sequence: 5'-UAAACUUCAGCCCAGUGA-3' (sense) and 5'-CAGUAAACGCCGUCUUUAUA-3' (antisense) was used as the control. siRNA transfection experiments were carried out using jetSi-ENDO transfection reagent with 100 nM siRNA, according to the manufacturer's instructions (Eurogentec). Twenty-four hours following siRNA transfection, the cells were used to analyze the expression of DDB2 protein (see Supplemental data). Double strand DNA oligonucleotide encoding the effective siRNA in the knockdown of DDB2 was synthesized with a loop sequence TTCAAGAGA and a RNA pol III terminator sequence consisting of a 6 poly T. This double strand DNA oligonucleotide was cloned into the RNAi-ready pSIREN vector (BD Biosciences Clontech) between the *BamHI* and *EcoRI* restriction sites with the U6 promoter. This vector contains a puromycin resistance gene for the selection of stable transfectants. A unique *Xba I* restriction site

was placed downstream of the terminator sequence for restriction digest analysis to confirm the presence of the cloned insert. Four µg of pSIREN/U6/DDB2-siRNA vector or pSIREN/U6 empty vector were used for stable transfection of MCF-7 cells with TransPEI transfection reagent, according to the manufacturer's instructions (Eurogentec). The MCF-7 clones were selected with 0.5 µg/ml of puromycin for 3 weeks. Single colonies were isolated and then screened for levels of the expression of DDB2 protein by RT-PCR and Western blot analyses. Five days before the experiments, the cells were placed into complete medium without puromycin 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. The data from cell growth were expressed as means \pm SD from at least three independent experiments, each being performed in triplicate.

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. Results were expressed as follows: colony formation (%) = (colonies formed/cells seeded) \times 100%. The data from colony formation were expressed as means \pm SD from at least three independent experiments, each being performed in triplicate.

Flow Cytometry Analysis

Cells (2×10^4 /ml) were plated in 75 cm² culture dishes and grown in complete RPMI 1640 culture medium. After a 3-day culture, the cells were washed three times with PBS and then synchronized by serum starvation for 48h. The cells were then induced to re-enter the cell cycle by the addition of serum for 0, 3, 12 or 18h and were harvested by trypsinization. The pellet of cells was resuspended in 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X100 and 50 µg/ml propidium iodide (PI), and then stored for 24h at 4°C. After centrifugation at 300 g for 5 min, the cells were resuspended in PBS containing 50 µg/ml of RNase, and the DNA content was determined by Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis using an Orthocyte flow cytometer (Ortho Diagnostic Systems). To aid in the determination of the ability of the serum-starved cells to re-enter the S phase of the cell cycle, 100 µM of 5 Bromodeoxyuridine (BrdU) were added to the culture medium for 20 min at the end of each incubation with serum (0, 3, 12 or 18h). Cells suspensions were prepared as described previously [41], using the FITC-coupled anti-BrdU monoclonal antibody provided by Dako and were then analyzed by FACS. The data were analyzed using Cell Quest software (BD Biosciences Clontech). The Labeling Index (LI) corresponded to the percentage of BrdU-positive cells. The G1/S subpopulation, corresponding to BrdU-positive cells containing G1 DNA and S fractions, was calculated from the LI and expressed as the percentage of 5 BrdU-positive cells.

Statistical Analysis

Evaluation of statistical significance for data from RT-PCR, Western blots, cell growth and colony formation was assessed

using analyses of variance (ANOVA) and the Fisher protected least significant difference test. Statistical significance was indicated as $*P < 0.05$. Statistical analysis for breast cancer samples from patients was performed using the Mann Whitney test. Correlation between different gene expressions was performed with Pearson correlation coefficient method. Differences were considered to be statistically significant at a value of $P < 0.05$.

Supporting Information

Figure S1 Localization of DDB1 and DDB2 in MCF-7 cells by immunocytochemistry. (A) DDB1 and DDB2 were detected by indirect immunofluorescence using the respective polyclonal antibodies. PCNA corresponding to the positive control was also detected by a specific polyclonal antibody. Negative control was performed without the primary antibody. (B) The presence of DDB1 and DDB2 were detected by Western blotting in total (50 μ g), nuclear (20 μ g) and cytoplasmic proteins (30 μ g), using specific polyclonal antibodies. Positive controls corresponding to the cytoplasmic catalase and the nuclear histone H1 were detected by Western blotting with the respective polyclonal antibodies. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0002002.s001 (0.11 MB TIF)

Figure S2 Identification of DDB2-specific siRNA suppressing DDB2 protein level in MCF-7 cells and Poly His tagged DDB2-overexpressing COS-7 cells. (A) MCF-7 cells were transfected with 100 nM of three different DDB2-specific siRNA for 24h. Suppression of DDB2 protein level was assessed by Western blot analysis using equal amounts of protein (50 μ g) and the anti-DDB2 polyclonal antibody. Results were compared to the non-transfected cells (-) and to the scrambled siRNA-transfected cells (C). (B) COS-7 cells were stably transfected either with empty vector-transfected cells (Neo) or with His-Myc tagged DDB2 expression vector. Myc-His tagged DDB2 overexpression was verified by Western blot analysis and is indicated by an arrow. (C)

References

1. Chu G, Chang E (1988) Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. *Science* 242: 564–567.
2. Payne A, Chu G (1994) Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage. *Mutat Res* 310: 89–102.
3. Moser J, Volker M, Kool H, Alekseev S, Vrieling H, et al. (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.
4. Hwang BJ, Toering S, Francke U, Chu G (1998) p48 Activates a UV-damaged-DNA binding factor and is defective in xeroderma pigmentosum group E cells that lack binding activity. *Mol Cell Biol* 18: 4391–4399.
5. Datta A, Bagchi S, Nag A, Shiyonov P, Adami GR, et al. (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.
6. Martinez E, Palhan VB, Tjernberg A, Lyman ES, Gamper AM, et al. (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.
7. Shiyonov P, Nag A, Raychaudhuri P (1999) Cullin 4A associates with the UV-damaged DNA-binding protein DDB. *J Biol Chem* 274: 35309–35312.
8. Hayes S, Shiyonov P, Chen X, Raychaudhuri P (1998) DDB, a putative DNA repair protein, can function as a transcriptional partner of E2F1. *Mol Cell Biol* 18: 240–249.
9. Tan T, Chu G (2002) p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. *Mol Cell Biol* 22: 3247–3254.
10. Hartman AR, Ford JM (2002) BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet* 32: 180–184.
11. Takimoto R, MacLachlan TK, Dicker DT, Niitsu Y, Mori T, et al. (2002) BRCA1 transcriptionally regulates damaged DNA binding protein (DDB2) in the DNA repair response following UV-irradiation. *Cancer Biol Ther* 1: 177–186.
12. Nag A, Bondar T, Shiv S, 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.
13. Chen X, Zhang Y, Douglas L, Zhou P (2001) UV-damaged DNA-binding proteins are targets of CUL-4A-mediated ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* 276: 48175–48182.
14. Nichols AF, Ong P, Linn S (1996) Mutations specific to the xeroderma pigmentosum group E Ddb- phenotype. *J Biol Chem* 271: 24317–24320.
15. Nichols AF, Itoh T, Graham JA, Liu W, Yamaizumi M, et al. (2000) Human damage-specific DNA-binding protein p48. Characterization of XPE mutations and regulation following UV irradiation. *J Biol Chem* 275: 21422–21428.
16. Itoh T, O'Shea C, Linn S (2003) Impaired regulation of tumor suppressor p53 caused by mutations in the xeroderma pigmentosum DDB2 gene: mutual regulatory interactions between p48(DDB2) and p53. *Mol Cell Biol* 23: 7540–7553.
17. Yoon T, Chakraborty A, Franks R, Valli T, Kiyokawa H, et al. (2005) Tumor-prone phenotype of the DDB2-deficient mice. *Oncogene* 24: 469–478.
18. Alekseev S, Kool H, Rebel H, Foustier M, Moser J, et al. (2005) Enhanced DDB2 expression protects mice from carcinogenic effects of chronic UV-B irradiation. *Cancer Res* 65: 10298–10306.
19. Kulaksiz G, Reardon JT, Sancar A (2005) Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties. *Mol Cell Biol* 25: 9784–9792.
20. Zhang SY, Liu SC, Al-Saleem LF, Holloran D, Babb J, et al. (2000) E2F-1: a proliferative marker of breast neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 395–401.
21. Hu Z, Shao M, Yuan J, Xu L, Wang F, 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.
22. Itoh T, Iwashita S, Cohen MB, Meyerholz DK, Linn S (2007) Ddb2 is a haploinsufficient tumor suppressor and controls spontaneous germ cell apoptosis. *Hum Mol Genet* 16: 1578–1586.
23. Inoki T, Yamagami S, Inoki Y, Tsuru T, Hamamoto T, et al. (2004) Human DDB2 splicing variants are dominant negative inhibitors of UV-damaged DNA repair. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 1036–1043.
24. Nichols AF, Itoh T, Zolezzi F, Hutsell S, Linn S (2003) Basal transcriptional regulation of human damage-specific DNA-binding protein genes DDB1 and DDB2 by Sp1, E2F, N-myc and NFI elements. *Nucleic Acids Res* 31: 562–569.
25. Keeney S, Chang GJ, Linn S (1993) Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E. *J Biol Chem* 268: 21293–21300.

Myc-His tagged DDB2 overexpressing-COS-7 cells were transfected with 100 nM of the three different DDB2-specific siRNA for 24h. Suppression of Myc-His tagged DDB2 protein level was assessed by Western blot analysis using equal amounts of protein (50 μ g) and results were compared to those from Myc-His tagged DDB2 overexpressing-COS-7 cells without siRNA (-) or transfected with the scrambled siRNA (C).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0002002.s002 (0.06 MB TIF)

Figure S3 PCNA, cyclin E and DHFR expression in human breast tumors from patients. Total RNA was extracted from eight ER-positive and eight ER-negative breast cancer samples, then subjected to semiquantitative RT-PCR analysis. (A) The relative levels of PCNA, cyclin E and DHFR mRNAs were normalized to those of β -actin mRNA. Statistically significant differences between ER-positive and ER-negative samples are indicated as $P < 0.05$. The mean values are indicated by a bar in graph for each group of tumors and PCNA, cyclin E or DHFR mRNA levels. (B) Correlation between relative PCNA, cyclin E or DHFR and DDB2 mRNA levels was performed with Pearson correlation coefficient method. Differences were considered to be statistically significant at a value of $P < 0.05$.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0002002.s003 (0.04 MB TIF)

Acknowledgments

Z. Kattan has a fellowship from Syrian Government. The authors are grateful to Dr. A. Taube and Pr. S. Thornton for critical reading of the manuscript and A.S. Chretien for statistical analyses.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PB ZK. Performed the experiments: SM EB CR AL ZK. Analyzed the data: PB SM ZK JM LD MD. Contributed reagents/materials/analysis tools: SM AL ZK. Wrote the paper: PB.

26. Prost S, Lu P, Caldwell H, Harrison D (2007) E2F regulates DDB2: consequences for DNA repair in Rb-deficient cells. *Oncogene* 26: 3572–3581.
27. Elstner E, Williamson EA, Zang C, Fritz J, Heber D, et al. (2002) Novel therapeutic approach: ligands for PPAR γ and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 74: 155–165.
28. Stevens C, La Thangue NB (2004) The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* 3: 1071–1079.
29. Nielsen NH, Emdin SO, Cajander J, Landberg G (1997) Deregulation of cyclin E and D1 in breast cancer is associated with inactivation of the retinoblastoma protein. *Oncogene* 14: 295–304.
30. Johnson DG, Cress WD, Jakoi L, Nevins JR (1994) Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12823–12827.
31. DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR (1997) Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7245–7250.
32. Hartman AR, Ford JM (2003) BRCA-1 and p53: compensatory roles in DNA repair. *J Mol Med* 8: 700–707.
33. Kattan Z, Minig V, Leroy P, Dauca M, Becuwe P (2007) Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. In press.
34. Dualan R, Brody T, Keeney S, Nichols AF, Admon A, et al. (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.
35. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463–5467.
36. Olnes MJ, Kurl RN (1994) Isolation of nuclear extracts from fragile cells: a simplified procedure applied to thymocytes. *Biotechniques* 17: 828–829.
37. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
38. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
39. 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.
40. El Bouhtoury F, Keller JM, Colin S, Parache RM, Dauca M (1992) Peroxisomal enzymes in normal and tumoral human breast. *J Pathol* 166: 27–35.
41. Mirjolet JF, Didelot C, Barberi-Heyob M, Merlin JL (2002) G(1)/S but not G(0)/G(1) cell fraction is related to 5-fluorouracil cytotoxicity. *Cytometry* 48: 6–13.

CHAPITRE 3

DISCUSSION GENERALE

5 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; Cobbs *et al.*, 1996; Cullen *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001b; Li *et al.*, 1998a; Nishida *et al.*, 1993). 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 oestrogènes. L'existence d'un mécanisme distinct de la régulation du gène *SOD2* entre les cellules tumorales mammaires, impliquant à la fois la protéine DDB2 et le facteur de transcription AP-2 α (Minig *et al.*, 2009), nous a conduits dans ce travail à étudier le rôle joué par cette enzyme antioxydante et la DDB2, à la fois sur la prolifération et sur l'invasion de ces cellules.

5.1 Le rôle 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'O₂^{°-} et de l'H₂O₂, 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'H₂O₂ (Ridnour *et al.*, 2004).

5.1.1 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 SKBR3) 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-, 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 (Mates 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 présentent un taux de doublement cellulaire d'environ 36 heures, comparativement aux 20 heures pour les cellules MCF-7, tandis qu'elles surexpriment naturellement la SOD Mn. 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.*, 2001b; Li *et al.*, 1999). D'après la littérature, une expression constitutive faible de la SOD Mn entraîne l'accumulation d'O₂^{°-} 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'H₂O₂ 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'H₂O₂ 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'H₂O₂ 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'H₂O₂, 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 (Chang *et al.*, 2004; Mates et Sanchez-Jimenez, 2000), 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'H₂O₂ produit par l'activité soutenue de la SOD Mn jouerait ainsi le 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 ; Kucharczak *et al.*, 2003; Ozanne *et al.*, 2007), 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 (Allen et Tresini, 2000; Thannickal et Fanburg, 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'H₂O₂ 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 qu' H_2O_2 joue un rôle dans la prolifération des cellules tumorales, en activant comme l' $\text{O}_2^{\circ-}$, 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 conduits 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.

5.1.2 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 (Janssen *et al.*, 1998 ; Janssen *et al.*, 2000; Kahlos *et al.*, 1998; Malafa *et al.*, 2000; Nakata *et al.*, 1992 ; Nishida *et al.*, 1993 ; Ria *et al.*, 2001 ; Toh *et al.*, 2000b). 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- (MDA-MB231 et SK-BR-3) sont hautement invasives et métastatiques mais prolifèrent lentement, les lignées cellulaires ER+ (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- comparativement aux cellules ER+, 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 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-. 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 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- κ B, qui sont constitutivement activés dans les cellules MDA-MB231 (Sato et Seiki, 1993; Xu *et al.*, 1999a). 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 (Connor *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2003). 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 qu' 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 que les cellules invasives ont un temps de doublement plus grand 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-2 α , 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-2 α 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.

5.1.3 Régulation de l'expression constitutive de la SOD Mn

Nous avons montré que 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 (Cobbs *et al.*, 1996 ; Izutani *et al.*, 1998; Izutani *et al.*, 1996 ; Janssen *et al.*, 1998 ; Kahlos *et al.*, 1998 ; Kahlos *et al.*, 2000 ; Kinnula *et al.*, 1996 ; Landriscina *et al.*, 1996 ; Nakata *et al.*, 1992 ; Nishida *et al.*, 1993 ; Ria *et al.*, 2001). Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de cette expression constitutive élevée de l'enzyme antioxydante ne sont pas connus.

Un travail réalisé dans le laboratoire a montré que l'expression constitutive du gène *SOD2*, dépendante de sa région proximale, fait intervenir essentiellement le facteur de transcription Sp1 (Minig *et al.*, 2009), comme cela a été montré dans d'autres types cellulaires (Xu *et al.*, 1999a). De plus, ce travail a montré que l'expression constitutive élevée dans les cellules MDA-MB231 est également associée à une expression faible d'un régulateur négatif comme AP2 α . Lorsque ces cellules sont exposées à un inhibiteur des méthylases, qui restaure l'expression d'AP-2 α , l'expression de la SOD Mn est significativement diminuée. De nombreuses méthylations ont été observées dans le promoteur du gène codant AP-2 α dans les

cellules MDA-MB231 (Douglas *et al.*, 2004; Wajapeyee *et al.*, 2005), expliquant sa très faible expression. De plus, il est connu qu'AP-2 α exerce ce rôle répresseur sur l'expression constitutive du gène *SOD2* en interférant avec Sp1, dans les cellules normales et certaines cellules tumorales (Xu *et al.*, 2002; Yeh *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001). Il n'est pas exclu la participation de NF- κ B 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). Comme nous le verrons dans la partie 3 de la discussion, l'absence d'expression de la DDB2 est également associée à l'expression constitutive élevée de la SOD Mn dans les cellules MDA-MB231.

5.2 Le rôle de la DDB2 dans la croissance tumorale mammaire

Plusieurs observations émanant de la littérature ont révélé la protéine DDB2 comme un suppresseur de tumeur. Cependant, certaines de ces observations nous ont conduits à s'interroger quant au rôle exact de cette protéine, tels que son interaction avec le facteur de transcription E2F1, qui est souvent surexprimé dans les adénocarcinomes mammaires. De même, à partir des résultats obtenus dans le laboratoire qui montraient l'activité régulatrice de la DDB2 sur l'expression du gène de la SOD Mn dans les cellules d'adénocarcinome mammaire MCF-7. En étudiant son expression et en caractérisant son rôle, l'ensemble de ce travail indique que la DDB2 présente une activité oncogénique dans le cancer du sein, ce que nous allons discuter maintenant.

5.2.1 Surexpression du gène DDB2 dans les cellules tumorales mammaires ER positives

C'est la première fois qu'une surexpression de la DDB2 est mise en évidence dans des cellules cancéreuses mammaires, exprimant le récepteur aux oestrogènes, comparativement aux cellules ER-négatives et aux cellules épithéliales mammaires normales. L'expression de cette protéine a déjà été mise en évidence dans d'autres types de cellules cancéreuses, telles que des lignées de cellules d'adénocarcinome coliques et les cellules HeLa (Keeney *et al.*, 1993; Takimoto *et al.*, 2002).

Nous avons observé une corrélation entre l'expression élevée de la DDB2 et la présence du récepteur aux oestrogènes, à la fois dans les lignées cellulaires et dans les échantillons de tumeurs mammaires provenant de patientes atteintes d'un cancer du sein. Nous ne pouvons pas conclure quant à l'origine de cette surexpression du gène de la DDB2. Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse que les oestrogènes pourraient réguler le gène

codant la DDB2, ce qui constitue une perspective intéressante de travail. Néanmoins, il n'est pas exclu l'implication d'autres facteurs de transcription, tels que Sp1, NF1 et E2F, qui sont décrits comme impliqués dans la régulation du gène de la DDB2, en se fixant sur un élément de réponse situé dans la région promotrice (Nichols *et al.*, 2003; Prost *et al.*, 2007). De plus, il est possible que la protéine p53 ainsi que BRCA1 jouent un rôle dans la régulation de l'expression de la DDB2, puisque les lignées cellulaires MCF-7 et T47D expriment ces deux protéines (Hartman et Ford, 2002; Tan et Chu, 2002). Dans le cas de la p53, un élément de réponse spécifique a été mis en évidence dans la région promotrice du gène de la DDB2, à la fois chez la souris et l'homme. Par contre, les cellules ER négatives utilisées dans notre étude n'expriment aucune de ces deux protéines. D'après une observation faite dans le laboratoire, l'absence d'expression de la DDB2 dans les cellules ER négatives n'est pas liée à une hyperméthylation de son gène.

5.2.2 Rôle de la DDB2 dans la prolifération cellulaire

Afin d'étudier le rôle exact de la DDB2 dans les cellules cancéreuses mammaires, nous avons développé des modèles transgéniques, dans lesquels l'expression de cette protéine est modulée positivement ou négativement. A partir d'une sélection rigoureuse des clones cellulaires ayant l'expression de la DDB2 la plus modulée comparativement aux cellules témoins, nous avons étudié les conséquences sur la prolifération cellulaire. En effet, l'expression élevée de la protéine dans les cellules sauvages T47D et MCF-7 est corrélée avec la vitesse de prolifération, tandis que l'absence d'expression est corrélée avec les capacités invasives des cellules MDA-MB231 et les SKBR3. De même, les cellules épithéliales mammaires HMEC, n'exprimant pas la DDB2 ont une vitesse de prolifération très lente en culture.

Les résultats montrent que la protéine DDB2 joue un rôle dans la prolifération et les capacités de formation des colonies des cellules ER-positives. L'analyse par cytométrie de flux révèle que la DDB2 agit sur la prolifération au niveau de la phase de transition G1/S du cycle cellulaire. L'implication de la DDB2 dans le passage de ce point de contrôle du cycle cellulaire est corrélée avec l'observation dans la littérature que l'expression de cette protéine est maximale à la phase de transition G1/S dans les cellules normales en division et ne présentant pas de lésions dans leur ADN (Nag *et al.*, 2001).

Ces résultats sont également confortés par la corrélation étroite qui existe entre l'expression de la DDB2 et celles des gènes codant des protéines indispensables dans le

passage des cellules dans la phase S du cycle cellulaire, telles que la cycline E, la DHFR et le PCNA. Ces gènes sont régulés par le facteur de transcription E2F1, qui est connu pour stimuler les cellules à passer le point G1/S de restriction et à progresser dans la phase S du cycle cellulaire (Stevens et La Thangue, 2004). Il a d'ailleurs été montré que la protéine DDB2 peut interagir avec ce facteur de transcription, qui acquiert ainsi une activité transcriptionnelle plus élevée (Hayes *et al.*, 1998). De plus, E2F1 est particulièrement surexprimé, ainsi que ses gènes cibles comme PCNA et la cycline E dans les cellules tumorales mammaires, (Nielsen *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000). L'hypothèse selon laquelle le rôle de la DDB2 sur la prolifération cellulaire serait dépendante de son interaction avec E2F1 reste cependant à démontrer. Ainsi, un des mécanismes dans lequel la DDB2 joue un rôle dans la prolifération cellulaire correspondrait à son interaction avec E2F1 pour augmenter l'activité transcriptionnelle de ce dernier.

Un autre mécanisme à l'origine du rôle de la DDB2 dans la prolifération cellulaire serait son rôle de régulateur de la transcription de gènes dont le produit respectif est impliqué dans ce processus biologique. En effet, un travail très récent dans le laboratoire a montré que la DDB2 possède une activité régulatrice de la transcription de gène, tel que celui codant la superoxyde dismutase (Minig *et al.*, 2009). Les conséquences de l'inhibition de l'expression de la DDB2 par ARN interférence sur celle des gènes codant la cycline E, le PCNA et la DHFR pourraient dépendre d'une régulation de la transcription de ces gènes par la protéine DDB2. Dans ce sens, une analyse transcriptomique très récente, réalisée au laboratoire sur le modèle de cellules MCF-7 ayant l'expression de la DDB2 inhibée, a confirmé que plusieurs gènes, impliqués dans la prolifération et la régulation du cycle cellulaires, sont fortement réprimés. Parmi ces gènes, celui codant PCNA a été retrouvé dans la liste. Il semble donc exister une relation étroite entre l'expression de la DDB2 et celle de PCNA, sachant que cette dernière est connue pour son rôle comme co-activateur des enzymes de la réplication de l'ADN.

5.2.3 Relation entre la DDB2 et la réplication de l'ADN

Nos résultats, montrant l'importance de la DDB2 dans le passage de la phase de transition G1/S et dans la progression dans la phase S du cycle cellulaire, ainsi que la corrélation entre son expression et celle de PCNA, nous amènent à émettre l'hypothèse selon laquelle cette sous-unité du complexe UV-DDB interviendrait dans la réplication de l'ADN. Quelques observations décrites dans la littérature vont également dans ce sens. La réparation

de l'ADN par le système NER nécessite un blocage de la réplication de l'ADN afin d'empêcher la transmission aux futures cellules filles, toutes mutations provoquées par les lésions de l'ADN. la DDB2, lorsque les lésions de l'ADN sont détectées, est rapidement ubiquitinylée par le complexe DDB1-Cul-4A-ROC1, avant d'être dégradée par le protéasome 26S (Chen *et al.*, 2006; Matsuda *et al.*, 2005; Rapic-Otrin *et al.*, 2002). Cette dégradation rapide de la DDB2 nécessite son interaction avec la claspine, une protéine connue pour son rôle dans le contrôle de l'arrêt de la réplication lorsque l'ADN est lésé (Praetorius-Ibba *et al.*, 2007). La réapparition de la protéine DDB2 n'est observée que lorsque la réparation des lésions d'ADN est terminée, et est associée avec le redémarrage de la prolifération des cellules normales. L'expression de la DDB2 est ensuite maximale à la phase de transition G1/S dans les cellules normales (Nag *et al.*, 2001). De même, plusieurs études récentes ont montré une interaction physique entre certaines protéines impliquées dans la réplication de l'ADN et ce complexe DDB1-Cul-4A-ROC1, montrant l'importance de ce dernier dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, le complexe DDB1-Cul-4A-ROC1, indépendamment de la DDB2, dégrade rapidement plusieurs protéines impliquées dans la réplication, telle que CDT1 qui, en interagissant avec la protéine PCNA, initie la réplication de l'ADN (Kim et Kipreos, 2007; Senga *et al.*, 2006). Le complexe DDB1-Cul-4A-ROC1 dégrade également des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, telles que les inhibiteurs de CDK p21Waf1/Cip1 et la p27 Kip1 (Bondar *et al.*, 2006 ; Cang *et al.*, 2007; Nishitani *et al.*, 2006). L'ensemble de ces observations décrites dans la littérature, associé aux résultats que nous avons obtenus, nous conduisent à présenter la DDB2 comme une protéine qui jouerait un rôle dans le mécanisme de réplication de l'ADN, dans les cellules ayant une capacité proliférative élevée, comme les cellules tumorales mammaires ER positives. Ces dernières, en surexprimant la DDB2, aurait un avantage sur la vitesse de prolifération que l'on observe *in vitro*, comparativement aux cellules ER négatives qui sont plutôt invasives. Cette hypothèse reste à démontrer précisément.

5.2.4 La DDB2 : une nouvelle oncoprotéine dans le cancer du sein ?

A partir des résultats obtenus, la protéine DDB2 présente les caractéristiques d'une oncoprotéine potentielle dans le cancer du sein. En effet, elle est surexprimée dans les cellules tumorales mammaires ER positives et elle active leur prolifération, en agissant sur la phase de transition G1/S et la phase S du cycle cellulaire. Cette nouvelle activité de la DDB2 contraste avec celle couramment décrite dans la littérature. En effet, plusieurs observations ont montré que la DDB2 jouerait le rôle de suppresseur de tumeur dans les cellules normales. Des

mutations dans le gène codant une DDB2 non fonctionnelle, est responsable de la maladie autosomique récessive, le *Xeroderma Pigmentosum*. Les patients atteints de cette maladie développent des mélanomes lors d'une exposition aux UV solaires, à cause d'un défaut dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (Itoh, 2006). Chez des souris homozygotes invalidées du gène DDB2, des tumeurs se développent spontanément dans d'autres organes, même en l'absence d'irradiations aux UV (Itoh *et al.*, 2004; Itoh *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2005). A l'inverse, une surexpression de la DDB2 protège des souris de l'action carcinogène d'irradiations chroniques aux UV, en favorisant l'apoptose des cellules normales (Alekseev *et al.*, 2005).

Certaines protéines sont connues pour jouer des effets contraires, comme la DDB2, tantôt pro-prolifératives, tantôt anti-prolifératives voire pro-apoptotiques, selon les conditions. C'est le cas du facteur de transcription E2F1, qui dans des conditions normales, stimule la croissance cellulaire, en régulant l'expression de plusieurs gènes dont les protéines correspondantes sont impliquées dans la progression des cellules dans le cycle cellulaire (Johnson *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2000). Dans d'autres cas, lorsque l'ADN cellulaire est endommagé suite à un stress, E2F1 intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire et entraîne la cellule vers l'apoptose (DeGregori *et al.*, 1997). C'est ainsi qu'E2F1 est définie comme une protéine à activité « ying yang », une définition qui semble attribuable à la DDB2.

5.2.5 Intérêt clinique de la DDB2

La mise en évidence de cette nouvelle activité biologique de la DDB2 contribue à une meilleure compréhension des capacités prolifératives des cellules d'adénocarcinome mammaire. Elle présente un intérêt clinique important s'il s'avère, d'une part qu'il existe une relation entre le récepteur aux oestrogènes et l'expression du gène codant la DDB2, d'autre part si l'absence d'expression de la DDB2 représente une étape importante dans la progression des cellules tumorales vers un état métastatique. Dans ce sens, une étude de l'expression de la DDB2, dans un échantillon plus grand de tumeurs provenant de patientes atteintes d'un cancer du sein, sera nécessaire pour arriver à définir précisément cette protéine comme un marqueur pronostique en cancérologie mammaire. Enfin, il n'est pas exclu que la DDB2 joue un rôle dans l'efficacité des agents anticancéreux par rapport à son action positive sur la prolifération cellulaire.

5.3 Relation entre la DDB2, 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-2 α , il a été montré dans un travail antérieur réalisé dans le laboratoire (Minig *et al.*, 2009), que la protéine DDB2 possède une activité de régulateur de la transcription du gène SOD2 dans les cellules tumorales mammaires MCF-7. 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. Les résultats ont montré que la DDB2, lorsqu'elle est fixée sur sa séquence spécifique, localisée dans la région proximale du promoteur, maintient une transcription constitutive faible du gène *SOD2* dans cette lignée de cellules tumorales mammaires. Ces résultats ont été 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). Dans notre travail, nous avons pu observer une corrélation inverse entre l'expression de la SOD Mn et celle de la DDB2, et ce entre les lignées de cellules tumorales mammaires MCF-7 et MDA-MB231. 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 (Minig *et al.*, 2009).

Selon (Minig *et al.*, 2009), il a été montré que 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. Il semble donc que la DDB2 est impliquée dans la prolifération des cellules tumorales MCF-7, en exerçant son contrôle négatif sur l'expression de la SOD Mn. De plus, nous avons montré 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. La difficulté à entrer en phase S des cellules tumorales ayant une expression de DDB2 inhibée pourrait être liée à l'augmentation conséquente de la SOD Mn, car une étude récente révèle que la surexpression de l'enzyme antioxydante après 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 une stimulation de la prolifération cellulaire. 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 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. Ces nouvelles données qu'apporte ce travail, associées à celles précédemment obtenues dans le laboratoire, permettent de suggérer que la protéine DDB2 représenterait l'événement le plus précoce dans l'implication de la SOD Mn dans la croissance tumorale mammaire, et pourrait constituer un marqueur diagnostique des tumeurs ER+. Il conviendra donc de connaître dans l'avenir comment l'expression et l'activité de cette protéine DDB2 sont régulées dans les cellules tumorales mammaires.

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 elle-même est impliquée dans la modulation de la réponse à plusieurs agents anticancéreux (Hirose *et al.*, 1993; Izutani *et al.*, 2002 ; Martin *et al.*, 2007 ; Murley *et al.*, 2002 ; Suresh *et al.*, 2003), d'autre part elle influence la prolifération des cellules tumorales mammaires.

CHAPITRE 4

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

6 CONCLUSIONS

Ce travail a montré pour la première fois que la SOD Mn joue un rôle dans l'invasion des cellules tumorales mammaires, en exerçant un contrôle sur la concentration intracellulaire d' H_2O_2 , ce qui suggère que la SOD Mn pourrait être un facteur prédictif d'invasion tumorale dans le cancer du sein. Nous avons montré la participation de l' H_2O_2 , produite 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' $\text{O}_2^\circ-$.

Ce travail a également mis en évidence pour la première fois une nouvelle fonction biologique de la protéine DDB2 dans les cellules d'adénocarcinome mammaire exprimant le récepteur aux oestrogènes. Cette nouvelle fonction se caractérise par l'action de la DDB2 sur la prolifération de ces cellules tumorales, particulièrement en exerçant un rôle sur le passage des cellules en phase G1/S du cycle cellulaire. Il semble également que cette action soit dépendante de l'expression de gènes dont le produit correspondant est connu pour son implication dans cette phase du cycle cellulaire. Ces résultats sont à relier avec ceux précédemment obtenus dans le laboratoire, qui montrent que la DDB2 possède une activité de régulateur de la transcription, en particulier du gène codant la SOD Mn.

Nos résultats complètent ainsi ceux obtenus précédemment dans le laboratoire et nous permettent donc de proposer un schéma de synthèse, associant le mécanisme qui implique à la fois la protéine DDB2 et la SOD Mn dans la croissance des cellules tumorales mammaires ER- métastatiques et ER+ non métastatiques (**Figure 29**). Ce travail contribue ainsi à une avancée intéressante en cancérologie mammaire et nous permet d'entrevoir dans l'avenir un intérêt clinique important de la SOD Mn et de la DDB2 comme facteur pronostic de la progression tumorale mammaire.

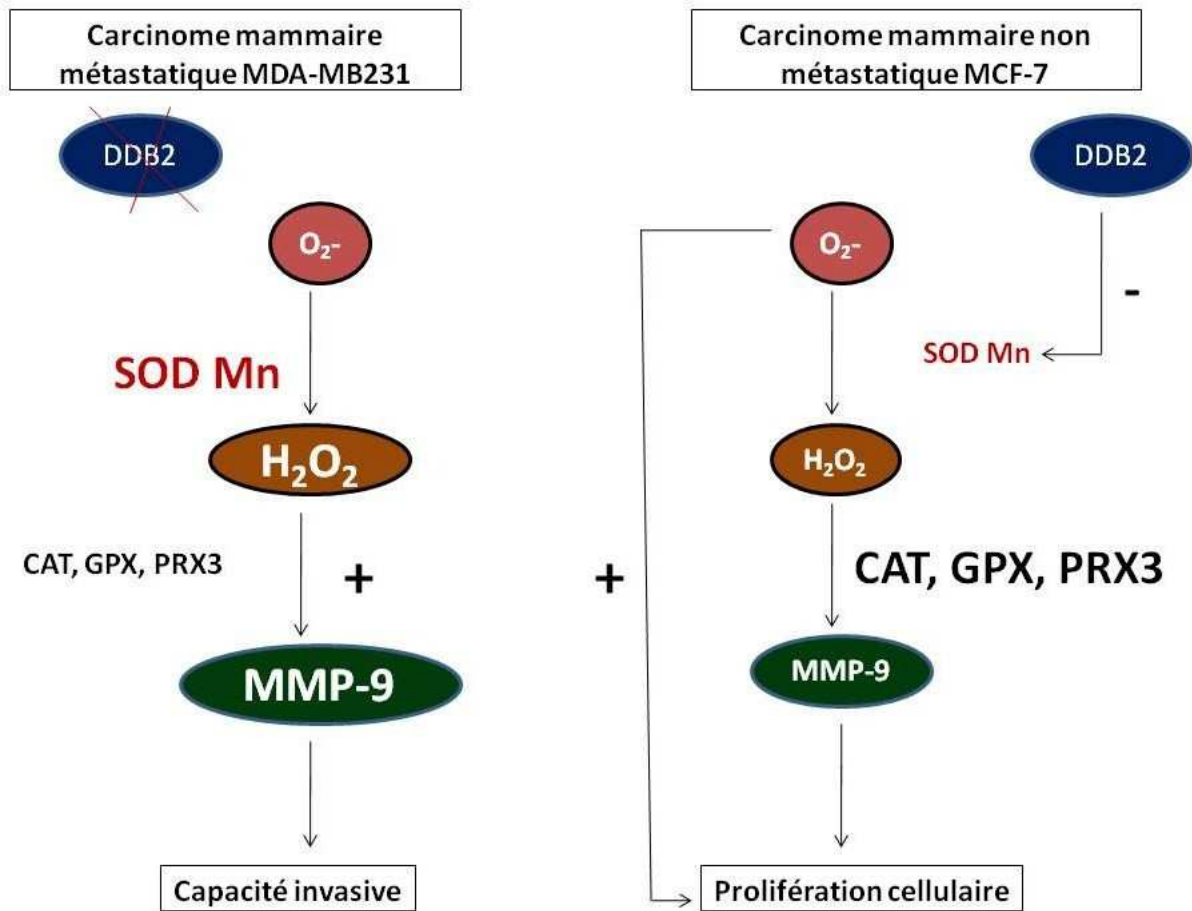


Figure 29 : Relation entre la DDB2, l'expression de la SOD Mn et la croissance tumorale mammaire

7 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 un activateur du passage de la phase de transition G1/S des cellules tumorales mammaires représente l'une des grandes originalités de nos résultats, qui associés à ceux précédemment obtenus, constituent actuellement l'orientation scientifique principale du laboratoire d'accueil.

Il conviendra en effet de rechercher comment le gène de la DDB2 est surexprimé dans les cellules tumorales mammaires ER+ et est réprimé dans les ER-. Nous nous focaliserons en particulier sur l'implication potentielle du récepteur aux oestrogènes. D'après une analyse récente de la séquence du promoteur du gène de la DDB2, la forme α de ce récepteur nucléaire possède plusieurs éléments de réponse spécifique.

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.

Les résultats précédemment obtenus au laboratoire, caractérisant la protéine DDB2 comme un régulateur de la transcription de gènes, laisse en effet entrevoir l'existence d'autres gènes cible. 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, en particulier les gènes de la cycline E, de la DHFR et du PCNA. Dans ce sens, une analyse transcriptomique comparative entre les cellules tumorales sauvages et celles ayant l'expression de la DDB2 inhibée est en cours au laboratoire. 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.

CHAPITRE 5

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

8 REFERENCES

- 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.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988.
- 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.

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.

Baatout, S., Derradji H., Petitfour, O., Suchodoletz, H.V., and Mergeay, M. (2002) Mechanisms of radioinduced apoptosis. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 80, 629-637.

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., Vandebunder, B., and Abbadie, C. (2001). Antiproliferative and antiapoptotic effects of c-rel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 61, 2656-2664.

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.

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.

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.

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

Cariou, S., Catzavelos, C., and Slingerland, J.M. (1998). Prognostic implications of expression of the cell cycle inhibitor protein p27Kip1. *Breast Cancer Res Treat* 52, 29-41.

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, E.Y., Choi, Y.L., Han, J.J., Kim, K.M., and Oh, Y.L. (2008). Expression and amplification of Her2, EGFR and cyclin D1 in breast cancer: immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Pathol Int* 58, 17-25.
- 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.
- 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.
- Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., and Maniatis, T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9, 899-909.
- 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.
- 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.

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., Shiyonov, 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.

DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L., and Nevins, J.R. (1997). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7245-7250.

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.

Deng, C.X. (2006). BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res* 34, 1416-1426.

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.

Doroshov, 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.

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.

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.

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.

Foster, J.S., Henley, D.C., Ahamed, S., and Wimalasena, J. (2001). Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 12, 320-327.

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.

Gabelman, B.M., and Emerman, J.T. (1992). Effects of estrogen, epidermal growth factor, and transforming growth factor- α 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 1 α and vascular endothelial growth factor induction by Cr(VI) in DU145 human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 277, 45041-45048.

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 route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett* 266, 73-83.

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.

Gottardis, M.M., Saceda, M., Garcia-Morales, P., Fung, Y.K., Solomon, H., Sholler, P.F., Lippman, M.E., and Martin, M.B. (1995). Regulation of retinoblastoma gene expression in hormone-dependent breast cancer. *Endocrinology* 136, 5659-5665.

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 Ropic-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.* (2003). Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol Cell Biol* 23, 2362-2378.

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.

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. (2002). BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet* 32, 180-184.

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., Shiyonov, 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.

Henttu, P.M., Kalkhoven, E., and Parker, M.G. (1997). AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 17, 1832-1839.

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.

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.

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.

Inoue, J., Gohda, J., Akiyama, T., and Semba, K. (2007). NF-kappaB activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci* 98, 268-274.

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 dismutase 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 TNF α 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.

Jager, J.J., Jansen, R.L., and Arends, J.W. (2002). Clinical relevance of apoptotic markers in breast cancer not yet clear. *Apoptosis* 7, 361-365.

Jaiswal, A.K. (2000). Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radic Biol Med* 29, 254-262.

Janicke, F., Prechtel, A., Thomssen, C., Harbeck, N., Meisner, C., Untch, M., Sweep, C.G., Selbmann, H.K., Graeff, H., and Schmitt, M. (2001). Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 93, 913-920.

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.

Janssen, A.M., Bosman, C.B., van Duijn, W., Oostendorp-van de Ruit, M.M., Kubben, F.J., Griffioen, G., Lamers, C.B., van Krieken, J.H., van de Velde, C.J., and Verspaget, H.W. (2000). Superoxide dismutases in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 6, 3183-3192.

Jarvinen, T.A., Pelto-Huikko, M., Holli, K., and Isola, J. (2000). Estrogen receptor beta is coexpressed with ER α and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 156, 29-35.

Johnson, D.G., Cress, W.D., Jakoi, L., and Nevins, J.R. (1994). Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12823-12827.

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.

Kaaks, R. (2002). Nutrition, energy balance and colon cancer risk: the role of insulin and insulin-like growth factor-I. *IARC Sci Publ* 156, 289-293.

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 α 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., 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.

- 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.
- 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., Syvaioja, 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.
- 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.
- Keyomarsi, K., and Pardee, A.B. (1993). Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 1112-1116.
- 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, D.W., Sovak, M.A., Zanieski, G., Nonet, G., Romieu-Mourez, R., Lau, A.W., Hafer, L.J., Yaswen, P., Stampfer, M., Rogers, A.E., *et al.* (2000). Activation of NF-kappaB/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells. *Carcinogenesis* *21*, 871-879.

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., Coffey, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

Macleod, K. (2000). Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 10, 81-93.

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. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7634-7638.

Marklund, S.L., Westman, N.G., Lundgren, E., and Roos, G. (1982). 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., 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., Lyman, 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.

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.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., and Reed, J.C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.

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 Denizau, 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 (hgp1). *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.

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.

Nielsen, N.H., Emdin, S.O., Cajander, J., and Landberg, G. (1997). Deregulation of cyclin E and D1 in breast cancer is associated with inactivation of the retinoblastoma protein. *Oncogene* 14, 295-304.

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.

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-induced apoptosis of human peripheral T cells: involvement of lysosomal membrane destabilization. *Int J Mol Med* 13, 69-73.

Okochi, E., Watanabe, N., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2002). Single nucleotide instability: a wide involvement in human and rat mammary carcinogenesis? *Mutat Res* 506-507, 101-111.

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.

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.

Owen-Schaub, L.B., Angelo, L.S., Radinsky, R., Ware, C.F., Gesner, T.G., and Bartos, D.P. (1995). Soluble Fas/APO-1 in tumor cells: a potential regulator of apoptosis? *Cancer Lett* 94, 1-8.

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.

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.

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., Siple, 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/EBP β 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., 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., Nexø, 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 H₂O₂: 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.

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 phagocytosing 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, 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.

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.

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., Chandrapaty, 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 Czczot, 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., Pirolo, 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.
- Stevens, C., and La Thangue, N.B. (2004). The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* 3, 1071-1079.
- 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., Mokyry, 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.
- 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., Capanec, 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.
- 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.

Tan, T., and Chu, G. (2002). p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. *Mol Cell Biol* 22, 3247-3254.

Tanaka, 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.

Tews, D.S. (1999). Cell death and oxidative stress in gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25, 272-284.

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.

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.

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., 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.
- Van Waes, C., Yu, M., Nottingham, L., and Karin, M. (2007). Inhibitor-kappaB kinase in tumor promotion and suppression during progression of squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 4956-4959.
- 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.
- 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, J.M., Kumar, S., Pye, D., Haboubi, N., and al-Nakib, L. (1994). Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 86, 386-388.
- 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.
- 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.

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.

Xie, Z. (2003). Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 986, 497-503.

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.

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., Chakraborty, 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, S.Y., Liu, S.C., Al-Saleem, L.F., Holloran, D., Babb, J., Guo, X., and Klein-Szanto, A.J. (2000). E2F-1: a proliferative marker of breast neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9, 395-401.

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.

CHAPITRE 6

ANNEX

Identification of DDB2 Protein as a Transcriptional Regulator of Constitutive *SOD2* Gene Expression in Human Breast Cancer Cells*

Received for publication, October 27, 2008, and in revised form, March 10, 2009. Published, JBC Papers in Press, April 1, 2009, DOI 10.1074/jbc.M808208200

Vanessa Minig^{†1}, Zilal Kattan[‡], Josef van Beeumen[§], Emilie Brunner[‡], and Philippe Becuwe^{†2}

From the [†]Cancer Research Unit (EA SIGRETO), Henri Poincaré University-Nancy I, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France and the [§]Laboratory for Protein Biochemistry and Protein Engineering, Ghent University, 9000 Gent, Belgium

Manganese superoxide dismutase 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 DDB2 (damaged DNA binding 2), 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-2 α 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)³ is a mitochondrial enzyme involved in the dismutation of the superoxide radical (O₂⁻) into hydrogen peroxide (H₂O₂) and molecular oxygen (O₂). H₂O₂ then is converted to water by either catalase, glutathione peroxidase, or peroxiredoxins (1). Also, MnSOD works in concert with these H₂O₂-detoxifying enzymes to protect cells from the damage associated with exposure to reactive oxygen species (ROS) and from inflammatory cytokines and ioniz-

ing 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- κ B, CCAT/enhancer-binding protein, 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 for the basal transcription of the *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 of 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 H₂O₂-detoxifying enzymes, in tumor cells as compared with 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 up-regulated 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 up-regulation 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 H₂O₂-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 the *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

* This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (Comités Meuse and Meurthe et Moselle) and Henri Poincaré's Nancy University.

¹ Recipient of a fellowship from the Ligue contre le Cancer (Comité Meurthe et Moselle).

² To whom correspondence should be addressed: B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Fax: 33-3-83-68-42-19; E-mail: becuwe@scbiol.uhp-nancy.fr.

³ The abbreviations used are: MnSOD, manganese superoxide dismutase; ROS, reactive oxygen species; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; ChIP, chromatin immunoprecipitation; Pol, polymerase; RT, reverse transcription; WT, wild type; siRNA, small interfering RNA.

study the identification and characterization of a new regulatory sequence in the proximal promoter of the *SOD2* gene, which is bound by a protein identified as DDB2 (damaged DNA binding 2). 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 the *SOD2* gene when it is bound on the proximal promoter and may exert control over 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% CO₂, 95% air. Cells were seeded at 1 × 10⁴ 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 mixture at 4 °C for 20 min. After centrifugation at 17,000 × 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 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 O₁–O₅ were annealed, and the protruding single-stranded regions were filled in with [α -³²P]dCTP using the Klenow fragment of DNA polymerase I (Euromedex). The sequence of each oligonucleotide is shown in Fig. 1A. The binding reaction mixture (10 μl) for EMSA, containing 1 ng of DNA probe, 1 μg of poly(dI-dC), and 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 MgCl₂, was incubated for 30 min at 0 °C. The DNA-protein complexes were resolved in native 5% polyacrylamide gels in 0.5× 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 10–100-fold molar excess of unlabeled specific double-stranded oligonucleotide O₄ or non-specific double-stranded probe containing the transcription factor NF-κB consensus site (5'-AGTTGAGGGGACTTTC-CCAGGC-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 O₄ (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 (catalogue number sc25367; Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)), DDB2 (catalogue number sc25368; Santa Cruz Biotechnology), or Sp1 proteins (catalogue number sc59X; Santa Cruz Biotechnology), respectively. The antibodies were incubated for 15 min at 0 °C with nuclear proteins prior to the addition of the specific labeled probe.

Purification—Proteins binding to O₄ oligonucleotide were purified from MCF-7 nuclear extract by DNA affinity chromatography. Briefly, 10 μg of biotinylated double-stranded O₄ oligonucleotide (Eurogentec) were incubated with 400 μl of 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 phenylmethylsulfonyl fluoride, 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 h. 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 phenylmethylsulfonyl fluoride, 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 phenylmethylsulfonyl fluoride, 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 a 10% SDS-polyacrylamide gel according to Laemmli (21), followed by protein silver staining (22). After preparative SDS-PAGE and Coomassie Blue (G250) staining, the band corresponding to the purified protein was excised from the gel and digested with trypsin. The peptide mixture was analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.

Southwestern Blot Analysis and UV Cross-linking—Oligonucleotide corresponding to O₄ was labeled as described above with [α -³²P]dCTP using Klenow fragment of DNA polymerase I (Euromedex). For Southwestern blot 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 dithiothreitol 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 dithiothreitol, 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 dithiothreitol, 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 poly(dI-

TABLE 1
Primers for RT-PCR and ChIP analysis

Gene or promoter	Forward primer	Reverse primer	Size
<i>bp</i>			
Genes			
<i>SOD2</i>	5'-CGACCTGCCCTACGACTAC-3'	5'-TGACCACCACCATTGAACTTC-3'	198
<i>DDB1</i>	5'-ACCTCAAGGAAGTGAACACTACATGTG-3'	5'-CTCATGAGGAGCAGTCTGCTGGAGA-3'	300
<i>DDB2</i>	5'-ACCAGTTTTACGCCTCCTCAATGG-3'	5'-TTTCCCTCTAACCTGGCGCAGGTC-3'	300
β -Actin	5'-GGCTCCGGCATGTGCAAGG-3'	5'-AGATTTTCTCCATGTCTGCTCC-3'	220
<i>MDR1</i>	5'-AAGCTTAGTACCAAAGAGGCTCTG-3'	5'-GGCTAGAAACAATAGTGAAACAA-3'	240
<i>SOD2</i> promoter for ChIP			
DDB2 region	5'-ACTCAAGTACGGCAGACAGGCAG-3'	5'-TTAAGAAAGCGCGGGGAGCAG-3'	232
Pol II region	5'-CTGCTCCCCGCGCTTTCTTAA-3'	5'-GCTGCTAGTGTGGTGCTACCCTGA-3'	199

dC), and about 60,000 cpm of ^{32}P -labeled oligonucleotide O_4 for 2 h at 4 °C. After four washings of 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 Laemml sample buffer and boiling for 5 min, proteins cross-linked with the probe were analyzed by electrophoresis on a 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 of polyclonal antibodies specific to Sp1, AP-2 α , and DDB2 (sc59X, sc8975X, and sc25368, respectively; Santa Cruz Biotechnology), 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 of PCR buffer, 15 μl of immunoprecipitated or 5 μl of not immunoprecipitated (input) chromatin, 0.5 μM specific forward and reverse primers, 0.25 mM each dNTP, 2.5 units of 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 at 94 °C for 45 s, annealing at 59 °C for 45 s, elongation at 72 °C for 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 the Gel Doc 2000 system (Bio-Rad). PCR positive control used glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 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 units of SuperScript II reverse transcriptase. Primer sequences (Invitrogen) and the expected product sizes of *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 Laemml (21) and transferred onto a polyvinylidene difluoride 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-2 α (catalogue number A0844; Sigma) 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 $\Delta 2995\text{pGL3}$. As a negative control, a deletion of a large

DDB2 Regulates Basal SOD2 Expression in Breast Cancer Cells

sequence (about 200 bp), including the O₄ 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 O₄ sequence by digestion with the restriction enzymes NheI/PasI (Fig. 1A). The O₄ sequence was replaced by the corresponding sequence Mut3O₄ (Fig. 2A) and encompassed by NheI and PasI sites to generate Δ2995MutO₄pGL3.

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 h 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 Applied Science), 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 ± S.D. from at least three independent experiments, each being performed in triplicate.

Cell Growth and Colony Formation—Cells (1 × 10⁴) 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 ± S.D. from at least three independent experiments, each being performed in triplicate. To allow colony formation, cells (5 × 10²) 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) × 100%.

Statistical Analysis—Evaluation of statistical significance was assessed using analyses of variance and the Fisher protected least significant difference test. Statistical significance was indicated as *p* < 0.05.

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, EMSAs were performed with several oligonucleotides corresponding to the region -420 to -190 bp of the proximal promoter of the SOD2 gene, which is located between most Sp1 and AP-2 transcription factor binding sites (Fig. 1A). Fig. 1B shows only the results for a set of five oligonucleotides named O₁, O₂, O₃, O₄, and O₅. Among these,

only the O₄ 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 O₄ or NF-κB probes for competition. DNA binding of this protein complex was completely suppressed by the addition of different amounts of the unlabeled O₄ probe (Fig. 1C), whereas it was unchanged by the 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 O₄ oligonucleotides (Fig. 2A). First, all oligonucleotides were tested for binding activity with the unknown complex. Second, these mutant oligonucleotides were used as competitors for the labeled O₄ 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 O₄ 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 the O₄ probe. Taken together, these results suggest AGCCTGCAGCCT as a new specific DNA sequence that interacts with a protein complex that it 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 O₄ 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 O₄ oligonucleotide (Fig. 3B). The presence of the 43-kDa purified protein was confirmed also by Southwestern blot analysis and by UV cross-linking, showing only one O₄ oligonucleotide-cross-linked protein at 43 kDa (Fig. 3, C and D). 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 O₄ 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 O₄ 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 with parental cells (WT) as well as stably transfected cells with scrambled siRNA duplex sequence (control siRNA) as

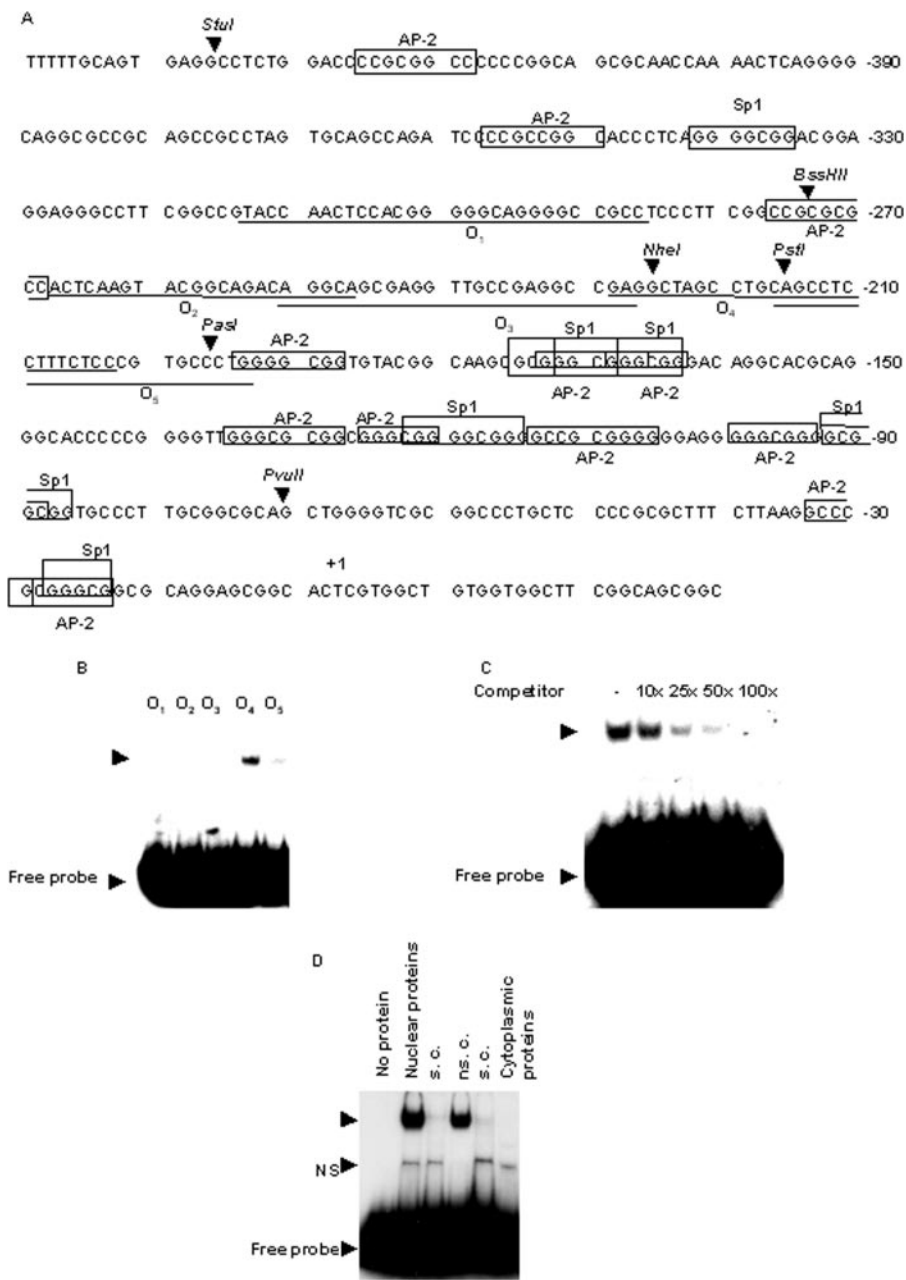


FIGURE 1. Identification of a new DNA-binding protein activity in the proximal promoter of the SOD2 gene in nuclear extract from MCF-7 cells. *A*, DNA sequence of the human proximal promoter of the SOD2 gene and the localization of Sp1, AP-2-binding sites, and oligonucleotides used for protein trapping. 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 (O₁–O₅) used as probes for protein trapping. The Sp1 and AP-2-binding sites are boxed. *B*, The ³²P-labeled oligonucleotides from O₁ to O₅ were challenged in EMSA experiments with the nuclear proteins (5 μg) from MCF-7 cells, as described under “Experimental Procedures.” *C*, EMSA experiments were done with 5 μg of nuclear proteins from MCF-7 cells. Competition was carried out with specific and unlabeled oligonucleotide O₄ at a 10–100-fold molar excess to demonstrate the specificity of the DNA-binding protein activity on oligonucleotide O₄. 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 O₄ (s.c.) or with the nonspecific oligonucleotide corresponding to the NF-κB consensus site (ns.c.). In all EMSA experiments, specific DNA-binding protein, nonspecific complex (NS), and free probe are indicated by the arrows.

controls (Fig. 4, C and D). To determine if the DDB2 protein was able to bind to the proximal promoter of the SOD2 gene *in vivo*, we performed a 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

232-bp 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 last confirmed when COS-7 and MCF-7 cells were stably transfected with the DDB2 gene or with an empty vector as a negative control (Fig. 5, A and C). Nuclear extracts from transfected COS-7 cells showed a strong DNA binding activity on the O₄ oligonucleotide in EMSA compared with negative controls (Fig. 5B). The same results were obtained with nuclear extracts from three MCF-7 cell clones transfected with the DDB2 expression vector (Fig. 5, D and E).

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 effect 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 the 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 the SOD2 gene. The results from cells transfected with the construct Δ2995pGL3 indicated that the major transcriptional activity corresponding to the 5′-flanking region of the SOD2 gene was dependent on the proximal promoter. This was confirmed with the construct Δ425SV40, which corresponded to the 5′-flanking region of the SOD2 gene without the proximal promoter. Deletion of the 200-bp region in the proximal promoter (construct Δ200pGL3), containing the O₄ 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

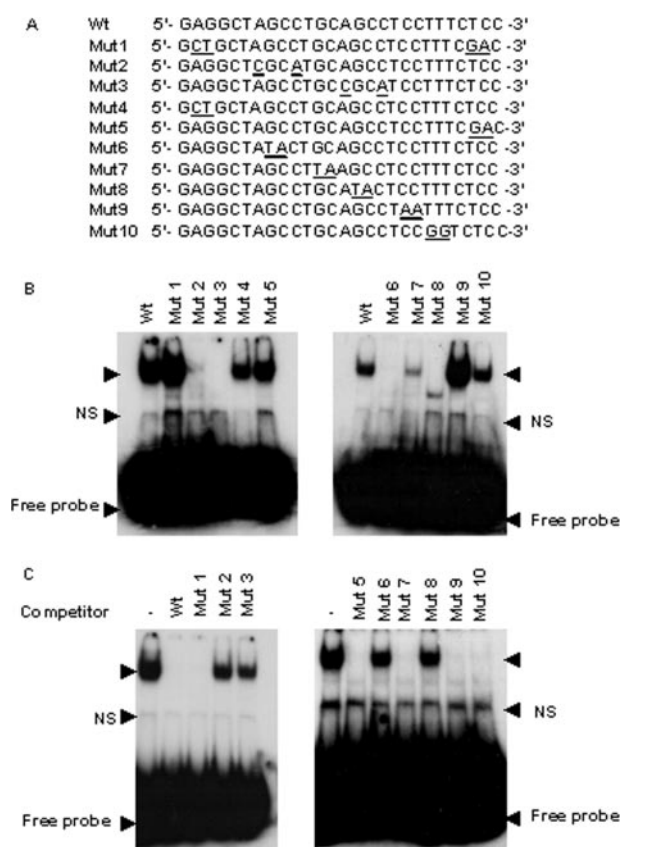


FIGURE 2. Determination of the sequence of the new cis-element bound by a specific protein complex. *A*, the complete DNA sequence of the mutant O_4 oligonucleotides (from Mut 1 to Mut 10) are presented with two nucleotide changes (*underlined*), compared with the WT O_4 oligonucleotide. *B*, the WT and each mutant O_4 oligonucleotides were ^{32}P -labeled and used for EMSA experiments with 5 μ g of 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 μ g of nuclear proteins from MCF-7 cells. Specific DNA-binding protein, nonspecific complex (NS), and free probe are indicated by the arrows.

confirm the role of DDB2 on the negative regulation of constitutive *SOD2* gene expression, site-directed mutagenesis analysis for the DDB2-binding site (O_4 sequence) was performed into the proximal promoter of the *SOD2* gene. The resulting construct ($\Delta 2995$ Mut O_4 pGL3), containing two mutated residues (sequence Mut3 O_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 significantly increased 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 with control cells (Fig. 6, D and E). 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

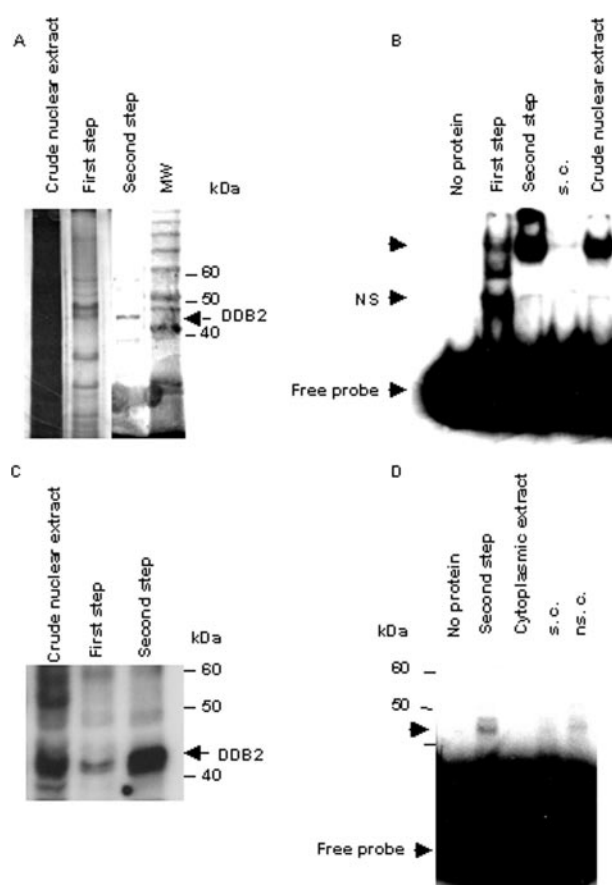


FIGURE 3. Purification of the protein interacting with the new cis-element located in the proximal promoter of the *SOD2* gene. *A* and *B*, DNA-binding protein in nuclear extracts from MCF-7 cells was purified by DNA affinity chromatography, using the biotinylated double-stranded O_4 oligonucleotide, 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 Southwestern blot with the ^{32}P -labeled O_4 oligonucleotide, and the result was compared with the crude nuclear extract (30 μ g), as described under "Experimental Procedures." *D*, the affinity-purified DNA-binding protein eluted from the second step of purification and cytoplasmic extract (30 μ g of 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-PAGE before visualization after autoradiography. Competitions were carried out with a 50-fold molar excess of unlabeled specific O_4 oligonucleotide or with the nonspecific oligonucleotide corresponding to the NF- κ B consensus site (ns.c.). Specific DNA-binding protein, nonspecific complex (NS), and free probe are indicated by the arrows.

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 (Fig. 10, A and B). Introduction of the *DDB2* gene into MDA-MB231 cells led to an increase in the DNA binding activity of DDB2 (Fig. 7, A and B) and in consequence a decrease in the mRNA level of MnSOD (Fig. 7C).

Effect 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 the *SOD2*

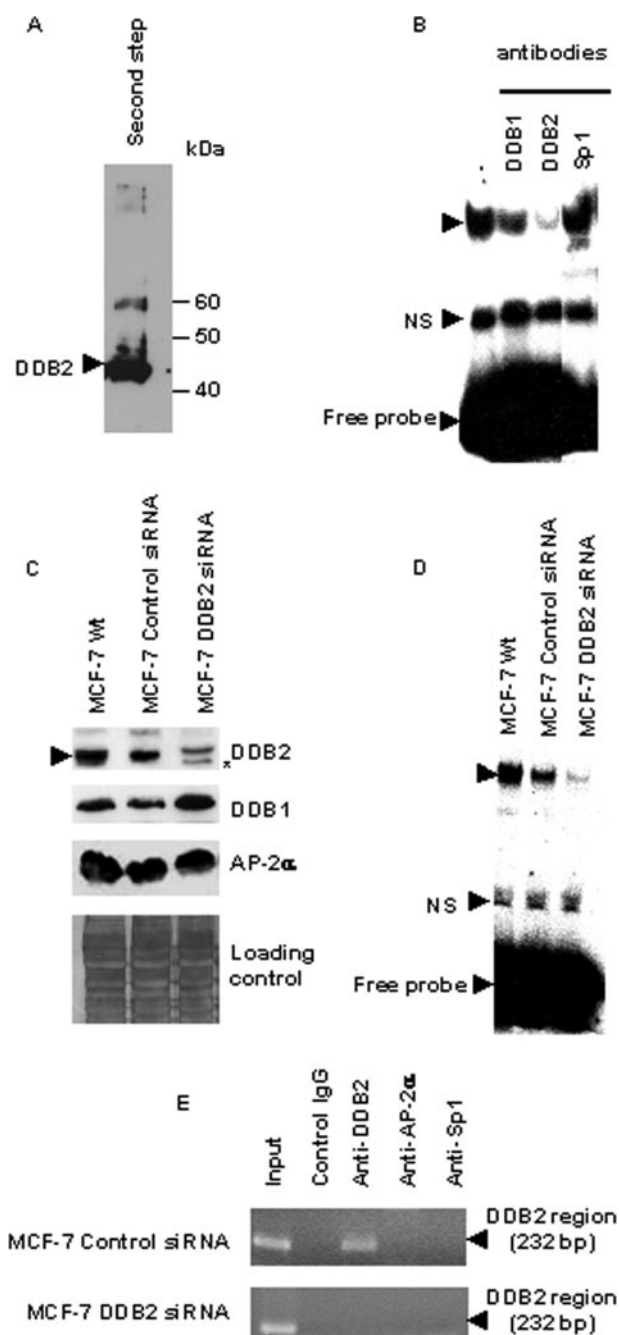


FIGURE 4. Identification of the protein interacting with the new cis-element located in the proximal promoter of the *SOD2* gene. *A*, Western blot analysis of the affinity-purified DNA-binding protein. The fraction eluted with 0.75 M KCl during the second step of purification that contained the purified protein was subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to a polyvinylidene difluoride 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 μ g of antibodies raised against either DDB1, DDB2, or Sp1 prior to the addition of the 32 P-labeled O₄ 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 μ g) and was compared with DDB1 and AP-2 α 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 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 O₄ oligonucleotide. In EMSA and supershift, specific DNA-binding protein, nonspecific complex (NS), and

gene could be attributed to interference with the transcriptional machinery. Also using ChIP assays, we compared the histone modifications and the recruitment of RNA Pol II, Sp1, and AP-2 α with the *SOD2* proximal promoter containing the GC-rich region with Sp1- and AP-2 α -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 chromatin 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, regardless of which breast cancer cells were used. 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-2 α 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 program of the *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 down-regulate the increased expression of MnSOD in DDB2-siRNA-transfected MCF-7 cells. These latter cells 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 with 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 1×10^4 cells/well, and then cells were counted every 2 days over an 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, down-regulation 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 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

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 under "Experimental Procedures." Chromatin was immunoprecipitated or not by DDB2, Sp1, or AP-2 α antibodies or control IgG. The immunoprecipitated chromatin was analyzed by PCR using primers encompassing the DDB2 binding site (DDB2 region) and defined in Table 1. Input chromatin represents a portion of the enzymatically sheared chromatin before immunoprecipitation.

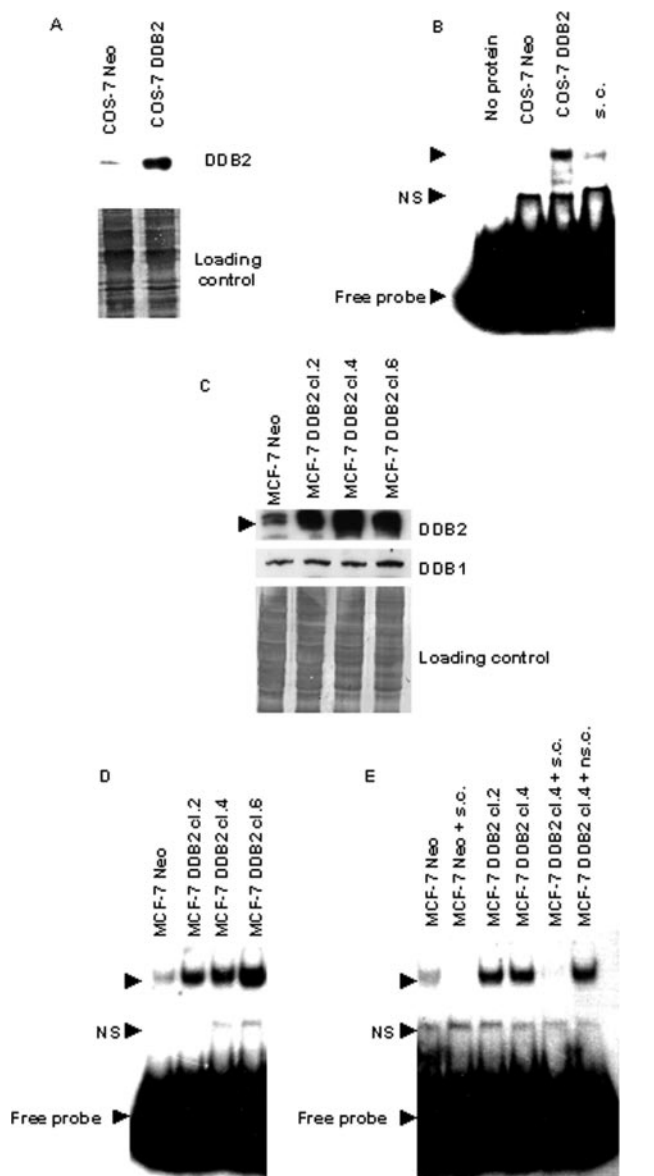


FIGURE 5. DNA binding activity of DDB2 by EMSA in DDB2-transfected COS-7 and MCF-7 cells. A, COS-7 cells were transfected stably with the vector driving the expression of human DDB2 (COS-7 DDB2) or with the empty vector only (COS-7 Neo). Overexpression of DDB2 was verified in total protein (50 μ g) by 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 analyzed in nuclear proteins (5 μ g) from COS-7 cells transfected stably with DDB2 expression vector or empty vector by EMSA with the 32 P-labeled O₄ oligonucleotide. Competitions were carried out with a 50-fold molar excess of unlabeled specific O₄ 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 μ g) 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 analyzed in nuclear proteins (2 μ g) from MCF-7 Neo and MCF-7 DDB2 (cl.2, cl.4, and cl.6) cells by EMSA with the 32 P-labeled O₄ 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 O₄ oligonucleotide or with the nonspecific oligonucleotide corresponding to the NF- κ B consensus site (ns.c.). Specific DNA-binding protein, nonspecific complex (NS), and free probe are indicated by the arrows.

and control siRNA MCF-7 cells. Finally, we compared the DDB2 and MnSOD expressions (Fig. 10, A and B) with breast cancer cell growth for 4 days (Fig. 10C). For all cell lines used,

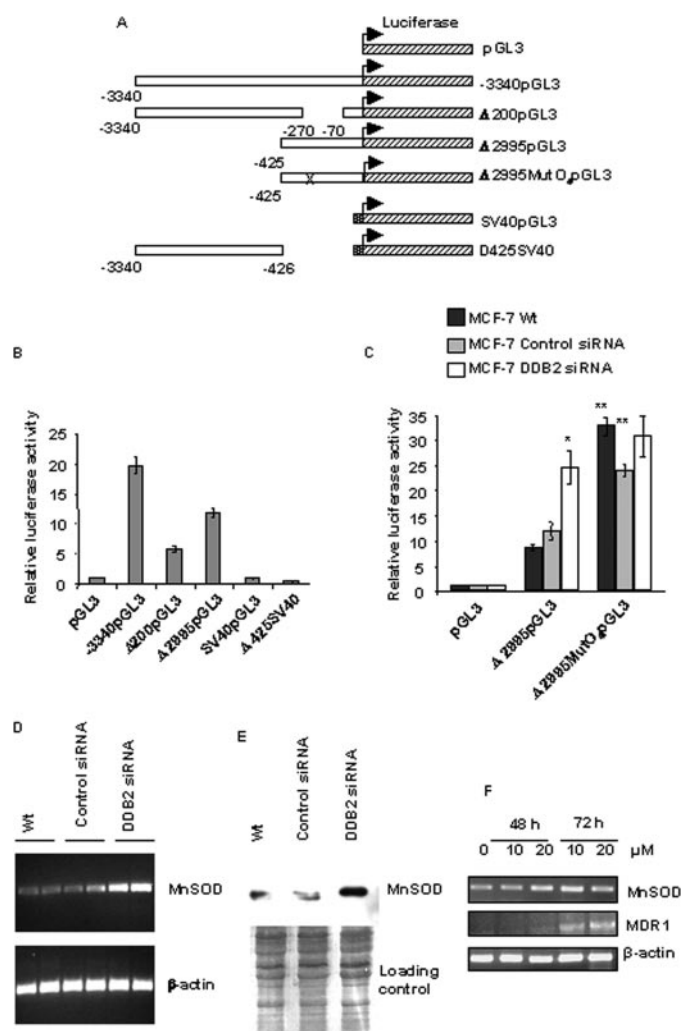


FIGURE 6. Effect of DDB2 knockdown on constitutive transcription of the SOD2 gene in MCF-7 cells. A, schematic representation of the different deletion series in the promoter region of the SOD2 gene relative to the full construct -3340pGL3 upstream of the luciferase reporter gene. B, wild type MCF-7 cells were transfected transiently with the luciferase reporter gene under the control of the different deletion series in the promoter region of the SOD2 gene. After 24 h 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 the luciferase reporter gene under the control of the proximal promoter (Δ 2995pGL3) of the SOD2 gene, in which the cis-element recognized by DDB2 (AGCCTGCAGCCT) was mutated to AGCCTGCCGCAT (Δ 2995MutO₄pGL3), and relative luciferase activities were measured. 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 Δ 2995MutO₄pGL3 versus cells transfected with (Δ 2995pGL3 (**, $p < 0.05$). D and E, MnSOD mRNA and protein levels were analyzed in total RNA and protein isolated from WT, control siRNA and DDB2 siRNA-transfected 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 μ M 5-azacytidine. Analysis of the MDR1 mRNA level was used as a positive control of the treatment with 5-azacytidine.

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.

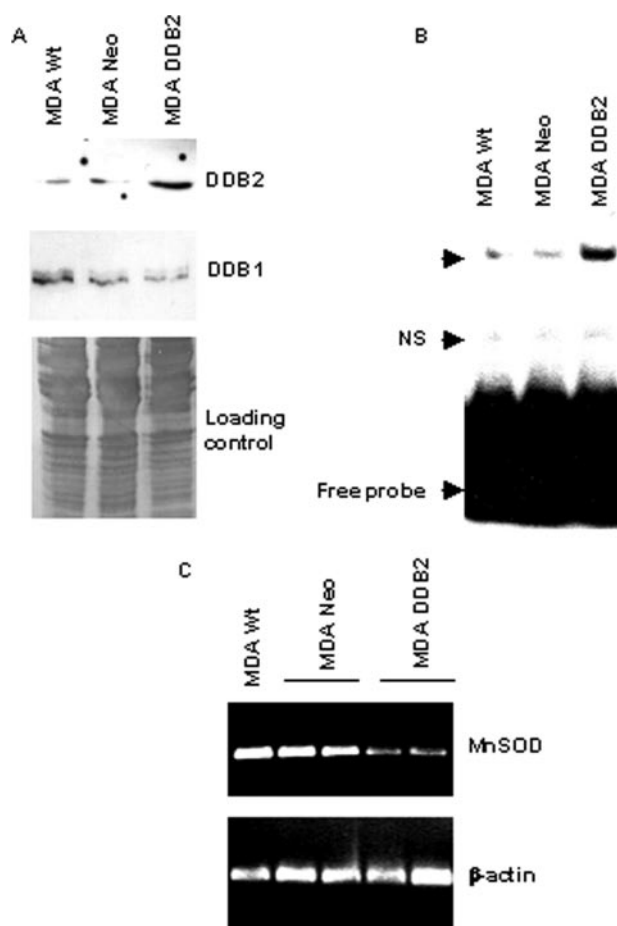


FIGURE 7. Effect of DDB2 overexpression on constitutive transcription of the *SOD2* gene in MDA-MB231 cells. A, MDA-MB231 cells were transfected stably with the vector driving the expression of the human DDB2 (*MDA DDB2*) or with the empty vector only (*MDA Neo*). Overexpression of DDB2 was verified in total protein (50 μ g) 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 μ g) 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 by RT-PCR analysis.

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 effects 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 that could explain the distinct constitutive expression of the *SOD2* gene between nonmalignant and malignant breast cancer cells.

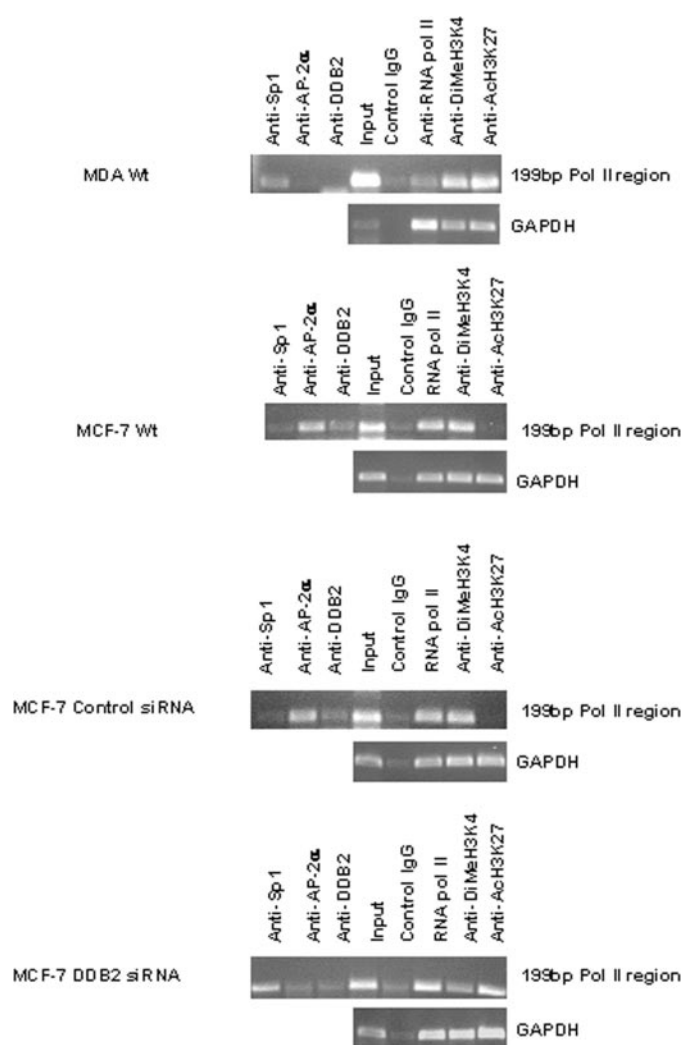


FIGURE 8. Effect of DDB2 binding on the modifications of histone and recruitment of Sp1 and AP-2 α at the *SOD2* proximal promoter. Methylation of H3K4 and acetylation of H3K27 histones and recruitment of Sp1 and AP-2 α in the GC-rich region of the *SOD2* proximal promoter (Pol II region) located downstream of the DDB2 DNA binding were analyzed *in vivo* by a ChIP assay in MCF-7 (controls and DDB2 siRNA) and MDA-MB231 cells, as described under "Experimental Procedures." Chromatin was immunoprecipitated by DDB2, Sp1, AP-2 α , RNA Pol II, dimeH3K4, and 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 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter (*GAPDH*) as positive control. Input chromatin represents a portion of the enzymatically sheared chromatin before immunoprecipitation.

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-element, containing a repeated pentanucleotide that is separated by two hinge nucleotides, is located upstream of the GC-rich region and at -230 bp from the transcription start site. Experimental evidence indicates that both repeated pentanucleotide are important for the DNA binding activity of DDB2. However, mutations into the second AGCCT repeat led to a distinct and smaller shift, where no

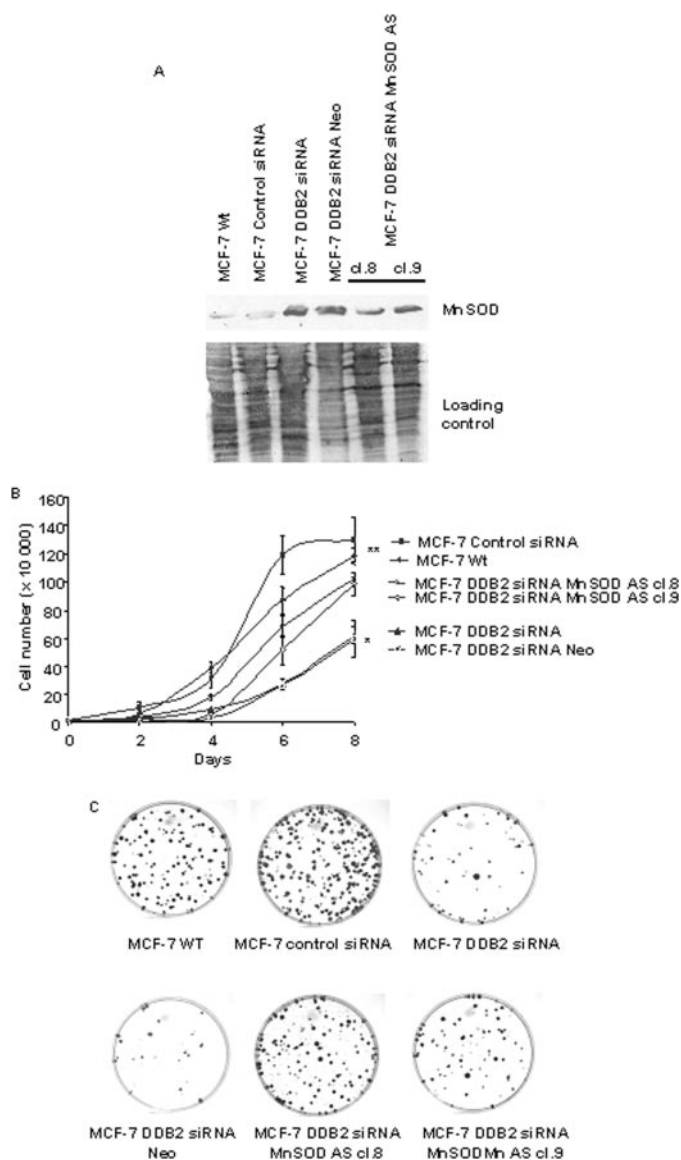


FIGURE 9. Biological significance of the regulation of constitutive SOD2 gene expression by DDB2 in MCF-7 cells. A, DDB2 siRNA-transfected MCF-7 cells were transfected stably with the pcDNA vector containing MnSOD antisense cDNA (MCF-7 DDB2 siRNA MnSOD AS) or empty vector (MCF-7 DDB2 siRNA Neo). Two 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 μ g) 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 (1×10^4 cells/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 percentage of colony formation = (colonies formed/cells seeded) \times 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 (* 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.

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 bind-

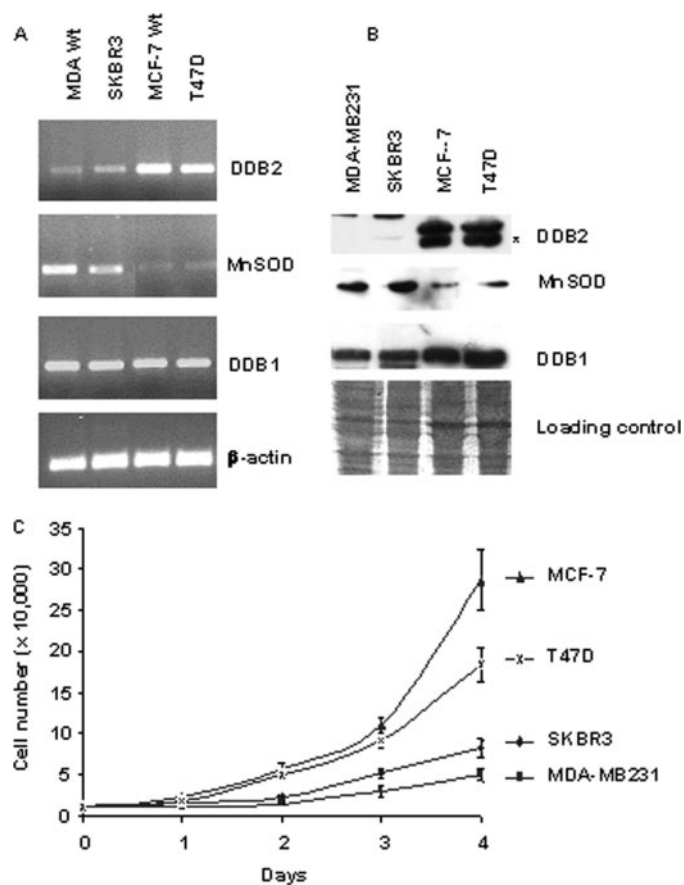


FIGURE 10. Comparison of DDB2 and MnSOD expressions with growth of breast cancer cell lines. A and B, DDB2 and MnSOD mRNA and protein levels were analyzed in total RNA and protein isolated from the breast cancer cell lines (MDA-MB231, SKBR3, MCF-7, and T47D), by RT-PCR and Western blot (*, position of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

ing 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 the SOD2 gene in MCF-7 cells, because mutations of the DDB2 binding site or knockdown of DDB2 expression increases transcription. These results are confirmed in DDB2-overexpressing MDA-MB231 cells, whose constitutive transcription of the 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 mechanism different 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 analyzed 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 were consistent with the decrease in the MnSOD expression (26). In the present study, we describe 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 the MnSOD level correlates with the acetylation status of H3 histones present at the *SOD2* promoter (27). In MDA-MB231 cells, which express a 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 the gene, as we observed previously for the *SOD2* gene in MDA-MB231 cells and confirmed by the present ChIP analysis (14, 28). No interference with the RNA Pol II binding was observed, regardless of which breast cancer cells were used.

A 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 analyzed by ChIP the recruitment of Sp1 and AP-2 α 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 the *SOD2* gene in DDB2 knockdown MCF-7 cells is probably dependent on 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 on the proximal promoter. Moreover, it has been demonstrated that the Sp1 binding site located in the GC-rich region of the proximal promoter, which 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-2 α , we observed *in vivo* that this transcription factor is able to bind its response element located in 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-2 α may be associated with DDB2 for the repression of the transcription of the *SOD2* gene. In previous studies, AP-2 α 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-2 α 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 damage 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 in the transcription of the *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 with 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, a consequence of DDB2 knockdown is the increase in MnSOD levels and a decrease 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 with 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 reduces 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 O₂⁻ 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. The possibility 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-2 α 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.

Acknowledgments—We are grateful to V. Besancenot for skillful technical assistance and to Prof. S. Thornton for critical reading of the manuscript.

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**, 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. Merrill, 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
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., Shiyonov, 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, V. B., Tjernberg, A., Lymar, E. S., Gamper, A. M., 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

Résumé

Récemment, notre laboratoire a démontré pour la première fois, que la protéine Damaged DNA Binding 2 (DDB2) possédait une activité régulatrice négative de l'expression basale de la superoxyde dismutase mitochondriale (SOD Mn) en se fixant sur un élément de réponse dans la région promotrice de son gène. Cette protéine était connue jusque là pour sa participation dans le système de réparation de l'ADN par excision de nucléotides.

L'objectif de ce travail a été de définir précisément l'implication de ces deux protéines dans la croissance des cellules d'adénocarcinome mammaire, en développant des modèles cellulaires dont l'expression de la SOD Mn ou de la DDB2 est modulée expérimentalement. Nos résultats montrent pour la 1^{ère} fois, que la SOD Mn est surexprimée dans les cellules tumorales mammaires insensibles aux oestrogènes (ER-) et ayant un pouvoir métastatique, et non dans les cellules épithéliales mammaires normales et les cellules ER+. L'inhibition de l'expression de la SOD Mn entraîne une stimulation de la croissance et une diminution de l'invasivité cellulaires, associées à une activité réduite de la métalloprotéinase 9. L'addition d'antioxydants, éliminant spécifiquement l'H₂O₂ issu de l'activité élevée de la SOD Mn, entraîne à la fois une inhibition de la croissance et du pouvoir invasif des cellules ER-. Ces résultats révèlent que la SOD Mn participe aux capacités invasives des cellules ER- via la production d'H₂O₂. Nous avons également montré pour la 1^{ère} fois, que la DDB2 présente une activité oncogénique dans les cellules tumorales mammaires sensibles aux oestrogènes (ER+), non seulement parce que son gène est surexprimé, mais également parce qu'elle active leur prolifération en agissant sur la phase de transition G1/S et sur la progression dans la phase S du cycle cellulaire. Contrairement à la SOD Mn, l'expression de la DDB2 n'est pas observée dans les cellules tumorales mammaires ER-. De même à partir de biopsies provenant de patientes atteintes d'un cancer du sein, nous avons montré que la DDB2 est significativement plus exprimée dans les tumeurs les moins agressives et exprimant le récepteur aux oestrogènes.

En montrant l'importance de la SOD Mn et la DDB2 dans la croissance et l'invasion des cellules tumorales mammaires, l'ensemble de ce travail révèle ainsi ces deux protéines comme des marqueurs prédictifs potentiels de la progression tumorale, et ouvre de nombreuses perspectives en cancérologie mammaire.

Mots clés : Superoxyde dismutase mitochondriale (SOD Mn) ; Damaged-DNA binding 2 (DDB2) ; cancer du sein ; espèces actives de l'oxygène (EAO) ; prolifération ; invasion tumorale ; cycle cellulaire.

Summary

Recently, our laboratory demonstrated for the first time, that Damaged DNA Binding 2 (DDB2) played a role as a negative transcriptional regulator on the mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) expression through its binding to a specific DNA sequence located into the promoter of MnSOD gene. DDB2 was known as a protein which participates in the nucleotide excision repair of DNA.

The goal of this study was to define precisely the involvement of the both proteins in the growth of mammary adenocarcinoma cells, using experimental procedures to modulate their expression in the breast cancer cell lines. Our results show for the first time that MnSOD is overexpressed in the estrogen receptor (ER) negative and metastatic breast tumor cells, but not in normal epithelial mammary cells and ER-positive tumor cells. Inhibition of MnSOD expression stimulates proliferation but decreases the invasive ability and the metalloproteinase 9 activity of tumor cells. Elimination of H₂O₂ from the elevated MnSOD activity by addition of specific antioxidants decreases proliferation as well as invasive ability of tumor cells, suggesting that the role of MnSOD in the invasive ability of tumor cells is mediated by H₂O₂. We have shown too for the first time that DDB2 has an oncogenic activity in the ER-positive breast tumor cells, because its gene is overexpressed and stimulates the proliferation by activating the entry of cells in the G1/S transition phase and the S phase progression. In contrast to MnSOD, DDB2 expression is not observed in ER-negative breast tumor cells, but is higher in ER-positive than in ER-negative tumor samples from patients with breast carcinoma.

Taken together, our findings demonstrate that both MnSOD and DDB2 play a role in the growth and invasiveness of tumor cells and may become a promising candidate as a predictive markers in breast cancer. More studies will be need to define molecular mechanism controlling this activity of these both proteins.

Key words : mitochondrial superoxide dismutase (MnSOD) ; Damaged-DNA binding 2 (DDB2) ; breast cancer ; reactive oxygen species ; proliferation ; tumor invasion ; cell cycle.