



HAL
open science

Epissage alternatif des phosphatases CDC25 dans le cancer du sein : expression des différents variants dans des modèles cellulaires et tissulaires de cancer mammaire et régulation en conditions de stress génotoxique

Hélène Albert

► To cite this version:

Hélène Albert. Epissage alternatif des phosphatases CDC25 dans le cancer du sein : expression des différents variants dans des modèles cellulaires et tissulaires de cancer mammaire et régulation en conditions de stress génotoxique. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2011. Français. NNT : 2011METZ025S . tel-01749060

HAL Id: tel-01749060

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749060>

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 PAUL VERLAINE – METZ
UFR SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUÉES

ÉCOLE DOCTORALE « BIOLOGIE, SANTÉ, ENVIRONNEMENT »

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PAUL VERLAINE – METZ

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par

Hélène ALBERT

Le 26 octobre 2011

ÉPISSAGE ALTERNATIF DES PHOSPHATASES CDC25

DANS LE CANCER DU SEIN :

**Expression des différents variants dans des modèles
cellulaires et tissulaires de cancer mammaire
et régulation en conditions de stress génotoxique**

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs

Professeur Bernard DUCOMMUN, Université Paul Sabatier, Toulouse

Professeur Mathias MONTENARH, Université de la Sarre, Hombourg, Allemagne

Examineurs

Professeur Denyse BAGREL, Université Paul Verlaine, Metz (Directrice de thèse)

Docteur Eric BATTAGLIA, Université Paul Verlaine, Metz (Co-directeur de thèse)

Membre invité

Professeur Carolino MONTEIRO, Université de Lisbonne, Portugal

Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique (LIMBP)
Université Paul Verlaine - Metz, EA3940, Directeur Pr G. Kirsch
UFR SciFA, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 METZ

Ce travail de doctorat

a été réalisé

au **Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique**



dans l'équipe de Biochimie Pharmacologique

UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

Université Paul Verlaine - Metz



sous la direction du **Pr Denyse BAGREL** et l'encadrement du **Dr Eric BATTAGLIA**

a fait l'objet

d'une collaboration qui a nécessité un séjour de 5 semaines

au **Laboratoire de Génétique Humaine** de la Faculté de Pharmacie

et à l'**Ecole Supérieure de Technologie de la Santé**

Université de Lisbonne – Portugal

sous l'encadrement du **Pr Carolino MONTEIRO** et du **Pr Miguel BRITO**

Cette étude a été subventionnée

par la **Ligue contre le Cancer** (comité 57)

et le **Conseil Régional de Lorraine**

J'ai également bénéficié à titre personnel

d'une **allocation de recherche** attribuée par

le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

REMERCIEMENTS

À Madame le Professeur Denyse Bagrel, pour m'avoir accueillie dans son équipe, pour m'avoir guidée dès mes stages pré-doctoraux et pour m'avoir encouragée à me lancer dans cette aventure. Je souhaite lui témoigner toute ma gratitude pour son soutien, sa rigueur scientifique et sa grande bienveillance à mon égard. Je garderai de vous le souvenir d'une femme courageuse et humaine.

Un grand merci au Docteur Eric Battaglia pour ses grandes qualités scientifiques et surtout humaines. Je te suis très reconnaissante d'avoir su me remonter le moral dans les moments de doutes par ton humour, ta confiance en moi, ton optimisme et tes intarissables nouvelles idées.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Messieurs les Professeurs Bernard Ducommun et Mathias Montenarh d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Leur expertise dans le domaine du cycle cellulaire ainsi que leur jugement apporteront une contribution précieuse à ce travail.

À Monsieur le Professeur Carolino Monteiro grâce à qui nous avons pu acquérir les échantillons tissulaires indispensables à notre étude et pour ses nombreux conseils. Je tiens également à le remercier pour son accueil chaleureux lors de mon séjour dans son laboratoire à Lisbonne, ainsi que toute son équipe en particulier Susana Santos pour son aide précieuse en bioinformatique, ses conseils pratiques et sa gentillesse.

Merci également à Monsieur le Professeur Miguel Brito pour m'avoir accueillie dans son laboratoire afin de m'initier à la pratique de la PCR en temps réel et pour nos discussions enrichissantes. Je garderai un très bon souvenir de ce séjour grâce à son amabilité et à celle des membres de son équipe.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Marc Diederich, directeur du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer à Luxembourg, pour m'avoir permis d'utiliser leur matériel de PCR en temps réel. Merci également à Sébastien Châteaueux pour ses conseils pratiques et à toute l'équipe du LBMCC pour leur sympathie à mon égard.

Je remercie aussi Madame le Professeur Pascale Bauda, directrice du Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, de nous avoir permis d'avoir accès à leur équipement de PCR en temps réel. Merci également à Yann pour sa sympathie.

À Monsieur le Professeur Armand Maul, biostatisticien à l'Université Paul Verlaine-Metz, pour sa disponibilité et son aide précieuse dans le choix des tests statistiques les plus adaptés à notre étude clinique.

À nos collègues de l'équipe d'Ingénierie Moléculaire pour leur convivialité et leur approvisionnement en éthanol, en azote liquide et en divers produits chimiques.

À tous mes collègues de l'équipe de Biochimie Pharmacologique passés et présents : doctorants, stagiaires, techniciennes, maîtres de conférence, qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'agréable ambiance qui a régné au cours de ces années passées au laboratoire.

À Hervé pour nos nombreuses discussions et pour sa capacité sans égale à détendre l'atmosphère. À Aline pour sa gentillesse et ses nombreux conseils d'ainée pour l'après-thèse. À Emilie pour son expertise en informatique qui m'a bien souvent sortie de la panade. À Stéphanie pour son implication dans l'organisation du labo et les commandes. À Tzvetet et Sophie pour leur gaieté communicative. Enfin, une pensée particulière pour mes deux camarades de galère du premier jour Adeline et Elodie qui m'ont accompagnée à chaque étape de ma thèse et qui ont en particulier été d'un grand soutien pendant les moments difficiles.

Toute ma reconnaissance va à mes parents pour m'avoir permis d'en arriver là et pour m'avoir toujours soutenue même s'ils n'ont pas toujours très bien compris de quoi il retournait. À mes sœurs, à mon frère, à ma famille.

Je n'oublie pas non plus de remercier tous mes amis que j'ai, accaparée par mon travail, trop souvent délaissés. Un grand merci à Manue simplement pour avoir toujours été à mes côtés.

Et pour terminer, toutes mes pensées et mon affection vont à mon conjoint Nicolas pour sa présence rassurante et surtout pour son immense patience devant les heures, les jours, les semaines... passées collée à mon ordinateur.

Merci à tous ceux que je n'ai pas nommés, mais qui m'ont aidée par un sourire, un mot, une attention et souvent plus encore et ont ainsi contribué à la réussite de ce travail.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications :

Albert H., Battaglia E., Monteiro C., Bagrel D (2011).
Genotoxic stress modulates CDC25C phosphatase alternative splicing in human breast cancer cell lines.
Biol. Cell, soumis

Albert H., Santos S., Battaglia E., Brito M., Monteiro C., Bagrel D (2011).
Differential expression of CDC25 phosphatases splice variants in human breast cancer cells.
Clin. Chem. Lab. Med. **49**(10), DOI 10.1515.CCLM.2011.635

Communication orale :

Albert H., Battaglia E., Monteiro C., Bagrel D.
Contrôle de l'épissage des CDC25 par des inhibiteurs de topoisomérase dans des lignées cellulaires de cancer du sein.
4^e Forum du Cancéropôle Grand-Est, Strasbourg, France, 28-29 octobre 2010.

Communications affichées :

Albert H., Battaglia E., Bagrel D.
Genotoxic stress modulates CDC25 phosphatase alternative splicing in human breast cancer cell lines.
5^e Forum du Cancéropôle Grand-Est, Strasbourg, France, 2-3 novembre 2011.

Albert H., Battaglia E., Bagrel D.
Control of CDC25 phosphatases splicing by genotoxic agents in MCF-7 breast cancer cell line.
Cell Signal-omics, Integrated cellular pathology – Systems biology of human disease, Luxembourg, Luxembourg, 26-28 janvier 2011.

Albert H., Santos S., Brito M., Battaglia E., Alves M., Monteiro C., Bagrel D.
Expression of CDC25 splicing variants in breast cancer cells.
5th Santorini Conference, Functional Genomics Towards Personalized Health Care, Santorini, Grèce, 30 septembre au 2 octobre 2010.
Prix du meilleur poster.

Albert H., Battaglia E., Bernardi D., Chenot E., Kirsch G., Bagrel D.
Triphényl S-glutathion : Evaluation *in vitro* et effet sur des cellules cancéreuses mammaires d'un puissant inhibiteur de la glutathion S-transférase π humaine.
2^e Forum du Cancéropôle Grand-Est, Vittel, France, 17 octobre 2008.

RÉSUMÉ

Les phosphatases CDC25 jouent un rôle important dans la progression du cycle cellulaire. En outre, une surexpression des CDC25 a été rapportée dans de nombreux cancers, notamment dans le cancer du sein, et est souvent corrélée à un pronostic défavorable. Les CDC25 sont constituées de trois isoformes : A, B et C codées par des gènes distincts, tous trois soumis à un mécanisme d'épissage alternatif. Quelques études ont suggéré que certains variants d'épissage de CDC25 pourraient être plus impliqués dans les cancers que d'autres, mais aucune étude de ce type n'a jusqu'à présent été menée dans le cancer du sein.

Le premier aspect de cette étude, à visée clinique, consiste donc en l'évaluation de la proportion de différents variants d'épissage de *CDC25* dans le cancer du sein, dans l'optique de développer un nouvel outil pronostique. Cette étude a été réalisée sur deux modèles. D'une part, différentes lignées cellulaires cancéreuses mammaires ont été caractérisées concernant l'expression des variants de *CDC25* grâce à la mise au point d'une méthode de RT-PCR quantitative inédite. De manière intéressante, nous avons observé une surexpression des transcrits *A2* et *B2* et une augmentation du rapport *C5/C1* dans les cellules résistantes aux traitements anticancéreux, laissant supposer un lien entre l'expression de ces variants et le phénotype de résistance. D'autre part, cette étude a été étendue à la détermination de l'expression des variants de *CDC25* dans des tissus mammaires tumoraux par comparaison à celle des tissus péri-tumoraux appariés. Les résultats de PCR quantitative obtenus pour les 75 paires de tissus testées ont mis en évidence une surexpression de *CDC25A* dans 64% des tumeurs, principalement due au variant *A1* (69%) ; de *CDC25B* dans 55% des tumeurs, en partie liée à l'expression des variants *B1* et *B2* (47% et 21% respectivement) ; et de *CDC25C* dans 75% des tumeurs, le variant *C5* étant clairement plus impliqué que *C1* (surexpression dans 86% et 43% des tumeurs respectivement). Nous avons finalement pu établir des corrélations entre l'expression des transcrits *CDC25* et certaines caractéristiques anatomopathologiques des tumeurs, telles que le grade de la tumeur et un faible statut des récepteurs aux œstrogènes pour *CDC25A* et *CDC25B* et la taille de la tumeur pour *CDC25C*.

Le second volet de ce projet consiste en une étude plus mécanistique portant sur la régulation de l'épissage des CDC25 en conditions de dommages à l'ADN. Le traitement de plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein par différents agents génotoxiques (doxorubicine, camptothécine, étoposide, cisplatine et *tert*-butyl hydroperoxyde) induit une modification du profil d'épissage de *CDC25C*, consistant en une forte augmentation de la proportion du variant *C5* par rapport à celle de *C1* (au niveau de l'ARNm et des protéines). Cette régulation a lieu au cours de la réponse précoce aux dommages à l'ADN, avant la mise en place de l'apoptose et est associée à un arrêt du cycle cellulaire. Nous avons par ailleurs montré que cette modulation de l'épissage de *CDC25C* est dépendante des kinases ATM/ATR et indépendante de p53. Ces résultats ont permis de mettre en lumière un mécanisme additionnel de réponse cellulaire à un stress génotoxique dans les cellules de cancer du sein.

Mots clés : cancer du sein, biomarqueurs pronostiques, phosphatases CDC25, épissage alternatif, stress génotoxique.

ABSTRACT

CDC25 phosphatases play an important role in cell cycle progression. Moreover, an overexpression of CDC25 was reported in numerous cancers, particularly in breast cancer, and is often correlated with a poor prognosis. CDC25 are represented by three isoforms: A, B and C encoded by distinct genes, all three submitted to an alternative splicing mechanism. Few studies suggested that some CDC25 splicing variants could be more involved in cancers than others, but no such study has so far been conducted in breast cancer.

The first aspect of this study, referred to clinic, consists in the evaluation of different *CDC25* splicing variants proportion in breast cancer, from the perspective of developing a new prognostic tool. This study was performed on two models. On the one hand, several mammary cancerous cell lines were characterized concerning *CDC25* variants expression thanks to the development of a novel quantitative RT-PCR method. Interestingly, we observed an overexpression of *A2* and *B2* transcripts and an increase of *C5/C1* ratio in multidrug resistant cell lines, suggesting a link between the expression of these variants and the resistance phenotype. On the other hand, this study was extended to the determination of *CDC25* variants expression in mammary tumoral tissues in comparison to that of matched peritumoral tissues. Quantitative PCR results obtained for the 75 pairs of tissues tested showed an overexpression of *CDC25A* in 64% of tumors, mainly due to *A1* variant (69%); of *CDC25B* in 55% of tumors, partially linked to *B1* and *B2* variants expression (47% and 21% respectively); and of *CDC25C* in 75% of tumors, the *C5* variant being clearly more involved than *C1* (overexpression in 86% and 43% respectively). We have finally established correlations between *CDC25* transcripts expression and some tumor characteristics, as the tumor grade and a lack of estrogens receptors for *CDC25A* and *CDC25B* and the tumor size for *CDC25C*.

The second part of this project consists in a mechanistic study regarding the regulation of *CDC25* splicing in DNA damage conditions. The treatment of several breast cancer cell lines with different genotoxic agents (doxorubicin, camptothecin, etoposide, cisplatin and *tert*-butyl hydroperoxide) induces a modification of *CDC25C* splicing profile, consisting in a large increase in *C5* variant proportion compared to that of *C1* (both at mRNA and protein levels). This regulation occurs during the early response to DNA damage, before the onset of apoptosis and is associated with a cell cycle arrest. We have also shown that this modulation of *CDC25C* splicing is dependent of ATM/ATR kinases and independent of p53. Finally, these results allowed to highlight an additional regulation pathway in the cellular response to genotoxic stress in breast cancer cells.

Key words: breast cancer, prognostic biomarkers, CDC25 phosphatases, alternative splicing, genotoxic stress.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
APAF1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor
APC/C : Anaphase Promoting Complex / Cyclosome
 α -PFT : α -pifithrine
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomique
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
ATR : ATM and Rad3 Related
BASC : BRCA1-Associated Surveillance Complex
BRCA1 : Breast Cancer 1
BRCA2 : Breast Cancer 2
CAK : CDK Activating Kinase
CaMKII : Calcium/calmoduline-dependent protein kinase II
CDC25 : Cell Division Cycle 25
CDK : Cyclin Dependent Kinase
CHK : Checkpoint Kinase
CIP/KIP : CDK Inhibiting Protein
CI₅₀ : Concentration Inhibitrice 50
CKI : CDK Inhibitor
CK1 α : Casein Kinase 1 α
CK2 : Casein Kinase 2
CPT : Camptothécine
C-TAK1 : CDC25C Associated Kinase 1
C_T : Cycle Threshold
CTC : Cellules Tumorales Circulantes
DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
DCF : 2',7'-DiChloroFluorescéine
DMSO : DiMéthylSulfOxide
DNA-PKcs : DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit
DNase : DésoxyriboNucléase
Dox : Doxorubicine
EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EIF2A : Eukaryotic translation Initiation Factor 2A
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
ESE : Exonic Splicing Enhancer
ESS : Exonic Splicing Silencer

Eto : Etoposide
FDA : Food and Drug Administration
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer
FOXM1 : Forkhead transcription factor
GAPDH : GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 beta
H₂DCFDA : 2',7'-DiChlorodihydroFluorescéine DiAcétate
HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2
hnRNP : heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein
INCa : Institut National du Cancer
INK4 : Inhibitor of CDK4
InVS : Institut national de Veille Sanitaire
IP : Iodure de Propidium
ISE : Intronic Splicing Enhancer
ISS : Intronic Splicing Silencer
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
MAD2 : Mitotic Arrest Deficient-2
MK2 : MAPK activated protein Kinase 2
MPF : Maturation Promoting Factor
MTT : Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium
NES : Nuclear Export Signal
NLS : Nuclear Localization Signal
NMD : Nonsense-Mediated mRNA Decay
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PARP : Poly (ADP-Ribose) Polymérase
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCRq : PCR Quantitative
PIKK : Phosphatidylinositol 3-Kinase related Kinases
PLK : Polo-Like Kinase
PMSF : PhénylMéthylSulphonyl Fluoride
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
RB : protéine du Rétinoblastome
RE : Récepteurs aux Œstrogènes
RNase : RiboNucléase
RP : Récepteurs à la Progestérone
RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SAPK : Stress Activated Protein Kinase
SCF : Skp1/Cullin/F-box proteins
SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SF1 : Splicing Factor 1
siRNA : Small Interfering RNA
snRNP : small nuclear RiboNucleoProtein

SR (protéine) : serine/arginine-rich protein

STK11 : Ser/Thr Kinase 11

TBST : Tris-Buffered Saline Tween-20

***t*-BOOH** : *tert*-butyl hydroperoxyde

U2AF : U2 auxiliary factor

UV : rayonnement UltraViolet

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

TABLE DES MATIÈRES

<i>Introduction</i>	1
PRÉAMBULE	2
I. LE CANCER DU SEIN	3
I.1. Épidémiologie du cancer du sein	3
I.2. Facteurs de risques	4
I.3. Biomarqueurs et thérapie personnalisée	6
I.3.1. Biomarqueurs établis et thérapie ciblée	7
I.3.2. Biomarqueurs émergents	9
I.3.3. Signatures moléculaires	9
I.3.4. Cellules tumorales circulantes et ADN tumeur-spécifiques.....	11
II. LE CYCLE CELLULAIRE	12
II.1. Eléments régulateurs du cycle cellulaire	13
II.1.1. Régulation de la transition G_0/G_1	14
II.1.2. Régulation de la progression en G_1 et de la transition G_1/S	15
II.1.3. Régulation de la phase S.....	15
II.1.4. Régulation de la progression en G_2 et de la transition G_2/M	16
II.1.5. Régulation de la mitose	17
II.2. Réponse cellulaire aux dommages à l'ADN	18
II.2.1. Arrêt du cycle à la transition G_1/S	19
<i>a. Réponse rapide liée à la dégradation de CDC25A</i>	19
<i>b. Réponse retardée dépendante de p53</i>	19
II.2.2. Arrêt du cycle à la transition G_2/M	20
<i>a. Réponse rapide liée à des modifications post-traductionnelles</i>	20
<i>b. Réponse retardée dépendante de p53</i>	22
II.2.3. Sortie des points de contrôle.....	22
<i>a. Retour dans le cycle cellulaire</i>	23
<i>b. Induction de l'apoptose</i>	23
III. LES PHOSPHATASES CDC25	24
III.1. Rôles des différentes isoformes de CDC25 dans le cycle cellulaire	25
III.2. Régulation des phosphatases CDC25	27
III.2.1. CDC25A.....	28

III.2.2. CDC25B	30
III.2.3. CDC25C	31
IV. CDC25 ET CANCER.....	33
IV.1. Surexpression des CDC25 dans les cancers humains	33
IV.2. CDC25 et cancérogenèse	37
IV.3. CDC25 : cibles thérapeutiques potentielles dans le cancer ?.....	38
V. ÉPISSAGE ALTERNATIF DES CDC25.....	39
V.1. Principes généraux de l'épissage alternatif.....	39
V.1.1. Mécanisme d'épissage des pré-ARNm	39
V.1.2. Contrôle de l'épissage alternatif.....	43
<i>a. Contrôle de l'épissage alternatif par compétition entre les facteurs d'épissage activateurs et inhibiteurs.....</i>	<i>44</i>
<i>b. Couplage entre la transcription et l'épissage alternatif.....</i>	<i>45</i>
<i>c. Régulation de l'épissage alternatif par des modifications épigénétiques.....</i>	<i>45</i>
V.2. Épissage alternatif et cancer.....	46
V.2.1. Altération de l'épissage alternatif de nombreux gènes dans les cancers.....	46
V.2.2. Valeur pronostique des variants d'épissage et nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses	48
V.3. Régulation de l'épissage alternatif en conditions de stress cellulaire.....	50
V.4. Les différents variants d'épissage des CDC25.....	52
V.4.1. CDC25A.....	52
V.4.2. CDC25B	54
V.4.3. CDC25C	58
 <i>Objectifs et Stratégie.....</i>	 <i>61</i>
I. OBJECTIFS.....	62
II. STRATÉGIE	63
II.1. Expression des variants d'épissage de CDC25 dans le cancer du sein.....	63
II.2. Régulation de l'épissage des CDC25 en conditions de stress génotoxique.....	63
 <i>Résultats et Discussion.....</i>	 <i>64</i>
 <i>1^{ère} partie : Expression des variants d'épissage de CDC25 dans le cancer du sein</i>	 <i>65</i>

I. DÉVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE ORIGINALE DE RT-PCR QUANTITATIVE POUR LA DÉTECTION DES VARIANTS DE CDC25.....	65
I.1. Avantage de la méthode de RT-PCR quantitative pour cette étude	65
I.2 Optimisation des conditions expérimentales de PCR en temps réel	67
I.2.1. Design des amorces et des sondes TaqMan®.....	67
I.2.2. Choix du gène endogène de référence	69
I.2.3. Efficacité des réactions d'amplification	69
I.2.4. Spécificité des réactions de PCR quantitative	70
II. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES VARIANTS D'ÉPISSAGE DE CDC25 DANS DIFFÉRENTES LIGNÉES DE CANCER DU SEIN.....	71
II.1. Présentation des lignées cellulaires modèles	71
II.2. Mesure de l'expression des transcrits alternatifs de CDC25 et d'autres gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.....	72
II.3. Expression des protéines CDC25	78
II.4. Niveau de phosphorylation des CDK	80
II.5. Conclusions de la caractérisation des lignées cellulaires	81
III. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES VARIANTS D'ÉPISSAGE DE CDC25 DANS DES TUMEURS PRIMAIRES DE SEIN	82
III.1. Physiopathologie du cancer du sein	82
III.1.1. Rappel d'anatomie du tissu mammaire	82
III.1.2. Le diagnostic du cancer du sein	83
III.1.3. Les différents types histologiques de carcinomes mammaires	83
III.1.4. Extension du cancer du sein.....	85
III.1.5. Notions de classification des tumeurs de sein et facteurs pronostiques.....	86
a) <i>Le système TNM</i>	86
b) <i>Le grade SBR</i>	88
c) <i>Evaluation des biomarqueurs</i>	89
d) <i>Signatures moléculaires</i>	89
III.2. Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des tumeurs mammaires étudiées	89
III.3. Mesure de l'expression des transcrits alternatifs de CDC25 dans les tumeurs de sein	91
III.4. Recherche de relations entre l'expression des différents transcrits de CDC25	93
III.5. Recherche de corrélations entre l'expression des transcrits CDC25 et les paramètres cliniques et anatomopathologiques des tumeurs.....	95
III.5.1. Variables qualitatives	96

III.5.2. Variables continues	100
III.6. Conclusions de l'étude de l'expression des transcrits <i>CDC25</i> dans les tumeurs de sein	101
<i>2^{ème} partie : Modulation de l'épissage de CDC25 en conditions de stress génotoxique</i>	<i>103</i>
I. IMPACT D'UN TRAITEMENT PAR LA DOXORUBICINE SUR L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DES CDC25	103
I.1. Propriétés de la doxorubicine	103
I.2. Modulation de l'épissage de CDC25C par la doxorubicine	105
I.3. Implication de la modulation d'épissage de CDC25C dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN	108
I.4. Recherche des voies de signalisation impliquées dans la modulation de l'épissage de CDC25C	113
II. IMPACT D'AUTRES AGENTS GÉNOTOXIQUES SUR L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE CDC25C	115
II.1. Inhibiteurs de topoisomérases	115
II.2. Autres molécules anticancéreuses	118
II.3. Molécules génératrices d'espèces réactives de l'oxygène	119
III. CONCLUSIONS DE LA 2^{ème} PARTIE	122
<i>Conclusions et Perspectives</i>	<i>125</i>
<i>Patientes, Matériel et Méthodes</i>	<i>131</i>
I. PATIENTES ET PRÉLÈVEMENTS TISSULAIRES	132
II. CULTURE CELLULAIRE	132
II.1. Lignées cellulaires	132
II.2. Conditions de culture	133
II.3. Congélation et décongélation des cellules	133
II.4. Traitement des cellules en culture	134
III. TEST DE CYTOTOXICITÉ AU MTT	134
IV. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES GÈNES	135
IV.1. RT-PCR semi-quantitative	136

IV.1.1. Extraction des ARN totaux cellulaires.....	136
IV.1.2. Rétrotranscription des ARNm.....	136
IV.1.3. Amplification des ADNc par PCR.....	137
IV.2. RT-PCR quantitative.....	139
IV.2.1. Extraction des ARN totaux cellulaires et traitement à la DNase I.....	139
IV.2.2. Extraction des ARN totaux tissulaires	139
IV.2.3. Rétrotranscription des ARNm.....	140
IV.2.4. Amplification des ADNc par PCRq.....	140
V. ANALYSE DES NIVEAUX PROTÉIQUES	142
V.1. Immunoblot.....	142
V.1.1. Préparation des lysats cellulaires.....	142
V.1.2. Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....	142
V.1.3. Electrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	142
V.1.4. Immunodétection.....	143
V.2. Immunofluorescence : détection des foyers γ-H2AX	144
VI. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE PAR CYTOMÉTRIE	145
VII. EVALUATION DU STRESS OXYDANT PAR CYTOMÉTRIE	145
VIII. ANALYSES STATISTIQUES	146
VIII.1. Étude cellulaire	146
VIII.2. Étude tissulaire	146
VIII.2.1. Test de Mann-Whitney-Wilcoxon.....	147
VIII.2.2. Test de Kruskal-Wallis.....	147
VIII.2.3. Coefficient de corrélation des rangs de Spearman	148
<i>Bibliographie</i>	<i>149</i>
<i>Annexes.....</i>	<i>169</i>
<i>Publications</i>	<i>180</i>

Introduction

PRÉAMBULE

Le cancer est considéré comme une maladie génétique liée à l'acquisition progressive de 5 à 10 mutations "conductrices" dans une seule cellule [Stratton *et al*, 2009]. Ces mutations s'accumulent au cours de la vie par l'action combinée de facteurs génétiques héréditaires et d'agents mutagènes d'origine exogène ou endogène. Le processus conduisant à la formation d'une tumeur cancéreuse, appelé cancérogenèse, est divisée en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression [Oliveira *et al*, 2007]. Lors de l'étape d'initiation, la cellule acquiert des modifications génétiques irréversibles. Au cours de la promotion, la cellule initiée va proliférer de manière incontrôlée à la suite d'altérations épigénétiques pour former des foyers pré-cancéreux. Au cours de l'étape de progression, ces cellules pré-néoplasiques vont former une tumeur, qui va finalement être dotée de propriétés invasives conduisant à la formation de métastases. De nombreuses altérations génétiques, affectant principalement des gènes suppresseurs de tumeurs ou des proto-oncogènes, sont retrouvées dans les cancers humains et peuvent conduire à la génération de plus d'une centaine de types de tumeurs différents. Au cours de son développement, la tumeur cancéreuse acquiert huit propriétés biologiques particulières, décrites par Douglas Hanahan et Robert Weinberg : une indépendance vis-à-vis des signaux prolifératifs, une insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, un échappement à la mort cellulaire, une capacité de réplication illimitée, une dérégulation de la machinerie énergétique, une résistance à la destruction par le système immunitaire, une induction de l'angiogenèse et une capacité d'invasion et de prolifération dans d'autres organes (métastases) [Hanahan et Weinberg, 2011].

Le cancer représente un véritable problème de santé publique de nos jours, à l'origine de 7,6 millions de décès en 2008, soit 13% de la mortalité mondiale. Le nombre de décès par cancer devrait poursuivre sa progression et dépasser 11 millions de personnes d'ici 2030 selon les dernières estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [www.who.int/fr/]. Parmi les types de cancer les plus meurtriers se trouvent les cancers du poumon, de l'estomac, du foie, du colon et du sein.

I. LE CANCER DU SEIN

I.1. Épidémiologie du cancer du sein

Avec plus de 1,3 million de nouveaux cas diagnostiqués chaque année dans le monde, soit 23% de l'ensemble des cancers diagnostiqués chez la femme, le cancer du sein se situe au premier rang des cancers féminins (moins de 1% des cas surviennent chez l'homme). Le cancer du sein représente également la première cause de mortalité par cancer chez la femme avec plus de 450 000 décès par an dans le monde (soit 13% des cas de mort par cancer chez la femme) [Ferlay *et al*, 2010]. L'incidence des cancers du sein est de 4 à 10 fois plus élevée dans les pays occidentaux (États-Unis et Europe du nord principalement) par rapport aux pays d'Asie et d'Afrique [Rocheffort et Rouesse, 2008].

La France, en particulier, est un pays à fort taux d'incidence du cancer du sein avec près de 53 000 nouveaux cas estimés en 2010, soit 34% de l'ensemble des nouveaux cas de cancers féminins et environ 11 000 décès (estimations HCL, InVS, INCa, Francim, Inserm, Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2010. Rapport technique. Avril 2010). Le taux d'incidence standardisé à la population mondiale a presque doublé entre 1980 et 2005 en France passant de 56,8 à 101,5 cas pour 100 000 (**Figure 1**). Toutefois, cette évolution (en moyenne de +2,4% par an entre 1980 et 2005) s'est légèrement ralenti entre 2000 et 2005 (+2,1% par an). Selon les projections de l'INCa et de l'InVS, le taux d'incidence devrait sensiblement diminuer sur la période récente en France pour atteindre 100 cas pour 100 000 femmes. Cette diminution pourrait être en partie due à la limitation massive de la prescription des traitements hormonaux substitutifs de la ménopause. Concernant le taux de mortalité, celui-ci est resté plutôt stable depuis 1980 (-0,4% en moyenne), puis a commencé à décroître sur la période 2000-2005 (-1,3% de mortalité). Les dernières estimations suggèrent que le taux de mortalité standardisé à la population mondiale devrait encore baisser ces dernières années pour atteindre 16,2 pour 100 000 personnes en 2010. Cette évolution s'explique par les progrès thérapeutiques, par une meilleure prise en charge et par l'extension de la pratique du dépistage permettant d'améliorer le pronostic en dépistant les tumeurs à un stade précoce [Bélot *et al*, 2008]. Le cancer du sein se situe parmi les cancers de bon pronostic, tous stades confondus, avec un taux de survie relative à 5 ans supérieur à 80% en France [Berrino *et al*, 2007]. Néanmoins, ce taux de survie varie considérablement selon le stade de développement de la tumeur au moment du diagnostic. En particulier, les cancers du sein métastatiques sont aujourd'hui encore considérés comme incurables.

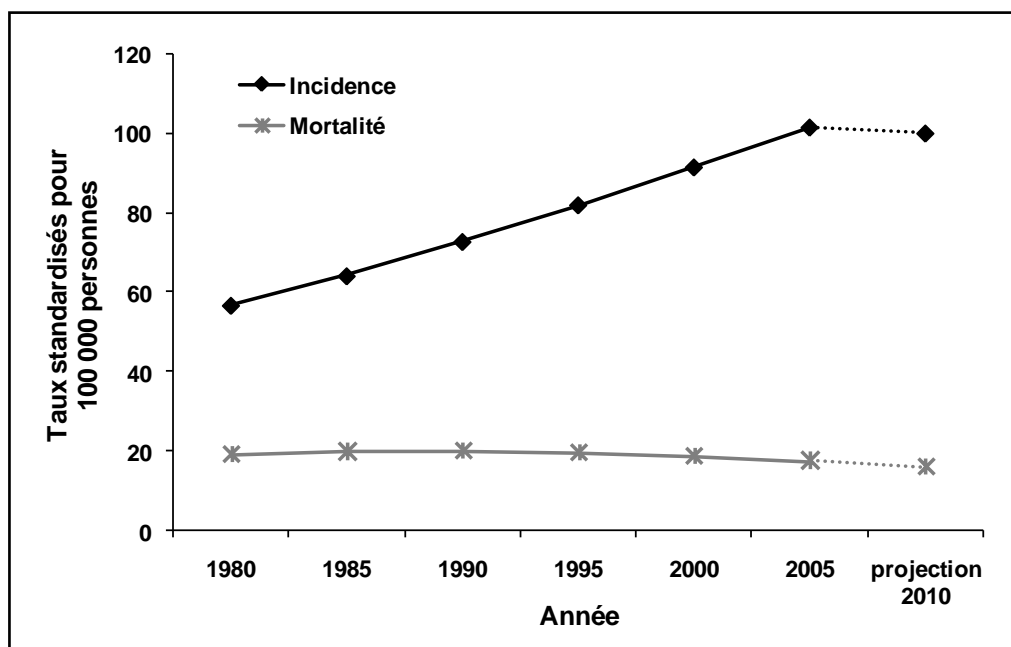


Figure 1. Evolution de l'incidence et de la mortalité du cancer du sein en France entre 1980 et 2005 [d'après Bélot *et al*, 2008]. Les lignes en pointillés représentent les projections pour 2010 estimées par l'Institut National du Cancer (INCa) et l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS).

I.2. Facteurs de risques

Les facteurs de risque de survenue d'un cancer du sein sont multiples et peuvent se cumuler.

L'âge est un facteur important dans le développement de la plupart des cancers. L'incidence du cancer du sein augmente rapidement avec l'âge de la patiente jusqu'à atteindre un pic de fréquence autour de 50 ans, suivi d'un ralentissement de cette augmentation [Key *et al*, 2001]. Près de la moitié des cancers du sein sont diagnostiqués entre 50 et 69 ans, l'âge médian du diagnostic étant de 61 ans. Pour ces raisons, un programme de dépistage organisé du cancer du sein a été généralisé en France depuis 2004. Il concerne les femmes âgées de 50 à 74 ans et consiste en une mammographie de contrôle tous les deux ans.

Les facteurs familiaux et génétiques sont incriminés dans 5 à 10% des cancers du sein diagnostiqués. En cas de cancer du sein familial, c'est-à-dire quand plusieurs femmes de la même famille ou une femme de la même famille de moins de 40 ans ont été atteintes de cette maladie, des mutations germinales de certains gènes de prédisposition au cancer du sein sont recherchées. On distingue différents types de mutations, plus ou moins pénétrantes, c'est-à-dire associées de manière plus ou moins importante au risque de cancer du sein. Parmi les mutations à forte pénétrance se trouvent celles affectant les gènes de réparation de l'ADN

BRCA1 et *BRCA2* (*Breast Cancer 1 and 2*) qui sont à eux seuls responsables de la moitié des cancers à prédisposition génétique et dont le risque cumulé à 70 ans atteint 65% et 45% respectivement [Antoniou *et al*, 2003]. D'autres gènes ont été incriminés comme *TP53* (codant le gène suppresseur de tumeur p53), *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*), *STK11* (*Ser/Thr Kinase 11*) et *CDH1* (gène codant la E-cadhérine). Des mutations des gènes *ATM* (*Ataxia Telangiectasa Mutated*) et *CHK2* (*Checkpoint Kinase 2*), impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, sont également capables d'augmenter de manière modérée le risque de cancer du sein [Campeau *et al*, 2008]. Finalement, la plupart des cancers du sein familiaux seraient associés à une combinaison de plusieurs polymorphismes de faible pénétrance affectant des gènes impliqués dans des processus majeurs comme la détoxification des xénobiotiques, la réparation de l'ADN, l'apoptose ou la prolifération cellulaire [Mavaddat *et al*, 2010].

Facteurs cliniques. Une femme avec des antécédents de cancer du sein a 3 à 4 fois plus de risque de développer un nouveau cancer du sein. En outre, certaines lésions bénignes, en particulier les hyperplasies atypiques, confère un risque accru de développer un carcinome mammaire [Key *et al*, 2001]. La présence d'un tissu mammaire dense (observé lors d'une mammographie), c'est-à-dire avec une forte proportion de tissu glandulaire et une plus faible proportion de tissu adipeux, représente également un facteur de risque.

L'imprégnation hormonale. Les œstrogènes sont connus depuis longtemps pour favoriser la prolifération cellulaire. Par conséquent, une exposition prolongée aux œstrogènes au cours de la vie provoque une élévation du risque d'apparition d'un cancer du sein. Dans ce contexte, une puberté précoce (< 12 ans), une ménopause tardive (> 55 ans), ainsi que la prise de contraceptifs oraux ou de traitements hormonaux substitutifs de la ménopause pendant plus de 10 ans apparaissent comme des facteurs de risque [Key *et al*, 2001 ; Chen, 2009]. De plus, l'*Endocrine Society* a récemment souligné le parallèle entre l'augmentation de l'incidence du cancer du sein depuis les 50 dernières années et le développement de l'utilisation de produits chimiques synthétiques ayant une action œstrogénique tels que le diéthylstilbestrol ou le bisphénol A [Diamanti-Kandarakis *et al*, 2009]. Par ailleurs, la nulliparité ou une première grossesse tardive (> 35 ans), se traduisant par une prolifération sans différenciation des cellules mammaires sur une longue durée, peuvent accroître légèrement le risque de cancer du sein [Ewertz *et al*, 1990]. En revanche, le nombre de grossesses et l'allaitement prolongé pourraient limiter le risque de développer ce type de cancer [Lipworth *et al*, 2000].

L'alimentation et le mode de vie semblent jouer un rôle non négligeable dans l'apparition du cancer du sein. En effet, diverses études ont démontré une association entre la consommation d'alcool et le risque de cancer du sein chez la femme se traduisant par une augmentation du risque de 30% pour une consommation quotidienne de trois verres d'alcool [Key *et al*, 2006]. De même, une alimentation riche en graisses ainsi que l'obésité chez les femmes ménopausées représentent des facteurs de risque, en partie du fait de l'augmentation des taux sériques d'œstrogènes dans ces conditions [Renehan *et al*, 2010]. A l'inverse, il a été montré qu'une activité physique régulière présentait des propriétés protectrices [Lynch *et al*, 2011].

I.3. Biomarqueurs et thérapie personnalisée

Le cancer du sein est une maladie hétérogène qui progresse *via* l'accumulation d'aberrations génétiques et épigénétiques. Il existe par conséquent différents sous-types de tumeurs, avec des profils moléculaires distincts, qui divergent par leur pronostic et leur réponse aux traitements. Le défi de la médecine oncologique du XXI^e siècle est de développer une thérapeutique plus individualisée, grâce à une meilleure connaissance des propriétés spécifiques de chaque tumeur, afin d'améliorer l'efficacité des traitements et de limiter les effets secondaires indésirables pour les patientes. Dans cette optique, la pratique clinique doit être capable d'intégrer de nouveaux outils décisionnels en plus des traditionnelles caractéristiques cliniques et anatomopathologiques (**Figure 2**). En particulier, la généralisation de l'utilisation de biomarqueurs moléculaires pertinents, spécifiques du risque de rechute de la maladie en absence de traitement (marqueur pronostique) ou permettant d'anticiper la réponse à une thérapeutique donnée (marqueur prédictif), devrait permettre d'optimiser le traitement du cancer du sein et de proposer des thérapies "sur mesure" [D'Hondt *et al*, 2008 ; Weigel et Downsett, 2010 ; Zografos et Roukos, 2011].

Certains biomarqueurs bien établis et validés tels que les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone ainsi que HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor-2*) jouent d'ores et déjà un rôle essentiel dans le choix des traitements contre le cancer du sein. Néanmoins, on estime encore aujourd'hui le taux d'échec thérapeutique à environ 30% [Mullan et Millikan, 2007]. Il existe par conséquent un réel besoin d'identifier et de valider de nouveaux biomarqueurs afin de mieux appréhender l'hétérogénéité des tumeurs de sein.

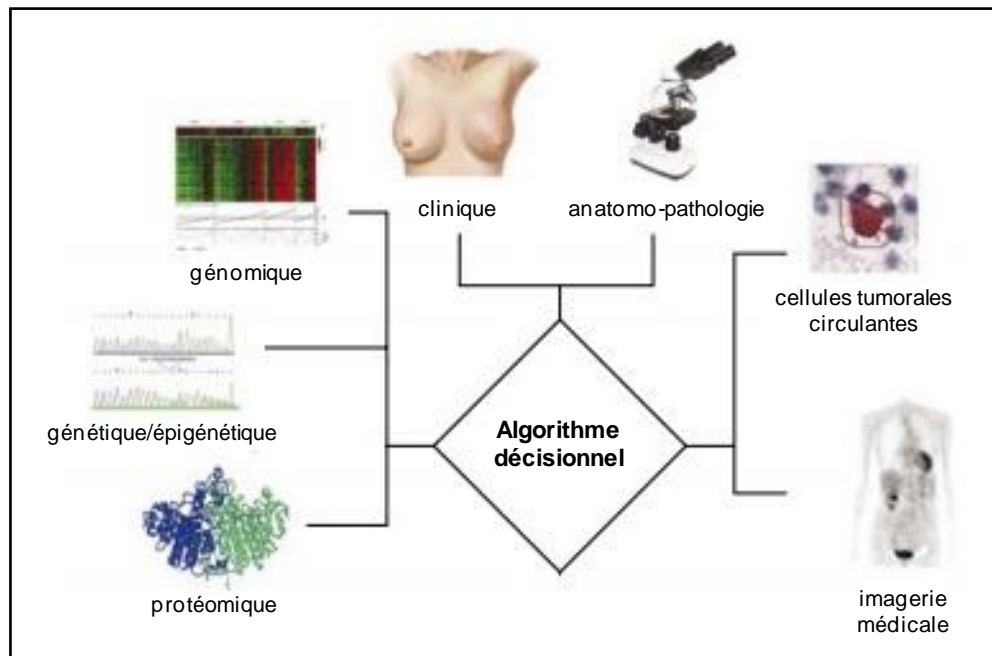


Figure 2. Intégration des outils décisionnels pour la prise en charge thérapeutique individualisée [D'Hondt *et al*, 2008].

I.3.1. Biomarqueurs établis et thérapie ciblée

Alors que le traitement de base du cancer du sein consiste généralement en une chirurgie suivie d'une radiothérapie ou d'une chimiothérapie, l'identification et la validation de certains biomarqueurs a permis le développement de thérapies ciblées.

Les récepteurs aux œstrogènes (RE) et à la progestérone (RP) figurent parmi les premiers biomarqueurs à avoir été identifiés dans le cancer du sein. Environ 70 à 80% des tumeurs du sein sont hormono-dépendantes et se développent sous l'influence de l'œstradiol. La présence des récepteurs hormonaux s'avère essentielle pour décider de l'application de l'hormonothérapie [Moriya *et al*, 2010]. A partir des années 1970, le tamoxifène, un antagoniste partiel de RE inhibant de manière compétitive la fixation de l'œstradiol et limitant ainsi la prolifération cellulaire, a été développé et testé dans des essais cliniques [Jordan et Dowse, 1976]. Le tamoxifène s'est avéré apporter un bénéfice en terme de récurrence et de survie pour plus de 80% des patientes RE-positives (RE+) et seulement 30% des patientes en absence de sélection selon leur statut hormonal [Dinh *et al*, 2007]. En raison de ces résultats, la détection du statut RE a été recommandée en routine au début des années 1990 et a permis d'individualiser la thérapie adjuvante du cancer du sein et de réduire le taux de mortalité de 31% dans la population RE+ [Weigel et Dowsett, 2010]. Plus récemment, une autre classe de médicaments, les anti-aromatases (létrozole/Femara®, anastrozole/Arimidex®, exemestane/

Aromasine®), a montré son efficacité dans le traitement des cancers du sein RE+. Ces composés agissent en inhibant l'aromatase, une enzyme responsable de la production secondaire d'œstrogènes (à partir des androgènes sécrétés par la glande surrénale), qui a lieu principalement dans le tissu adipeux et le tissu mammaire chez les femmes ménopausées. De manière intéressante, le recours aux inhibiteurs de l'aromatase en traitement adjuvant chez les patientes ménopausées a permis d'obtenir un risque de récurrence plus faible qu'avec le tamoxifène [Rugo, 2008].

L'oncogène HER2 a été initialement identifié en tant que marqueur pronostique, associé à un phénotype tumoral plus agressif et à un taux de survie réduit. Le récepteur HER2 est une glycoprotéine transmembranaire à activité tyrosine kinase qui joue un rôle important dans la croissance, la différenciation et la survie des cellules. Une surexpression et une amplification de HER2 sont retrouvées dans environ 25% des tumeurs de sein et permettent de proposer une thérapie ciblée à ce groupe de patientes. Le développement d'un anticorps monoclonal anti-HER2, le trastuzumab (Herceptine®), a permis de réduire les taux de récurrence de 39 à 52% et la mortalité de 30% chez les patientes HER2+ [Dinh *et al*, 2007]. Plus récemment, le lapatinib (Tyverb®), un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase des récepteurs HER2 et EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), a obtenu une autorisation de mise sur le marché. Il est indiqué chez les patientes surexprimant HER2 pour lesquelles le traitement par l'Herceptine ou par chimiothérapie classique s'est avéré inefficace. Dans ce cas, l'association lapatinib-capécitabine (une prodrogue du 5-fluorouracile) permet de réduire de moitié le risque de progression de la maladie par rapport à la capécitabine seule [Geyer *et al*, 2006].

Le processus d'angiogenèse peut également être ciblé dans certains cancers du sein. Depuis 2007, le bévacizumab (Avastin®), un anticorps monoclonal anti-VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor-A*) bloquant la néo-angiogenèse, est indiqué en traitement de première ligne pour les cancers du sein métastatiques. Associé au paclitaxel (Taxol®), ce traitement permet de doubler le temps de survie sans progression, mais pas la survie globale [Miller *et al*, 2007]. Cependant, son utilisation est aujourd'hui remise en question. En décembre 2010, la *Food and Drug Administration* (FDA) américaine a recommandé que soit retirée l'indication de l'Avastin dans le cancer du sein métastatique, jugeant le rapport bénéfices/risques négatif, en raison d'effets indésirables graves tels que des complications cardiaques, des neuropathies ou encore des troubles du système immunitaire. L'agence européenne du médicament a pour sa part décidé de maintenir cette indication.

I.3.2. Biomarqueurs émergents

De nombreux gènes ont émergé en tant que nouveaux biomarqueurs potentiels, sans toutefois avoir été validés à ce jour pour leur application clinique. Il ne s'agira pas ici de faire la liste exhaustive de ces biomarqueurs potentiels, mais plutôt d'en citer quelques exemples.

La protéine **Ki-67** est exprimée de manière universelle dans les cellules en prolifération mais est absente dans les cellules quiescentes, ce qui a suscité l'intérêt d'évaluer Ki-67 en tant que marqueur de prolifération. Ki-67 présente une valeur pronostique, puisque les niveaux d'expression de Ki-67 dans les tumeurs du sein sont inversement corrélés au taux de survie globale [Stuart-Harris *et al*, 2008]. Le comité international d'experts de St Gallen 2009 a mis en lumière l'importance d'inclure l'immunohistochimie de Ki-67 dans la pratique clinique de routine pour les cancers du sein RE-positifs et HER2-négatifs. Cette approche permettrait de décider d'ajouter la chimiothérapie en plus de l'hormonothérapie chez les patientes Ki-67-positives [Goldhirsh *et al*, 2009].

Un autre marqueur de prolifération tumorale d'intérêt est la **topoisomérase II α** , qui représente en outre un marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie à base d'anthracyclines [Nikolényi *et al*, 2011].

La **cycline D1** est surexprimée dans plus de la moitié des cancers du sein. Cette protéine est impliquée dans la prolifération cellulaire et l'amplification de ce gène constitue un facteur de mauvais pronostic. De plus, la surexpression de la cycline D1 est prédictive d'une faible réponse aux traitements à base d'anti-œstrogènes [Weigel et Downsett, 2010].

Cependant, très peu de biomarqueurs individuels sont suffisamment puissants pour être validés et utilisés dans la pratique clinique, c'est pourquoi de nombreuses études récentes s'orientent vers la recherche de signatures multigéniques.

I.3.3. Signatures moléculaires

Au cours des dix dernières années, le développement des technologies haut-débit et leur capacité à cribler des centaines de gènes simultanément a permis d'identifier des profils d'expression génique et a ouvert la voie à de nouvelles stratégies biomédicales.

Notamment, l'utilisation des micropuces à ADN a permis d'affiner la caractérisation des tumeurs de sein et de proposer une nouvelle classification dite moléculaire. Cinq signatures intrinsèques des tumeurs mammaires ont ainsi été identifiées selon leur profil d'expression

génique, chacune présentant des évolutions cliniques et des réponses thérapeutiques distinctes [Perou et al, 2000 ; Prat et Perou, 2011 ; Raica *et al*, 2009 ; Sørli *et al*, 2001].

- Le type **luminal-like** est caractérisé par l'expression de RE et RP, mais également d'autres marqueurs tels que les cytokératines 8 et 18. Cette catégorie est sub-divisée en deux groupes : **luminal A** (56 à 61% des cas) et **luminal B** (9 à 16% des cas), selon leur niveau d'expression des récepteurs hormonaux. Le groupe luminal A est caractérisé par des niveaux d'expression élevés de RE et est associé à un bon pronostic (statut RE+/RP+/HER2-). Le groupe luminal B présente des niveaux d'expression de RE faibles ou modérés, souvent associés à l'expression d'autres marqueurs comme HER2, EGFR, Ki-67 et la cycline E (statut RE+/RP+/HER2+). Ces tumeurs ont généralement un pronostic plus défavorable. Les tumeurs luminal-like sont sensibles à l'hormonothérapie.

- Le type **HER2-enrichi** (8 à 16% des cas) est caractérisé par la surexpression et l'amplification de l'oncogène *HER2* et par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux (RE-/RP-/HER2+). Dans la majorité des cas, les cellules tumorales de type HER2+ présentent des mutations de p53. Ces tumeurs sont peu différenciées et possèdent un mauvais pronostic. Elles ne répondent pas à l'hormonothérapie, mais sont sensibles à l'Herceptine.

- Le type **triple négatif** (8 à 20% des cas) est surtout retrouvé chez des patientes pré-ménopausées et est caractérisé par l'expression des cytokératines 5 et 6 et de l'EGFR ainsi que par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et de HER2 (RE-/RP-/HER2-). Ce groupe de tumeurs correspond majoritairement au sous-type **basal-like**. Ce type de cancer a un pronostic défavorable et présente très souvent des mutations de p53 et de BRCA1. Les tumeurs basal-like répondent mieux à la chimiothérapie que les autres, mais aucune thérapie ciblée n'existe à ce jour pour ce groupe. Un autre sous-type moléculaire triple négatif a plus récemment été identifié, le sous-type **claudine-low**, caractérisé par une faible expression des protéines d'adhésion cellule-cellule et par des propriétés proches de celles des cellules souches mammaires [Herschkowitz *et al*, 2007 ; Prat et Perou, 2011].

Ces dernières années, plusieurs équipes de recherche ont compris l'enjeu de développer des tests génomiques basés sur des signatures moléculaires spécifiques permettant de déterminer le pronostic des patientes et/ou la réponse aux traitements de façon plus précise qu'avec les facteurs anatomocliniques standards. Seuls quelques exemples de signatures moléculaires les mieux connues à ce jour seront présentés ici [pour des revues voir de Cremoux, 2010 ; D'Hondt *et al*, 2008 ; Weigel et Dowsett, 2010]. Deux études distinctes ont abouti au développement et à la commercialisation de deux signatures génétiques

pronostiques. La première est une signature pronostique de 70 gènes appelée MammaPrint® (Agendia, Amsterdam, Pays-Bas). Elle permet de prédire l'issue clinique plus efficacement que les outils classiques [Van't Veer *et al*, 2002]. La seconde est une signature de 21 gènes appelée Oncotype DX® (Genomic Health, Redwood, CA, USA) qui permet de prédire la rechute à 10 ans chez des patientes atteintes d'un cancer du sein sans envahissement ganglionnaire, RE+ et traitées par le tamoxifène [Paik *et al*, 2004]. Ces deux profils ont été approuvés par la FDA, mais ne pourront être utilisés comme outil clinique qu'après une validation prospective. Plusieurs autres signatures d'expression génétiques pronostiques ont été rapportées comme la signature de 76 gènes de Rotterdam (Veridex®) [Wang *et al*, 2005], l'index de grade génomique [Sotiriou *et al*, 2006], la signature de "cellules souches" [Glinsky *et al*, 2005] ou la signature p53 sauvage/muté [Miller *et al*, 2005].

I.3.4. Cellules tumorales circulantes et ADN tumeur-spécifiques

Un effort majeur est apporté de nos jours à l'identification de biomarqueurs pouvant être mesurés par des méthodes peu invasives. Dans ce contexte, l'existence de cellules tumorales circulantes (CTC) dans le sang de certaines patientes atteintes d'un cancer du sein a fait émerger de nouvelles perspectives (**Figure 2**). Ainsi, un contenu élevé en CTC permet de suspecter la présence de métastases au moment du diagnostic et a été décrit comme un facteur de mauvais pronostic. La caractérisation moléculaire des CTC permettrait également d'obtenir des informations sur l'expression de certains biomarqueurs (RE, HER2...) sans passer par une biopsie tissulaire. Enfin, la mesure des CTC pourrait permettre de suivre en temps réel l'efficacité d'un traitement [Lianidou et Markou, 2011].

Une autre approche consiste en la détection d'ADN ou de microARN circulants (sans cellule) qui sont dans certains cas associés à des paramètres clinicopathologiques. Des études supplémentaires sont néanmoins nécessaires afin d'envisager leur possible utilisation comme biomarqueurs [Weigel et Dowsett, 2010].

Beaucoup de recherche et d'efforts sont encore nécessaires afin de développer des biomarqueurs pronostiques et/ou prédictifs pertinents utilisables dans la pratique clinique et permettant d'améliorer la prise en charge personnalisée des patientes atteintes d'un cancer du sein. Parmi les pistes de recherche actuelles, certains gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire pourraient représenter des candidats intéressants.

II. LE CYCLE CELLULAIRE

C'est en 1858 que le concept de la multiplication cellulaire est apparu lorsque Rudolf Virchow formula sa célèbre théorie "toute cellule provient d'une cellule". Le cycle cellulaire est l'ensemble des processus conduisant à la division d'une cellule mère en deux cellules filles génétiquement identiques [Meijer, 2006 ; Viillard *et al*, 2001 ; Vermeulen *et al*, 2003]. Deux événements essentiels permettent la transmission fidèle de l'information génétique d'une génération à l'autre : d'une part, la réplication semi-conservative du matériel génétique et d'autre part, la ségrégation des chromosomes répliqués. C'est au cours de l'interphase, et plus particulièrement de la phase S, qu'a lieu la synthèse d'ADN nécessaire à la réplication des chromosomes (**Figure 3**). La phase S est précédée par la phase G₁ (*Gap 1*) au cours de laquelle la cellule intègre des signaux mitogènes jusqu'au point de restriction, un point de non retour à partir duquel le cycle est irrémédiablement enclenché. Durant cette phase, les cellules vont croître et se préparer à la réplication de l'ADN. L'autre phase intermédiaire, G₂ (*Gap2*) suit la phase S et permet aux cellules de se préparer à la dernière phase : la mitose ou phase M. Cette phase est classiquement divisée en cinq étapes successives : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase au cours desquelles le matériel génétique répliqué va être réparti de manière équitable entre les deux cellules filles, qui finissent par se séparer lors de la cytokinèse. Ces cellules entrent alors dans un nouveau cycle ou quittent le cycle pour entrer en quiescence (G₀) sous l'effet de signaux antimitogènes ou suite à la disparition des facteurs de croissance.

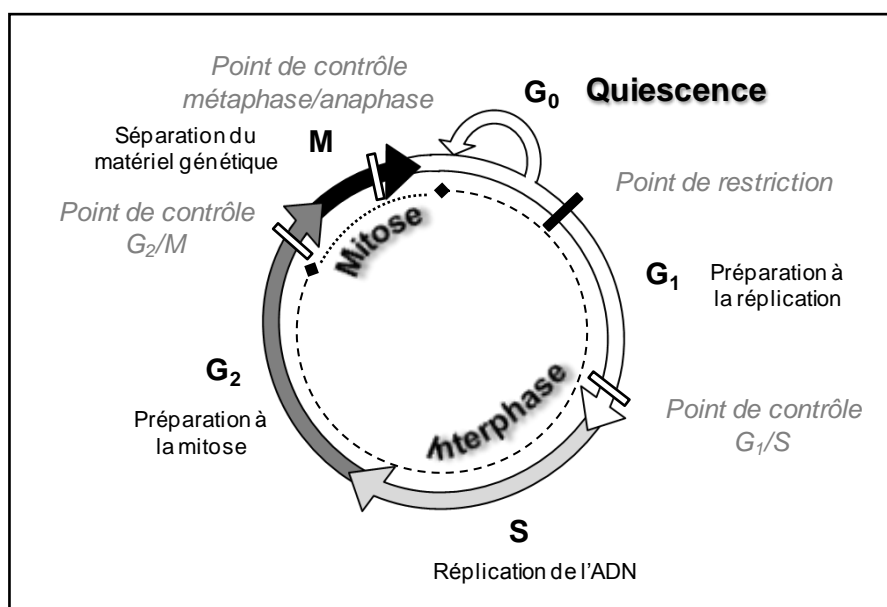


Figure 3. Les étapes du cycle cellulaire chez les eucaryotes.

Le cycle cellulaire est un processus régulé de manière très stricte afin d'assurer l'enchaînement coordonné dans le temps et l'espace des différentes phases et d'empêcher le passage à la phase suivante si la précédente ne s'est pas déroulée correctement. Pour cela, des points de contrôle ou "*checkpoints*" ont été mis en place aux étapes clés du cycle cellulaire (**Figure 3**) afin de détecter d'éventuelles anomalies telles qu'un endommagement de l'ADN, une réplication incomplète ou un mauvais appariement des chromosomes au niveau du fuseau mitotique. Ils permettent dans ce cas de bloquer la progression des cellules afin de préserver l'intégrité génomique [Meijer, 2006].

II.1. Éléments régulateurs du cycle cellulaire

Les principaux acteurs responsables du déclenchement et de la succession contrôlée des différentes phases du cycle cellulaire sont les kinases dépendantes des cyclines (CDK ou *Cyclin-Dependent Kinases*). Les CDK peuvent être actives uniquement lorsqu'elles sont associées à leur sous-unité régulatrice appelée cycline [Meijer, 2006 ; Swartz et Shah, 2005]. Différents complexes CDK/cyclines interviennent à des phases bien déterminées du cycle (**Figure 4**).

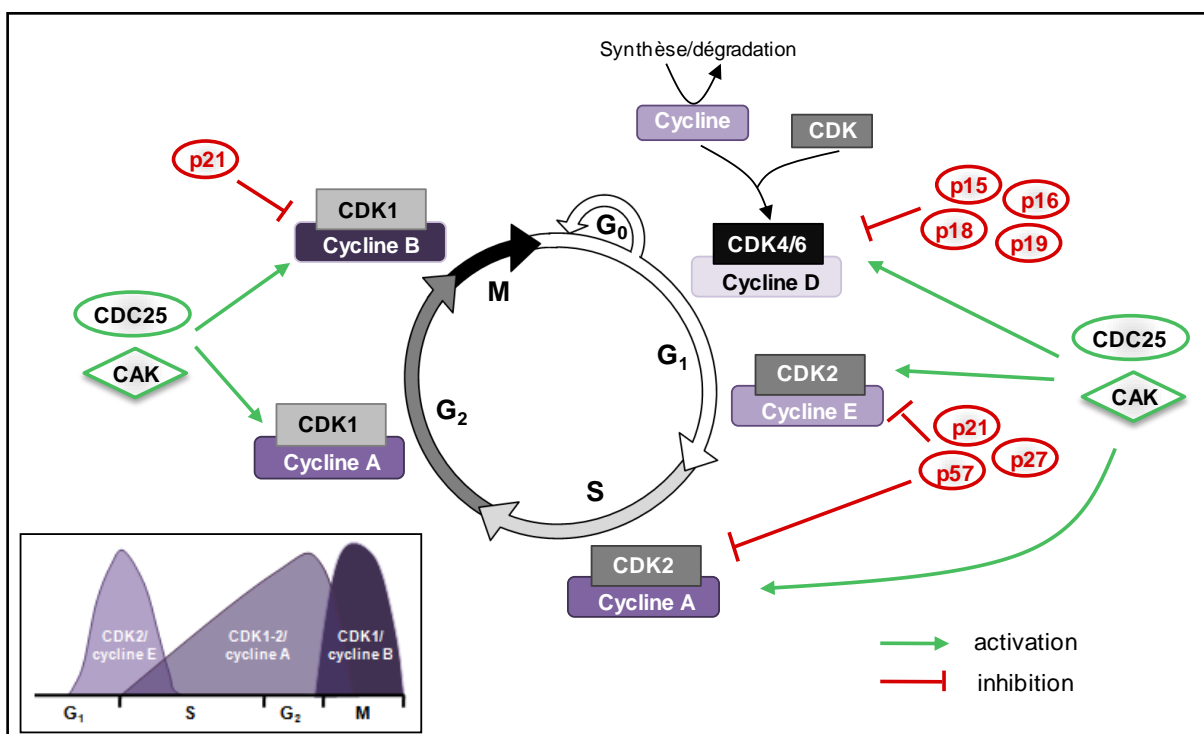


Figure 4. Contrôle du cycle cellulaire par les CDK et leurs régulateurs [adaptée de Meijer, 2006 ; Swartz et Shah, 2005]. Encart, Niveau d'expression des différents complexes CDK/cycline au cours du cycle cellulaire [d'après Hohegger *et al*, 2008].

Afin d'assurer une progression appropriée dans le cycle cellulaire, l'activité des CDK est finement régulée à différents niveaux. La liaison des CDK avec les cyclines est un déterminant essentiel de leur activité. Elle dépend étroitement de l'expression et de la dégradation cyclique des cyclines, qui ont une durée de vie généralement courte (**Figure 4, encart**). Ainsi, l'induction de la transcription d'une cycline permet la progression au sein d'une phase déterminée du cycle, tandis que sa dégradation par le protéasome conduit au passage vers la phase suivante [Hochegger *et al*, 2008]. De plus, des protéines de la famille des CKI (*Cyclin-dependent Kinases Inhibitors*) sont capables d'inhiber les CDK par des interactions transitoires. Deux types de CKI ont été décrits. D'une part, les INK4 (*Inhibitor of cyclin-dependent Kinase 4*), comprenant les protéines p15, p16, p18 et p19, sont capables d'interférer spécifiquement avec la fixation de la cycline D sur les CDK4 et 6. D'autre part, les CIP/KIP (*Cyclin-dependent kinases Inhibiting Protein*), composés des protéines p21, p27 et p57, inhibent différents complexes CDK/cycline (**Figure 4**). Les CDK sont également la cible de diverses phosphorylations activatrices ou inhibitrices. Par exemple, la phosphorylation d'un résidu situé sur la "boucle T" des CDK (Thr161 pour CDK1) par le complexe CAK (*CDK Activating Kinase*) permet de faciliter l'accès du substrat au site catalytique et est donc nécessaire, bien qu'insuffisante à elle-seule, pour activer les CDK. *A contrario*, les kinases WEE1 et MYT1 provoquent l'inhibition de l'activité CDK *via* la phosphorylation des résidus Thr14 et Tyr15 localisés au niveau du site de fixation de l'ATP [Malumbres et Barbacid, 2009]. Ces deux phosphorylations inhibitrices peuvent être éliminées par les phosphatases de la famille CDC25 (*Cell Division Cycle 25*), ce qui conduit à l'activation des complexes CDK/cycline. Trois isoformes de CDC25 ont été identifiées chez les Mammifères : CDC25A, CDC25B et CDC25C, auxquelles nous nous intéresserons plus spécifiquement dans les chapitres suivants (III à V).

II.1.1. Régulation de la transition G₀/G₁

Une cellule quiescente ne peut entrer dans un cycle de prolifération qu'en présence de facteurs de croissance. Dans ce cas, diverses voies de signalisation sont activées, induisant la transcription de gènes essentiels pour la prolifération cellulaire, tel celui codant le facteur de transcription MYC. MYC se dimérise alors avec la protéine MAX et active la transcription des gènes codant les cyclines D et E, CDK4, E2F et CDC25A, indispensables pour l'entrée en phase G₁ (Meijer, 2006).

II.1.2. Régulation de la progression en G₁ et de la transition G₁/S

En phase G₁ précoce, les complexes CDK4/cycline D et CDK6/cycline D, une fois activés par CDC25 et CAK, initient la phosphorylation de la protéine RB (protéine du Rétinoblastome). Cette phosphorylation partielle de RB permet aux facteurs de transcription E2F/DP d'activer la transcription de quelques gènes, dont celui de la cycline E (**Figure 5**). Les complexes CDK2/cycline E vont se former et compléter la phosphorylation de RB. L'hyperphosphorylation de RB aboutit à la libération et à l'activation complète du complexe E2F/DP qui induit alors l'expression de gènes nécessaires à la phase S comme ceux des cyclines E et A, de CDK2, de CDC25A, de E2F et d'enzymes de la réplication [Schwartz et Shah, 2005]. Un processus d'auto-amplification se met en place, les complexes CDK2/cycline E activant la transcription de leur propre cycline et de leur activateur CDC25 et provoquant par ailleurs la dégradation de leur inhibiteur p27 par le protéasome (**Figure 5**). Une fois que la cellule a accumulé suffisamment de complexes CDK2/cycline E, elle est engagée de manière irréversible dans le cycle cellulaire. Cette étape, située entre la phase G₁ précoce et la phase G₁ tardive, constitue le point de restriction à partir duquel la cellule peut proliférer indépendamment de la présence de signaux mitogènes.

Au niveau de la transition G₁/S, des mécanismes de contrôle veillent à l'intégrité de l'ADN et bloquent l'entrée en phase de réplication en cas d'anomalies (cf. II.2.).

II.1.3. Régulation de la phase S

En début de phase S, les cyclines spécifiques de la phase G₁ (cyclines D et E) sont ubiquitinylées par le complexe SCF (*Skp1/Cullin/F-box proteins*) et ainsi dégradées par le protéasome. L'étape de réplication de l'ADN est sous le contrôle du complexe CDK2/cycline A. Ce complexe permet la formation des complexes de pré-réplication, la phosphorylation de l'histone H1 nécessaire à la condensation des chromosomes et la phosphorylation de l'ADN polymérase α primase indispensable à l'initiation de la réplication [Vermeulen *et al*, 2003]. De plus, le complexe CDK2/cycline A phosphoryle la sous-unité DP de E2F entraînant la libération des facteurs de transcription E2F/DP de l'ADN et la dégradation consécutive de E2F (**Figure 5**).

En parallèle, les complexes CDK2/cycline A interviennent dans la duplication des centrosomes qui serviront à mettre en place les pôles du fuseau mitotique lors de la mitose.

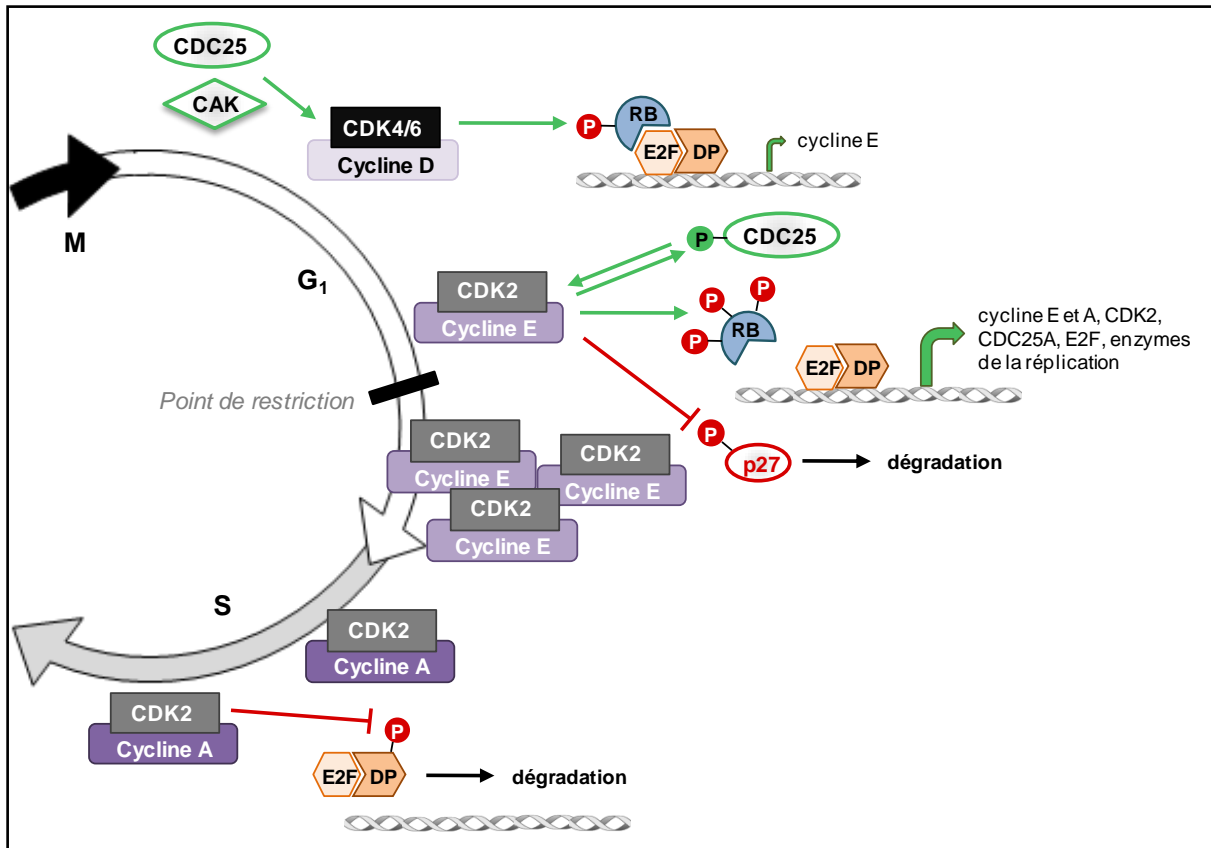


Figure 5. Régulation de la progression en G₁ et de la transition G₁/S [adaptée de Meijer, 2006 ; Swartz et Shah, 2005].

II.1.4. Régulation de la progression en G₂ et de la transition G₂/M

Durant la phase G₂, la cellule se prépare à entrer en mitose. Les complexes CDK1/cycline A sont actifs, bien que leurs fonctions restent encore assez floues. Par ailleurs, la synthèse de la cycline B est induite dès la fin de la phase S, permettant l'accumulation progressive des complexes CDK1/cycline B au cours de la phase G₂. A ce stade, ces complexes sont inactifs car les résidus Thr14 et Tyr15 sont phosphorylés par les kinases WEE1 et MYT1. En revanche, la Thr161, dont la phosphorylation est indispensable à l'activité kinase de CDK1, est déjà phosphorylée par CAK. Plusieurs mécanismes sont responsables de l'activation complète des complexes CDK1/cycline B lorsque la cellule est prête à entrer en mitose. Les kinases inhibitrices WEE1 et MYT1 sont dégradées en fin de G₂ et la phosphatase activatrice CDC25C est transloquée dans le noyau après phosphorylation par PLK1 (*Polo-Like Kinase*). L'activation des complexes CDK1/cycline B est amorcée par CDC25B au niveau des centrosomes. Ces complexes migrent ensuite dans le noyau où CDC25C achève leur activation [Boutros *et al*, 2007a]. Le stock de complexes CDK1/cycline B actifs est alors augmenté massivement par une boucle d'auto-amplification irréversible qui déclenche

l'entrée en mitose, ces complexes activant par phosphorylation leurs activateurs CDC25 et inhibant leurs régulateurs négatifs WEE1 et MYT1 (**Figure 6**).

Au niveau de la transition G_2/M , un mécanisme de surveillance empêche l'entrée en mitose si la réplication est incomplète ou que l'ADN est endommagé (cf. II.2.).

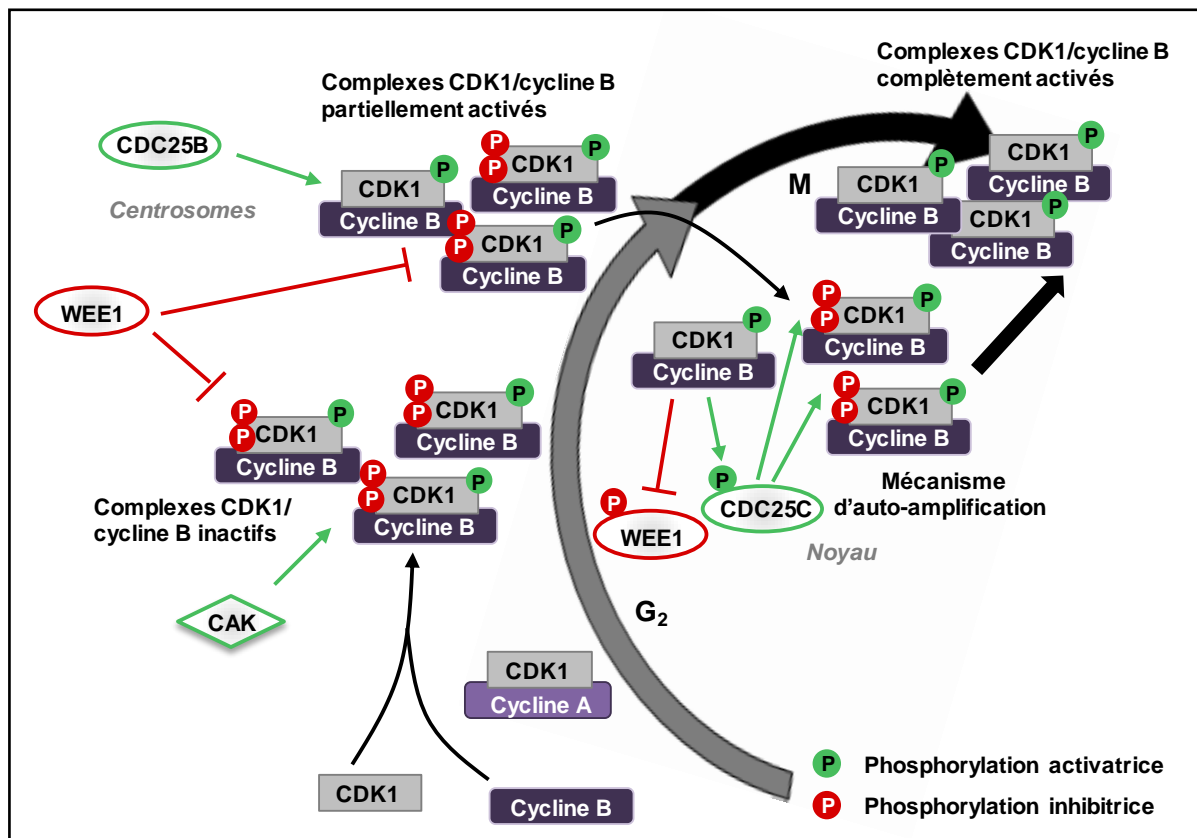


Figure 6. Activation des complexes CDK1/cycline B lors de la transition G_2/M [adaptée de Boutros *et al*, 2007a ; Meijer, 2006].

II.1.5. Régulation de la mitose

Au début de la mitose, les complexes CDK1/cycline B activés, également appelés MPF (*Maturation Promoting Factor*), vont provoquer le déclenchement des événements majeurs de la mitose en phosphorylant de très nombreuses protéines. Parmi leurs principales cibles se trouvent les histones H1 et H3 et les condensines nécessaires à la condensation des chromosomes, ainsi que les lamines impliquées dans la désorganisation de l'enveloppe nucléaire. Les complexes CDK1/cycline B sont également responsables d'autres phénomènes comme l'assemblage du fuseau mitotique, l'attachement des chromosomes répliqués au fuseau ou la réorganisation de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique. Finalement, les complexes CDK1/cycline B phosphorylent le complexe ubiquitine ligase APC/C

(*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) responsable de la dégradation, entre autres, de la cycline B en sortie de mitose.

Au cours de la métaphase, un point de contrôle vérifie que tous les chromosomes sont correctement attachés au fuseau mitotique. Chaque kinétochore non associé au fuseau envoie un signal inhibiteur par le biais de la protéine MAD2 (*Mitotic Arrest Deficient-2*), bloquant ainsi l'activation du complexe APC/C^{Cdc20} nécessaire à la destruction de la sécurine et donc à la séparation des chromatides-sœurs lors de l'anaphase [Meijer, 2006].

II.2. Réponse cellulaire aux dommages à l'ADN

Afin de maintenir l'intégrité de leur génome, les cellules ont développé des systèmes de surveillance très perfectionnés. Ainsi, la présence de lésions dans l'ADN ou une réplication de l'ADN inachevée vont activer les points de contrôle, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire pour laisser le temps à la cellule de réparer ces dommages. Lorsque les dommages sont trop sévères et ne peuvent être réparés, la cellule arrête de proliférer définitivement (sénescence) ou enclenche le processus de mort cellulaire par apoptose [Jackson et Bartek, 2009 ; Karlsson-Rosenthal et Millar, 2006]. Ces points de contrôle interviennent à des étapes clés du cycle cellulaire, en particulier au niveau des transitions G₁/S et G₂/M. Les dommages à l'ADN sont détectés par des protéines senseurs qui induisent alors des voies de signalisation impliquant des transducteurs du signal et finalement des effecteurs. Parmi les principaux transducteurs se trouvent les kinases ATM (*Ataxia Telangiectasa Mutated*) et ATR (*ATM and Rad3 Related*) appartenant à la famille des PIKK (*Phosphatidylinositol 3-Kinase related Kinases*). ATM intervient principalement en réponse à des cassures doubles brins de l'ADN et active CHK2 par phosphorylation (*Checkpoint Kinase 2*), tandis qu'ATR cible essentiellement CHK1 en présence de régions simple brin dans l'ADN. Cependant, ce dogme initial a quelque peu été remis en question puisqu'il semblerait que ces deux voies de signalisation coopèrent entre elles et possèdent certaines fonctions redondantes [Hurley et Buntz, 2007]. Une autre voie de signalisation joue également un rôle important en conditions de stress génotoxique et fait intervenir la kinase p38 appartenant à la famille des SAPK (*Stress Activated Protein Kinase*) et sa cible MK2 (ou MAPKAPK-2, *Mitogen Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2*). Selon la phase du cycle considérée, ainsi que la nature et l'intensité du stress génotoxique, différents effecteurs vont être régulés.

II.2.1. Arrêt du cycle à la transition G₁/S

Afin de prévenir la réplication d'ADN endommagé, le point de contrôle G₁/S conduit à l'activation des kinases ATM/ATR qui permet d'un part d'induire certaines enzymes de réparation de l'ADN et d'autre part de bloquer la progression dans le cycle cellulaire. L'arrêt du cycle est permis par la phosphorylation des kinases CHK1/2 et l'activation subséquente de deux voies de signalisation distinctes [Lukas *et al*, 2004]. La première conduit à l'inhibition rapide de CDK2 en 20 à 30 min par des mécanismes de régulation post-traductionnelle de CDC25A. Cependant, cette réponse est transitoire puisqu'elle permet d'entraver la progression dans le cycle seulement pendant quelques heures. La seconde voie fait intervenir des modifications transcriptionnelles dépendantes de p53 et se met en place plus tardivement, car elle nécessite la synthèse *de novo* de protéines. Elle permet néanmoins un arrêt du cycle plus prolongé, voire définitif [Bartek et Lukas, 2001].

a. Réponse rapide liée à la dégradation de CDC25A

Le blocage rapide du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN est principalement dû à des modifications post-traductionnelles de CDC25A induites par CHK1/2. En effet, suite à un traitement par des agents génotoxiques ou des irradiations, les kinases CHK1/2 phosphorylent les résidus Ser76 et Ser124 de CDC25A, induisant son ubiquitinylation par le complexe SCF^{βTRCP} et sa dégradation par le protéasome [Mailand *et al*, 2000]. Les complexes CDK2/cycline E et CDK2/cycline A sont alors maintenus dans un état inactif, empêchant l'initiation de la réplication.

b. Réponse retardée dépendante de p53

En conditions normales, la protéine p53 est présente à des niveaux faibles de par son interaction avec l'ubiquitine ligase MDM2, responsable de sa protéolyse. En présence de dommages à l'ADN, p53 est stabilisée et s'accumule grâce à la phosphorylation de ses résidus Ser15 par ATM/ATR et Ser20 et Thr18 par CHK1/2, permettant de rompre son interaction avec MDM2 [Bartek et Lukas, 2001]. Cet effet est encore accentué par l'inhibition de MDM2 médiée par ATM/ATR. Une fois stabilisée et activée, p53 va réguler la transcription de nombreux gènes. En particulier, p53 induit l'expression de p21, nécessaire pour l'inhibition

prolongée de CDK2. De plus, la transcription du gène *CDC25A* est réprimée indirectement par p53, renforçant encore le blocage du cycle [Demidova *et al*, 2009].

II.2.2. Arrêt du cycle à la transition G₂/M

Si l'ADN est lésé ou qu'il n'a pas été correctement répliqué lors de la phase S, les cellules sont bloquées en phase G₂ pour éviter la propagation de ces aberrations aux cellules-filles lors de la mitose. De la même manière que pour la transition G₁/S, l'activation du point de contrôle G₂/M fait intervenir deux types de réponses distinctes. Une réponse rapide et transitoire mettant en place des événements de régulation post-traductionnelle de plusieurs protéines effectrices et une réponse différée et stable impliquant la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes médiée par p53 (**Figure 7**) [Lukas *et al*, 2004 ; Smits et Medema, 2001].

a. Réponse rapide liée à des modifications post-traductionnelles

La cascade de signalisation ATM/ATR conduit à l'activation de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telles que l'histone γ -H2AX, BRCA1 ou BASC (*BRCA1-Associated Surveillance Complex*), ainsi qu'à un blocage des cellules en phase G₂ par le biais de l'inactivation du complexe CDK1/cycline B. Pour cela, les kinases CHK1/2 sont impliquées d'une part dans l'activation de WEE1 et d'autre part dans l'inhibition des CDC25. En particulier, CDC25C est phosphorylée sur la Ser216 par CHK1/2, créant ainsi un site de liaison pour la protéine 14-3-3 et conduisant à la rétention cytoplasmique de CDC25C, loin de son substrat CDK1/cycline B [Peng *et al*, 1997]. La voie ERK est également capable de phosphoryler la Ser216 de CDC25C et aboutit à sa dégradation dépendante du protéasome par un mécanisme encore méconnu [Eymin *et al*, 2006]. En outre, en réponse aux rayons UV, l'activité phosphatase de CDC25C peut être inhibée par phosphorylation de sa Ser168 par la kinase JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) appartenant à la famille des SAPK [Goss *et al*, 2003 ; Gutierrez *et al*, 2010]. Enfin, il a été montré que CDC25C pouvait être dégradée à la suite d'un traitement par l'arsénite. Dans ce cas, la protéolyse de CDC25C est liée à l'activité du complexe ubiquitine ligase APC/C^{Cdh1} reconnaissant le motif KEN [Chen *et al*, 2002]. Concernant CDC25A, celle-ci est régulée de la même manière que lors de la transition G₁/S, c'est-à-dire par sa dégradation médiée par le complexe ubiquitine ligase SCF ^{β TRCP} [Mailand *et*

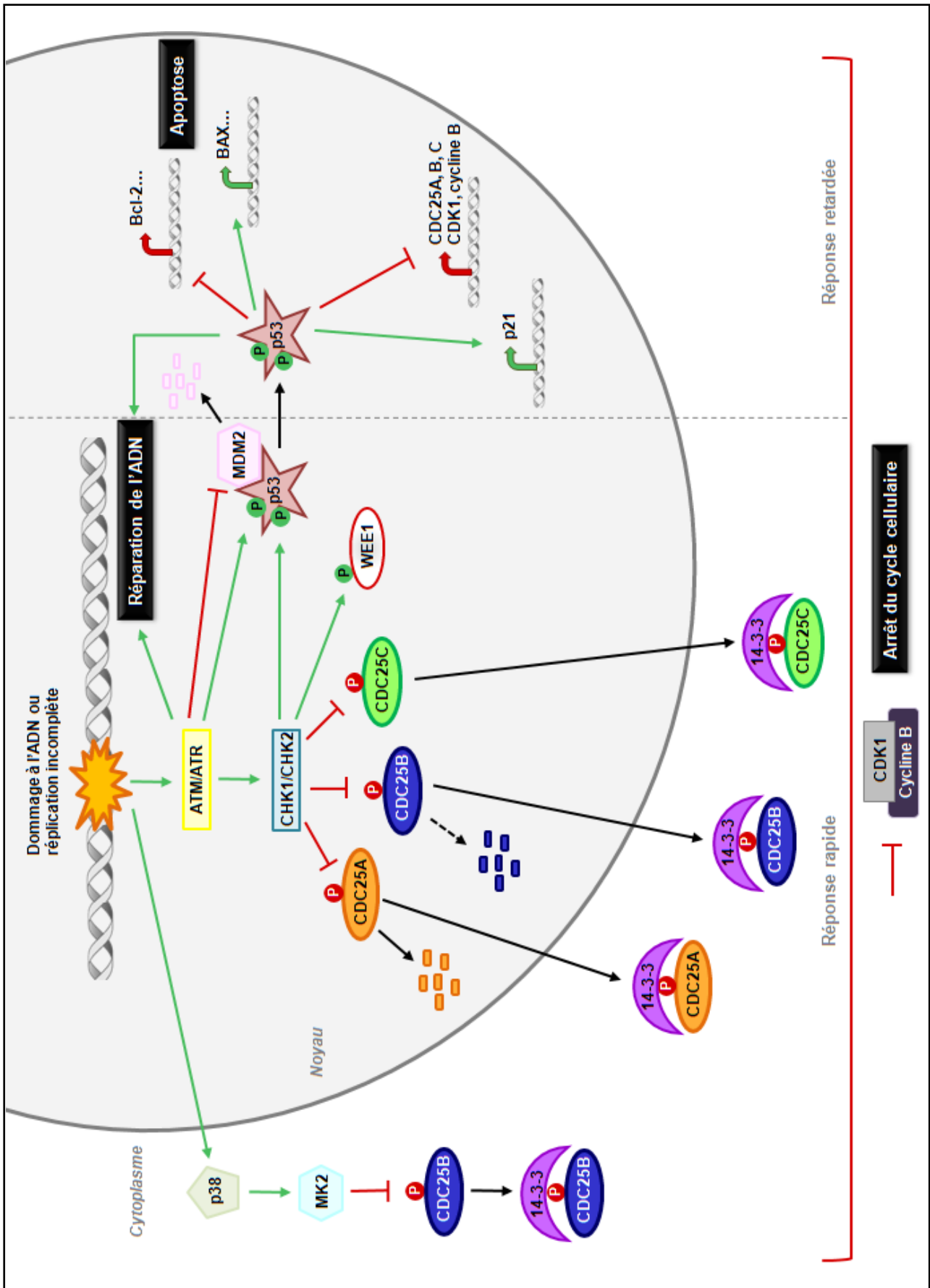


Figure 7. Activation du point de contrôle G₂/M en conditions de dommages à l'ADN.

al, 2000]. Mais elle peut aussi être séquestrée dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 à la suite de la phosphorylation des résidus Ser178 et Thr507 par CHK1/2 [Chen *et al*, 2003]. La régulation de CDC25B est également affectée par certains types de stress génotoxiques. Par exemple, en conditions de stress oxydant, CDC25B est inhibée suite à la phosphorylation de la Ser353 par PKB/Akt, conduisant à son export nucléaire [Baldin *et al*, 2003]. De plus, des lésions de l'ADN provoquées par les rayonnements UV induisent la phosphorylation de CDC25B sur la Ser309 par p38 et MK2 et sur la Ser323 par MK2 et CHK1, faisant apparaître des sites de liaison pour la protéine 14-3-3 [Bulavin *et al*, 2001 ; Lemaire *et al*, 2006 ; Mils *et al*, 2000]. De manière contradictoire, Lemaire *et al* ont récemment montré que la régulation de CDC25B induite par les UV était indépendante des voies ATM/ATR, p38 ou encore p53, mais dépendait de sa répression traductionnelle médiée par la phosphorylation du facteur EIF2A (*Eukaryotic translation Initiation Factor 2A*) [Lemaire *et al*, 2010].

b. Réponse retardée dépendante de p53

Tout comme lors de la transition G₁/S, le facteur de transcription p53 est stabilisé par l'activation du point de contrôle G₂/M. Il active alors la transcription de l'inhibiteur de CDK p21 et de la protéine 14-3-3σ qui permet le maintien du complexe CDK1/cycline B dans le cytoplasme [Lukas *et al*, 2004]. La protéine p53 est par ailleurs capable de réprimer l'expression de certains gènes nécessaires à la progression en phase M, de manière directe pour les gènes codant CDK1 et la cycline B1 ou de manière indirecte pour les gènes codant les trois isoformes de CDC25 (**Figure 7**) [Dalvai *et al*, 2011 ; Demidova *et al*, 2009 ; Manni *et al*, 2001 ; St Clair *et al*, 2004].

II.2.3. Sortie des points de contrôle

Suite à l'établissement des points de contrôle, deux choix principaux s'offrent à la cellule, soit le retour dans le cycle cellulaire après la réparation correcte de l'ADN, soit l'enclenchement de la mort cellulaire si les dommages n'ont pu être réparés.

a. Retour dans le cycle cellulaire

Les mécanismes impliqués dans l'inactivation des points de contrôle et le retour dans le cycle cellulaire sont encore mal connus. Néanmoins, les protéines PLK1 et CDC25B (mais pas CDC25A et CDC25C) semblent essentielles pour l'entrée en mitose après un arrêt du cycle induit par un stress génotoxique [Karlsson-Rosenthal et Millar, 2006 ; van Vugt *et al*, 2005]. PLK1 est responsable de la phosphorylation et de la protéolyse de WEE1 et de la claspine, un co-facteur d'ATR. La connaissance des processus conduisant à l'activation de PLK1 reste très limitée, bien qu'il ait été suggéré qu'elle pouvait être activée par la kinase Aurora A [Medema et Macurek, 2011]. Quant à CDC25B, elle semble nécessaire pour la réactivation des complexes CDK1/cycline B. D'ailleurs, une surexpression de CDC25B conduit à une sortie prématurée du point de contrôle G₂/M induit par la doxorubicine ou l'étoposide et à une entrée des cellules en mitose illégitime [Bugler *et al*, 2006]. Plus récemment, d'autres mécanismes ont été proposés pour expliquer le retour dans le cycle cellulaire. Par exemple, la phosphatase Wip1 est capable de déphosphoryler de multiples effecteurs des voies de réponse aux dommages à l'ADN comme p53 (Ser15) ou MDM2 [Medema et Macurek, 2011]. En outre, Alvarez-Fernández *et al* ont démontré que le facteur de transcription FOXM1 (*Forkhead transcription factor*) était primordial pour un retour efficace dans le cycle après un arrêt en G₂ [Alvarez-Fernández *et al*, 2010]. FOXM1 est notamment requis pour l'expression des cyclines A et B et de PLK1. De manière intéressante, FOXM1 est activé par CDK1. Ces données suggèrent que l'activité CDK doit être maintenue à un niveau minimal pour permettre un éventuel retour dans le cycle. Il est possible que des dommages importants de l'ADN entraînent une inhibition complète de CDK qui résulterait en un blocage du cycle permanent ou en la programmation de la mort cellulaire.

b. Induction de l'apoptose

La protéine suppresseur de tumeur p53 est un des éléments majeurs permettant l'induction des mécanismes apoptotiques en réponse à un stress génotoxique sévère. Elle induit la transcription de nombreux gènes pro-apoptotiques comme *FAS*, *APAF-1* ou ceux de la famille *Bcl-2* tels que *BAX*, *PUMA* ou *NOXA*. A l'inverse, p53 est également capable de réprimer l'expression de gènes anti-apoptotiques comme ceux codant la survivine ou *Bcl-2* (**Figure 7**) [Yoshida *et al*, 2010]. En plus de son activité de régulation transcriptionnelle, p53 peut être transloquée dans le cytoplasme et interagir directement avec les protéines anti-

apoptotiques Bcl-x_L et Bcl-2 [Mihara *et al*, 2003]. L'ensemble de ces mécanismes de régulation va conduire à l'augmentation des facteurs pro-apoptotiques au détriment des facteurs anti-apoptotiques. Dans ce contexte, BAX s'homodimérise et induit la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale qui s'accompagne du relarguage du cytochrome c et d'autres molécules pro-apoptotiques. Il y a alors formation d'un complexe appelé apoptosome composé du cytochrome c, de APAF-1 (*Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*) et de la caspase 9, qui est responsable de l'activation des caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7). Ces membres de la famille des protéases à cystéine vont alors cliver de nombreux substrats impliqués dans la mise en place des processus apoptotiques.

III. LES PHOSPHATASES CDC25

Les phosphatases CDC25 (*Cell Division Cycle 25*) appartiennent à la famille des phosphatases à double spécificité car elles sont capables de déphosphoryler à la fois les résidus pThr et pTyr de leurs substrats. En l'occurrence, les seuls substrats des CDC25 connus à ce jour sont les CDK. Les CDC25 permettent la déphosphorylation de leurs résidus pThr14 et pTyr15 (pour CDK1) et jouent ainsi un rôle essentiel dans la régulation de cycle cellulaire, que ce soit en conditions normales ou en réponse à des dommages à l'ADN.

Le gène *cdc25*⁺ a été initialement identifié chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* comme un gène essentiel pour l'entrée en mitose [Fantes, 1979 ; Russel et Nurse, 1986]. Des homologues du gène *cdc25*⁺ de la levure ont ensuite été identifiés chez de très nombreux organismes eucaryotes, révélant un niveau élevé de conservation de ces gènes au cours de l'évolution [Boutros *et al*, 2007a]. Chez les Mammifères, trois isoformes de CDC25 ont été identifiées : CDC25A, CDC25B et CDC25C, chacune codée par un gène différent [Galaktionov et Beach, 1991 ; Nagata *et al*, 1991 ; Sadhu *et al*, 1990]. La diversité des CDC25 humaines est encore accrue par l'existence de divers événements d'épissage alternatif que nous présenterons dans le paragraphe V.4.

La séquence protéique des CDC25 peut être divisée structurellement en deux domaines. D'une part, le domaine catalytique C-terminal qui est très conservé puisqu'il présente 60 à 70% d'identité de séquences entre les trois isoformes. Ce domaine contient le motif HCX₅R, caractéristique du site actif de toutes les phosphatases à double spécificité au sein duquel est localisée la cystéine catalytique. D'autre part, le domaine régulateur N-terminal qui est fortement divergent entre les trois isoformes avec seulement 20 à 25% d'identité. Cette région

permet de contrôler la localisation subcellulaire des protéines CDC25 grâce à la présence de séquences consensus de localisation nucléaire (NLS, *Nuclear Localization Signal*) et d'export nucléaire (NES, *Nuclear Export Signal*). Par ailleurs, ce domaine renferme de nombreux sites de phosphorylation et d'ubiquitinylation impliqués dans la régulation de l'activité phosphatase, dans la stabilité de la protéine et dans l'interaction avec des protéines régulatrices [Aressy et Ducommun, 2008].

III.1. Rôles des différentes isoformes de CDC25 dans le cycle cellulaire

L'existence de plusieurs isoformes de CDC25 pouvait laisser entrevoir la possibilité d'un rôle spécifique pour chacune d'entre elles à des moments précis du cycle cellulaire. Il a été initialement proposé que CDC25A intervenait principalement dans le contrôle de la transition G₁/S et dans la progression de la phase S [Jinno *et al*, 1994], tandis que CDC25B et CDC25C étaient considérées comme les acteurs majeurs de l'entrée en mitose [Lammer *et al*, 1998 ; Millar *et al*, 1991]. Bon nombre d'études remettent actuellement en question cette répartition spécifique des rôles car il est apparu que les différentes isoformes de CDC25 peuvent agir de concert à diverses phases du cycle (**Figure 8**).

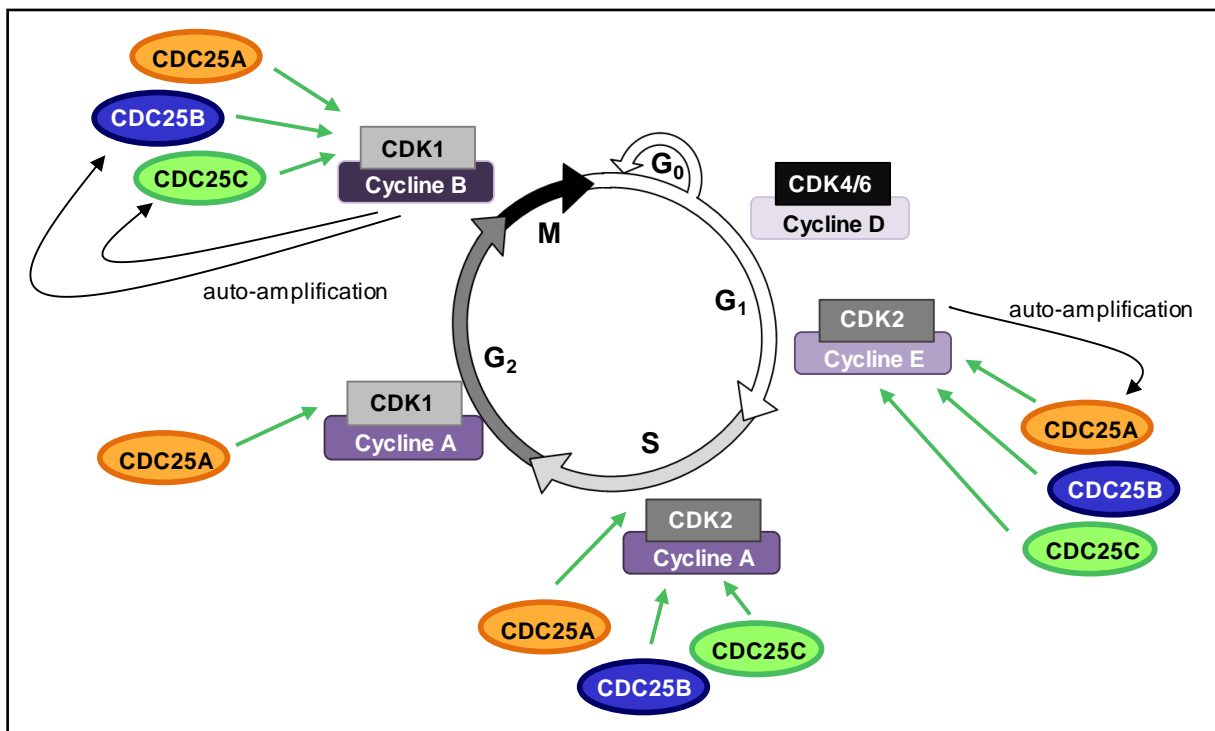


Figure 8. Régulation du cycle cellulaire par les différentes isoformes de CDC25 [adapté de Contour-Galcera *et al*, 2007].

Il est couramment admis que le début du cycle est contrôlé de manière prédominante par l'isoforme CDC25A qui permet la déphosphorylation des complexes CDK2/cycline E et CDK2/cycline A. En effet, la surexpression de CDC25A dans les cellules humaines accélère l'entrée en phase S en raison d'une activation prématurée de CDK2 [Blomberg et Hoffmann, 1999], tandis que la micro-injection d'anticorps dirigés contre CDC25A provoque un arrêt des cellules en phase G₁ [Jinno *et al*, 1994]. Toutefois, CDC25A ne semble pas être suffisante à elle seule pour permettre la réplication de l'ADN, puisque l'utilisation d'ARN antisens ou interférents dirigés contre CDC25B et CDC25C empêche la progression des cellules HeLa en phase S, même en présence d'une CDC25A fonctionnelle [Garner-Hamrick et Fisher, 1998 ; Turowski *et al*, 2003]. Bien que les cibles et les fonctions spécifiques de chaque isoforme au niveau de la transition G₁/S ne soient pas encore clairement établies, il a été montré récemment que CDC25B intervenait dans le maintien de l'intégrité du centrosome ainsi que dans sa réplication [Boutros *et al*, 2007b ; Boutros *et al*, 2011].

L'activation du complexe CDK1/cycline A au cours de la phase G₂ semble être sous le contrôle exclusif de CDC25A [Timofeev *et al*, 2009]. Lors de la transition G₂/M, le modèle classique considère CDC25B comme la phosphatase initiatrice de l'activation des complexes CDK1/cycline B au niveau des centrosomes, nécessaire à la formation du fuseau mitotique [Gabielli *et al*, 1996]. En début de prophase, les complexes CDK1/cycline B sont alors transloqués dans le noyau où CDC25C complète leur activation (**Figure 6**) [Gabielli *et al*, 1997 ; Lindqvist *et al*, 2005]. Ce rôle crucial de CDC25B et CDC25C dans l'entrée en mitose est soutenu par des expériences de micro-injection d'anticorps dirigés contre ces phosphatases conduisant à un arrêt des cellules en phase G₂ [Lammer *et al*, 1998 ; Millar *et al*, 1991]. Cependant, d'autres études ont également suggéré l'implication de CDC25A lors de la transition G₂/M. Il a en effet été rapporté qu'une surexpression de CDC25A accélère la division cellulaire, alors qu'une diminution de son expression par des ARN interférents retarde l'entrée des cellules en mitose [Mailand *et al*, 2002]. CDC25A serait en fait capable de poursuivre l'activation des complexes CDK1/cycline B au niveau nucléaire et induirait la condensation de la chromatine requise pour la mise en place de la mitose [Lindqvist *et al*, 2005]. De récents travaux sont venus ajouter un degré de complexité supplémentaire au modèle initial. En effet, il semble que CDC25B ne soit pas la seule phosphatase impliquée dans l'activation cytoplasmique et précoce des complexes CDK1/cycline B, puisque des *pools* centrosomaux de CDC25A et CDC25C ont été retrouvés [Bonnet *et al*, 2008 ; Busch *et al*, 2007 ; Franckhauser *et al*, 2010 ; Shreeram *et al*, 2008]. De plus, la protéine CDC25C est également localisée au niveau de l'appareil de Golgi où elle pourrait permettre sa

fragmentation [Noll *et al*, 2006]. Enfin, les résultats d'une étude très récente ont mis en lumière une nouvelle fonction des phosphatases CDC25A et CDC25B lors de la transition G₂/M. En plus de l'activation des complexes CDK1/cycline B par déphosphorylation, ces deux isoformes favorisent l'assemblage de ces complexes, bien que les mécanismes mis en jeu n'aient pas encore été identifiés [Timofeev *et al*, 2010].

L'ensemble de ces observations indique que les trois isoformes de CDC25 collaborent entre elles de manière étroite afin d'assurer l'activation spatio-temporelle correcte des différents complexes CDK/cycline et possèdent certaines fonctions redondantes. Néanmoins, cette apparente redondance fonctionnelle entre les trois isoformes de CDC25 est controversée et semble plutôt limitée. En effet, le *knock-out* du gène *Cdc25a* chez la souris est létal au cours de la période péri-implantatoire (5-7 jours) [Ray *et al*, 2007b]. A l'inverse, les souris déficientes en *Cdc25b* ou *Cdc25c* sont viables, ce qui suggère que ces phosphatases ne sont pas indispensables au cours de l'embryogenèse ou de l'entrée en mitose, bien que l'absence de *Cdc25b* rende les souris femelles stériles, en raison d'un blocage de leurs oocytes en prophase de méiose I [Chen *et al*, 2001 ; Lincoln *et al*, 2002]. Plus récemment, des souris invalidées à la fois pour *Cdc25b* et *Cdc25c* ont été générées. Ces souris double *knock-out* présentent un phénotype identique aux souris *Cdc25b*^{-/-} avec des cycles cellulaires normaux et une réponse correcte aux points de contrôle [Ferguson *et al*, 2005]. Ces travaux suggèrent que la perte de *Cdc25b* et *Cdc25c* chez la souris peut être fonctionnellement compensée par *Cdc25a* ou éventuellement par d'autres phosphatases, alors que l'inverse ne semble pas possible.

III.2. Régulation des phosphatases CDC25

Afin d'assurer la succession appropriée des différentes phases du cycle cellulaire, les phosphatases CDC25 sont finement régulées à la fois par des mécanismes transcriptionnels et par des mécanismes post-traductionnels tels que la phosphorylation réversible de certains sites, une protéolyse ubiquitine-dépendante ou des interactions protéine-protéine. L'ensemble de ces événements de régulation permet le contrôle de l'abondance cellulaire, de la localisation subcellulaire et de l'activité catalytique des CDC25 [Aressy et Ducommun, 2008].

III.2.1. CDC25A

CDC25A est une protéine instable dont l'abondance cellulaire dépend de l'équilibre entre sa synthèse cyclique et sa dégradation ubiquitine-dépendante. CDC25A s'accumule du milieu à la fin de la phase G₁ en raison de l'activation de sa transcription par les facteurs MYC et E2F [Galaktionov *et al*, 1996 ; Vigo *et al*, 1999]. Cette synthèse *de novo* de CDC25A est contrebalancée au cours de l'interphase par sa dégradation médiée par le complexe ubiquitine ligase SCF^{βTRCP} [Busino *et al*, 2004]. L'ubiquitinylation de CDC25A par SCF^{βTRCP} requiert la reconnaissance de deux motifs conservés : DS₈₂G et D₂₁₅DG (**Figure 9**). Le complexe SCF^{βTRCP} reconnaît directement le motif DDG sans qu'aucune modification post-traductionnelle de CDC25A ne soit nécessaire [Kanemori *et al*, 2005]. A l'inverse, la fixation de SCF^{βTRCP} sur le motif DSG exige la phosphorylation préalable de plusieurs résidus situés dans le domaine N-terminal de CDC25A. D'une part la phosphorylation des résidus Ser124, 178, 279 et 293 par CHK1/2, qui se produit même en absence de dommages à l'ADN [Busino *et al*, 2004], et d'autre part une série de phosphorylations hiérarchiques débutant par la phosphorylation de la Ser76 par CHK1, suivie de la phosphorylation des Ser79 et 82 par CK1α (*Casein Kinase 1α*) [Honaker et Piwnica-Worms, 2010]. En présence de lésions dans l'ADN, l'activation des kinases CHK1/2 et/ou MK2 conduit à une hyperphosphorylation de ces résidus et ainsi à une dégradation massive de CDC25A permettant l'arrêt de la prolifération cellulaire (cf. II.2.) [Busino *et al*, 2004]. Par ailleurs, l'activité de CDC25A est augmentée lors de la transition G₁/S suite à sa phosphorylation par le complexe CDK2/cycline E, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif [Hoffman *et al*, 1994]. De même, en début de mitose, le complexe CDK1/cycline B phosphoryle CDC25A au niveau des résidus Ser18 et Ser116, ce qui conduit à la stabilisation de la protéine par un mécanisme encore inconnu qui empêcherait son ubiquitinylation [Mailand *et al*, 2002]. Cette stabilisation de CDC25A participe au phénomène d'amplification de l'activité des complexes CDK1/cycline B nécessaire à la progression en phase M. Finalement, la protéine CDC25A disparaît à la fin de la mitose suite à son ubiquitinylation par le complexe APC/C^{Cdh1}. CDC25A possède trois sites putatifs de fixation pour APC/C^{Cdh1}, à savoir deux motifs KEN (résidus 94 à 96 et 141 à 143) et un motif *D-box* (résidus 157 à 164). Cependant, seul le deuxième motif KEN semble indispensable à l'ubiquitinylation de CDC25A et à la sortie de la phase M [Donzelli *et al*, 2002].

L'activité de CDC25A est également régulée au cours du cycle cellulaire normal par des changements de localisation subcellulaire. En effet, la protéine CDC25A est capable de faire

la navette entre le cytoplasme et le noyau, cette dynamique étant dépendante de la présence des séquences NES et NLS [Källström *et al*, 2005]. De plus, la localisation intracellulaire de CDC25A est contrôlée par son interaction avec la protéine de relocalisation cytoplasmique 14-3-3. Au cours de l'interphase, CHK1 phosphoryle les résidus Ser178 et Thr507, créant ainsi un site de fixation pour la protéine 14-3-3. La phosphatase CDC25A est alors séquestrée dans le cytoplasme, ce qui empêche l'entrée prématurée des cellules en mitose [Chen *et al*, 2003]. Lors d'un stress génotoxique, la voie ATM/ATR-CHK1/CHK2 est induite, conduisant à une phosphorylation accrue des résidus Ser178 et Thr507 et ainsi à un blocage du cycle.

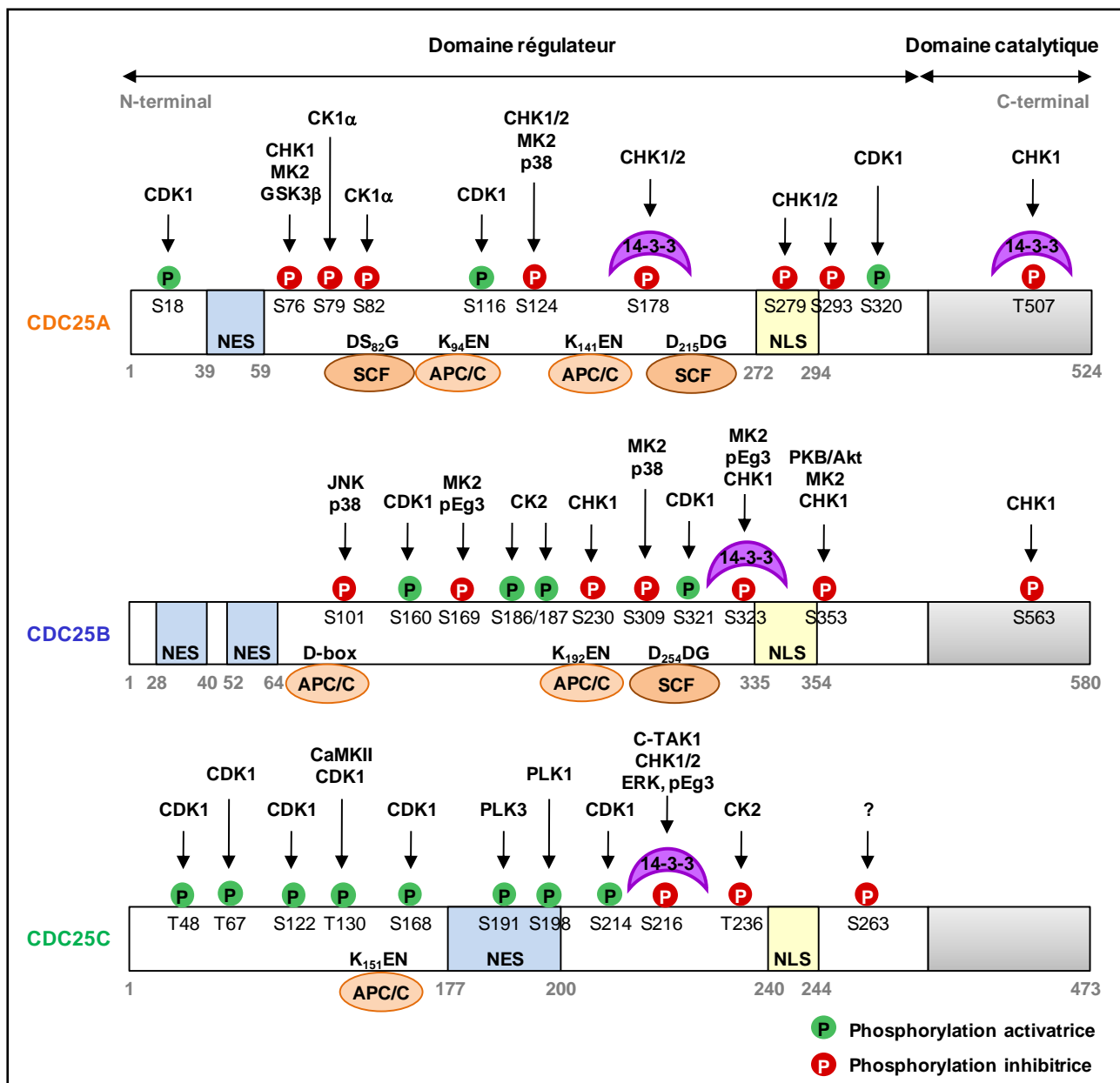


Figure 9. Régulation post-traductionnelle des phosphatases CDC25 [adaptée de Aressy et Ducommun, 2008].

III.2.2. CDC25B

L'expression de la protéine CDC25B augmente progressivement au cours du cycle cellulaire jusqu'à atteindre un maximum en début de mitose [Gabielli *et al*, 1996]. Avant le déclenchement de la mitose, les niveaux de protéine CDC25B sont maintenus bas par phosphorylation par le complexe CDK1/cycline A, entraînant sa dégradation dépendante du protéasome [Baldin *et al*, 1997a]. A l'inverse, la phosphorylation de CDC25B par le complexe CDK1/cycline B en prophase entraîne son accumulation, car elle empêche sa protéolyse médiée par le complexe CDK1/cycline A [Cans *et al*, 1999]. La protéine CDC25B est ensuite dégradée après la métaphase pour permettre la sortie de mitose. Cette dégradation mitotique de CDC25B nécessite l'intégrité des motifs KEN et DDG ciblés respectivement par les complexes ubiquitine ligase APC/C^{Cdh1} et SCF ^{β TRCP} (**Figure 9**) [Kieffer *et al*, 2007]. Il a par ailleurs été montré qu'en condition de stress non-génotoxique induit par l'anisomycine, l'activation des voies de signalisation JNK et p38 conduit à la dégradation de CDC25B suite à la phosphorylation de la Ser101 [Uchida *et al*, 2009].

Bien qu'il ait été clairement établi que CDC25B soit capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, sa localisation subcellulaire exacte aux différentes étapes du cycle cellulaire reste incertaine, en particulier en raison de la localisation différentielle de chaque variant d'épissage (cf. V.4.). Comme pour CDC25A, les transports nucléo-cytoplasmiques de CDC25B sont régis à la fois par l'existence de séquences NES et NLS et par la fixation à la protéine 14-3-3 [Davezac *et al*, 2000 ; Lindqvist *et al*, 2004 ; Uchida *et al*, 2004]. Trois sites de liaison aux protéines 14-3-3 ont été identifiés dans le domaine régulateur de CDC25B : RFGpS₁₅₁MP, RPSpS₂₃₀AP et RSPpS₃₂₃MP [Giles *et al*, 2003]. La séquence contenant la Ser323 représente le site majeur pour la fixation de la protéine 14-3-3 et la séquestration cytoplasmique consécutive de CDC25B [Davezac *et al*, 2000]. Les deux autres séquences contenant les Ser151 et 230 constituent des sites de faible affinité pour 14-3-3. Ils coopèrent avec le site majeur Ser323 pour former un pont intramoléculaire, empêchant ainsi l'accès au site catalytique de CDC25B [Gilles *et al*, 2003].

L'activité de CDC25B au niveau des centrosomes est contrôlée par divers événements de phosphorylation positifs et négatifs. Par exemple, la phosphorylation du résidu Ser353 de CDC25B par la kinase mitotique Aurora A au niveau du centrosome permet d'initier l'activation des complexes CDK1/cycline B lors de la transition G₂/M [Dutertre *et al*, 2004]. Cette phosphorylation est inhibée en conditions de dommages à l'ADN, empêchant ainsi l'entrée inappropriée des cellules en mitose [Cazales *et al*, 2005]. De plus, la protéine kinase

CK2 (*Casein Kinase 2*) phosphoryle les résidus Ser186 et 187, ce qui se traduit par une augmentation de l'activité catalytique de CDC25B *in vitro* et *in vivo* [Theis-Febvre *et al*, 2003]. *A contrario*, la kinase CHK1 phosphoryle les résidus Ser230 et 563 de manière constitutive au cours de l'interphase (en absence de dommages à l'ADN) et prévient ainsi l'entrée prématurée en mitose en régulant négativement l'activité de CDC25B au niveau du centrosome [Schmitt *et al*, 2006]. En outre, la kinase pEg3 pourrait agir comme un régulateur négatif du *pool* centrosomal de CDC25B en phosphorylant les résidus Ser169 et 323 [Davezac *et al*, 2002 ; Mirey *et al*, 2005]. En conditions de stress cellulaire, diverses phosphorylations aboutissent à l'inhibition de l'activité CDC25B par son export nucléaire comme la phosphorylation de la Ser353 par PKB/Akt, MK2 et CHK1 [Baldin *et al*, 2003 ; Lemaire *et al*, 2006] et celle des Ser309 et 323 par MK2 et/ou CHK1 (cf. II.2.2.) [Bulavin *et al*, 2001 ; Lemaire *et al*, 2006 ; Mils *et al*, 2000]. Finalement, CDC25B est phosphorylée dans le noyau sur les résidus Ser160 (Ser146 de CDC25B1) et Ser321 par son substrat CDK1/cycline B, limitant ainsi son export nucléaire, notamment en entravant la fixation de la protéine 14-3-3 sur le site Ser323 (**Figure 9**) [Astuti *et al*, 2010 ; Baldin *et al*, 2002]. Ces réactions sont impliquées dans la mise en place du processus d'auto-amplification responsable de l'activation complète des complexes CDK1/cycline B et du déclenchement de la mitose.

III.2.3. CDC25C

Contrairement aux isoformes CDC25A et CDC25B, la phosphatase CDC25C est exprimée de manière constitutive tout au long du cycle cellulaire, bien que son activité phosphatase ne soit détectée qu'entre la fin de la phase G₂ et le début de la mitose [Girard *et al*, 1992]. De plus cette protéine est plutôt stable avec une demi-vie de 12 h environ, suggérant que l'activité de CDC25C est régulée essentiellement par des processus indépendant de sa protéolyse [Aressy et Ducommun, 2008]. Une étude a toutefois montré que la phosphorylation de la Ser216 de CDC25C par la kinase ERK induisait sa dégradation dépendante de l'ubiquitine, sans que le mécanisme sous-jacent n'ait été élucidé [Eymin *et al*, 2006].

L'activité de CDC25C est finement régulée par des modifications de localisation subcellulaire afin de permettre le déclenchement harmonieux de la mitose. Tout comme pour les deux autres isoformes de CDC25, la présence de séquences NES et NLS permet à la phosphatase CDC25C d'effectuer la navette entre le cytoplasme et le noyau de la cellule (**Figure 9**) [Graves *et al*, 2001]. Au cours de l'interphase d'un cycle cellulaire "normal",

CDC25C est retenue dans le cytoplasme par liaison à la protéine 14-3-3 en raison de la phosphorylation de la Ser216 par la kinase C-TAK1 (*CDC25C Associated Kinase 1*) [Dalal *et al*, 1999 ; Peng *et al*, 1998]. Cette séquestration cytoplasmique de CDC25C est encore renforcée en conditions de dommages à l'ADN suite à la phosphorylation de la Ser216 par les kinases CHK1/2 [Peng *et al*, 1997]. Lors de l'entrée en mitose, il y a dissociation de la liaison entre CDC25C et 14-3-3, permettant la translocation de la phosphatase dans le noyau où elle peut activer les complexes CDK1/cycline B [Dalal *et al*, 1999]. Cette dissociation du complexe CDC25C/14-3-3 serait dépendante de la déphosphorylation de la Ser216 par la phosphatase PP2A après un changement de conformation de CDC25C induit par la peptidyl-prolyle cis/trans isomérase Pin1 [Zhou *et al*, 2000]. De plus, la phosphorylation des résidus Ser191 et 198 localisés au sein de la séquence NES par les kinases PLK3 et PLK1 respectivement, contribue également à relocalisation nucléaire de CDC25C [Bahassi *et al*, 2004 ; Toyoshima-Morimoto *et al*, 2002]. Une fois dans le noyau, CDC25C est activée par les complexes CDK1/cycline B à travers la boucle de rétrocontrôle positif. En effet, CDK1 phosphoryle la Ser214 bloquant ainsi la phosphorylation de la très proche Ser216 et donc la séquestration cytoplasmique de CDC25C [Bulavin *et al*, 2003]. *A contrario*, certaines phosphorylations préviennent l'import nucléaire de CDC25C, comme celles des résidus Thr236 par la kinase CK2 et Ser263 par une kinase inconnue [Esmenjaud-Mailhat *et al*, 2007 ; Schwindling *et al*, 2004].

Au cours de la mitose, l'activité catalytique de CDC25C est également régulée par de multiples événements de phosphorylation dans le domaine N-terminal. Notamment, la phosphorylation des résidus Thr 48, 67 et 130 et Ser122 et 168 par CDK1 et CaMKII (*Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase II*) participe à l'augmentation de l'activité phosphatase de CDC25C (**Figure 9**) [Izumi et Maller, 1993 ; Patel *et al*, 1999 ; Strausfeld *et al*, 1994].

IV. CDC25 ET CANCER

De nombreuses protéines régulatrices contrôlant l'entrée et la progression des cellules dans le cycle cellulaire sont altérées dans les cancers humains, notamment les phosphatases CDC25 [Malumbres et Carnero, 2003].

IV.1. Surexpression des CDC25 dans les cancers humains

Une surexpression des phosphatases CDC25, en particulier des isoformes CDC25A et CDC25B, a été observée dans au moins 17 types de cancers différents, incluant les cancers du sein, de l'œsophage, du poumon, du colon ou encore les lymphomes non-hodgkinien (**Tableau 1**). Cette surexpression est corrélée, dans la plupart des études, à certaines caractéristiques clinicopathologiques de mauvais pronostic comme un grade histologique élevé, un faible degré de différenciation cellulaire ou la présence de métastases, ainsi qu'à un moindre taux de survie des patients. L'importance éventuelle de CDC25C reste obscure, puisque seules 10 études ont cherché à évaluer son implication dans le développement tumoral. La moitié d'entre-elles n'a pu détecter aucune expression de cette isoforme, ni dans les tissus normaux, ni dans les tissus tumoraux, probablement du fait de l'utilisation de techniques trop peu sensibles pour détecter son faible niveau d'expression. Néanmoins, une surexpression de CDC25C a été rapportée dans 27% des tumeurs colorectales [Hernández *et al*, 2001] et 63% des carcinomes de la vulve en association avec certains paramètres de mauvais pronostic [Wang *et al*, 2010].

La comparaison entre les différentes études cliniques est compliquée par la diversité des méthodes employées pour analyser d'une part l'expression des ARNm et d'autre part les niveaux protéiques. De plus, l'interprétation des résultats est encore limitée par l'absence de corrélation observée entre les niveaux d'ARNm et de protéines, probablement liée à l'altération des processus de régulation post-transcriptionnelle et/ou post-traductionnelle dans les cancers. Par exemple, 31% des carcinomes hépatocellulaires présentent une surexpression des ARNm *CDC25B*, alors que les niveaux protéiques ne sont pas augmentés [Xu *et al*, 2003]. A l'inverse, 53% des tumeurs colorectales affichent des niveaux élevés de protéine CDC25A, quand seules 12% d'entre elles surexpriment les ARNm [Hernández *et al*, 2001]. Ces résultats contradictoires sont encore plus frappants en considérant les données provenant de cohortes de patients différentes. En effet, une surexpression des ARNm de *CDC25A* a été

Tableau 1. Surexpression des CDC25 dans les cancers [adapté et mis à jour à partir de Kristjánssdóttir et Rudolph, 2004].

Type de cancer	Surexpression des CDC25 n patients		Corrélation entre la surexpression et les paramètres cliniques		Références	
	Méthode	% de sur expression A : /, B : ND, C : ND	la survie	la survie		
	73/-	RT-PCR	A : /, B : ND, C : ND	A : diminution survie globale		Bonin <i>et al.</i> , 2006
	144p	ribosondes AS	A : 47%, B : ND, C : ND	ND		Cangi <i>et al.</i> , 2000
	21/10	RT-PCR	A : 52%, B : ND, C : ND			
	124p	ribosondes AS	A : ?, B : 32%, C : nd	B : survie à 10 ans		Galaktionov <i>et al.</i> , 1995
Cancer du sein	46p	IHC	A : 70%, B : 57%, C : ND	ND		Ito <i>et al.</i> , 2004
	69p	IHC	A : 59%, B : ND, C : ND	ND	A : diminution survie globale	Königsberg <i>et al.</i> , 2008
	44/11	CF et IF	A : 34%, B : ND, C : ND	A : non	A : diminution survie globale	Mehdipour <i>et al.</i> , 2009
	61/16	IHC	A : ND, B : 79%, C : ND	B : non	B : ND	Hu <i>et al.</i> , 2001
	47	IHC	A : 40%, B : 17%, C : ND	A : non, B : sensibilité aux radiations	ND	Miyata <i>et al.</i> , 2000
	76	IHC	A : ND, B : 32%, C : ND	B : non	B : non	Nakamura <i>et al.</i> , 2004
Carcinome des cellules squameuses de l'oesophage	100	IHC	A : 46%, B : 48%, C : ND	A : taille de la tumeur, A et B : profondeur de l'invasion tumorale, métastases ganglionnaires, stade TNM	A : diminution survie à 5 ans, B : non	Nishioka <i>et al.</i> , 2001
	73p 243	qPCR IHC	A : ND, B : 64%, C : ND A : ND, B : 59%, C : ND	B : non	B : non	Shou <i>et al.</i> , 2008
	40p	NB IHC	A : 38%, B : 70%, C : nd A : ND, B : 78%, C : ND	B : grade de la tumeur, invasion tumorale, métastases ganglionnaires	ND	Kudo <i>et al.</i> , 1997
Cancer gastrique	125	IHC	A : ND, B : 25%, C : ND	B : profondeur de l'invasion tumorale, métastases ganglionnaires	B : diminution survie globale	Takahashi <i>et al.</i> , 2007
	70p	IHC	A : 87%, B : 93%, C : ND	A et B : faible degré de différenciation	ND	Xing <i>et al.</i> , 2008
	177	RT-PCR	A : ND, B : 46%, C : ND	B : angiogenèse	B : diminution survie globale	Boldrini <i>et al.</i> , 2007
Cancer du poumon non à petites cellules	55p	RT-PCR	A : ND, B : 40%, C : ND	B : non	B : diminution survie globale	Sasaki <i>et al.</i> , 2001
	40p	RT-PCR	A : 60%, B : 45%, C : nd	A et B : faible degré de différenciation	ND	Wu <i>et al.</i> , 1998
	59	RT-PCR	A : 60%, B : ND, C : ND	A : infiltration de la moëlle osseuse	A : diminution survie globale	Aref <i>et al.</i> , 2003
Lymphome non-hodgkinien	89/9	RT-PCR	A : 35%, B(2) : 39%, C : nd	A et B : agressivité tumorale	ND	Hernández <i>et al.</i> , 2000
	51	ribosondes AS	A : 59%, B : ND, C : ND	A : agressivité tumorale	ND	Moreira <i>et al.</i> , 2003

Tableau 1 (suite). Surexpression des CDC25 dans les cancers [adapté et mis à jour à partir de Kristjánsdóttir et Rudolph, 2004].

Type de cancer	Surexpression des CDC25		Corrélation entre la surexpression et les paramètres cliniques		Références
	n patients	Méthode	% de surexpression	la survie	
Cancer colorectal	34p	RT-PCR	A : 12%, B : 56%, C : 26%	A : non, B : diminution survie globale, C : non	Hernández <i>et al.</i> , 2001
	15p	WB	A : 53%, B : 67%, C : 27%		
Cancer coloproctal	10p	RT-PCR	A : 90%, B : 60%, C : ND	A : non, B : taille de la tumeur, métastases	Takemasa <i>et al.</i> , 2000
	181	IHC	A : 47%, B : 43%, C : ND	A : non, B : diminution survie à 5 ans	
Carcinome thyroïdien	153	IHC	A : 69%, B : 60%, C : ND	A : non, B : faible invasion, degré élevé de différenciation	Ito <i>et al.</i> , 2002 (folliculaire)
	67	IHC	A : 17%, B : 36%, C : ND	A : non, B : diminution du taux de survie sans maladie	
Cancer de la prostate	30p	IHC	A : ND, B : 97%, C : ND	B : faible degré de différenciation	Ngan <i>et al.</i> , 2003
	58/17	RT-PCR	A : ND, B : ND, C(5) : 50%	C : récurrence biochimique	
Cancer de l'ovaire	106	IHC	A : 30%, B : 30%, C : nd	A et B : diminution survie globale	Broggi <i>et al.</i> , 2000
	50/4	IHC	A : ND, B : 76%, C : ND	B : agressivité tumorale	
Carcinome de l'endomètre	300	IHC	A : 51%, B : 16%, C : 63%	A : non, B : faible différenciation, infiltrations des vaisseaux, C : faible différenciation, diamètre tumoral, métastases ganglionnaires	Wang <i>et al.</i> , 2010
	59p	IHC	A : 78%, B : non, C : ND	A : faible degré de différenciation, invasion de la veine porte, B : non	
Carcinome hépatocellulaire	13p	RT-PCR	A : 69%, B : 31%, C : ND		Xu <i>et al.</i> , 2003
	20	qPCR	A : ND, B : 85%, C : ND	B : non	
Gliome	57	qPCR	A : ND, B : 49%, C : ND	B : grade histologique	Sato <i>et al.</i> , 2001
	48/24	puce à ADN	A : non, B : 1,9 fois, C : non	B : diminution du taux de survie sans maladie	
Cancer du pancréas	48/24	qPCR	A : non, B : 7,5 fois, C : non	B : métastases	Guo <i>et al.</i> , 2004
	181	IHC	A : non, B : 49%, C : non		
Cancer de la tête et du cou	20p	RT-PCR	A : 80%, B : 50%, C : non	ND	Gasparotto <i>et al.</i> , 1997
	46/21	IHC	A : 74%, B : 37%, C : ND	A : non, B : non	

n patients, nombre de patients dans l'étude ; p, paires : un échantillon tumoral et un échantillon péri-tumoral du même patient ; x/x, nombre de tissus tumoraux et normaux (pas du même patient).
 RT-PCR, *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* ; ribosondes AS, ribosondes antisens et hybridation *in situ* ; IHC, immunohistochimie ; CF, cytométrie de flux ; IF, immunofluorescence ; qPCR, PCR quantitative ; NB, Northern Blot ; WB, Western Blot.
 ND, non déterminé ; nd : non détecté (niveau d'expression trop faible)

observée chez 52% des patientes atteintes d'un cancer du sein en corrélation avec une diminution de la survie globale [Cangi *et al*, 2000], tandis que l'augmentation des niveaux protéiques de CDC25A dans 70% des tumeurs du même type n'est pas associée aux paramètres clinicopathologiques [Ito *et al*, 2004]. De même, la surexpression de CDC25B observée dans le cancer du sein est corrélée à des tumeurs de haut grade dans une étude [Galaktionov *et al*, 1995], alors qu'elle est principalement retrouvée dans les tumeurs peu agressives dans une autre étude [Ito *et al*, 2004]. Toutes ces incohérences rendent délicate, voire impossible à ce jour, l'utilisation des CDC25 comme biomarqueurs pronostiques. Néanmoins, la quasi-totalité des études cliniques menées jusqu'à présent ont négligé l'épissage alternatif des CDC25. Le développement d'outils spécifiques permettant de considérer l'implication préférentielle de chaque variant d'épissage dans les cancers devrait permettre d'améliorer de manière significative la valeur pronostique des CDC25 [Boutros *et al*, 2007a ; Kristjánssdóttir et Rudolph, 2004]. Quelques études de ce type ont déjà permis d'apporter certaines clarifications et seront discutées dans le paragraphe V.4.

Les mécanismes impliqués dans la dérégulation des CDC25 au cours de la tumorigenèse restent encore mal compris. Plusieurs études suggèrent cependant que la surexpression des CDC25 ne serait pas liée à une amplification ou à des réarrangements géniques [Broggini *et al*, 2000 ; Kudo *et al*, 1997 ; Hernández *et al*, 2000 ; Hernández *et al*, 2001]. Dans ce contexte, des processus affectant la régulation transcriptionnelle, traductionnelle ou post-traductionnelle des CDC25 pourraient être incriminés.

Il a par exemple été montré que les gènes *CDC25A* et *CDC25B* étaient des cibles du facteur de transcription et proto-oncogène *MYC* [Galaktionov *et al*, 1996]. Depuis, un lien entre l'augmentation d'expression de *CDC25A* et celle de *MYC* a été observée dans le cancer du sein [Ben-Yosef *et al*, 1998]. De même, une corrélation significative entre la surexpression de *CDC25B* et *MYC* a été rapportée dans le lymphome non-hodgkinien et le cancer du poumon [Hernández *et al*, 1998 ; Sasaki *et al*, 2001]. Par ailleurs, la transcription des trois gènes *CDC25* est réprimée par le suppresseur de tumeur *p53*, soit par fixation directe de *p53* sur le promoteur de *CDC25C* [St Clair *et al*, 2004], soit par interaction avec d'autres facteurs de transcription comme NF-Y, Sp1 et ATF3 [Dalvai *et al*, 2011 ; Demidova *et al*, 2009 ; Manni *et al*, 2001 ; Zwicker *et al*, 1995]. Or, le gène *p53* est inactivé par mutation dans près de la moitié des cancers humains [Soussi et Lozano, 2005]. L'incapacité des cellules précancéreuses à réprimer l'expression des *CDC25* après la perte de *p53* pourrait ainsi contribuer à la tumorigenèse. De manière intéressante, Troester *et al* ont montré, grâce à l'utilisation de

puces à ADN, que les tumeurs de sein avec un gène *p53* muté présentaient des niveaux d'expression de *CDC25B* et *CDC25C* significativement supérieurs par rapport aux tumeurs pourvues d'un gène *p53* sauvage [Troester *et al*, 2006]. D'autres facteurs, comme certaines infections virales des cellules peuvent influencer sur les niveaux de transcrits *CDC25A* et *CDC25B* au cours de l'oncogenèse [Boutros *et al*, 2007a].

La surexpression des CDC25 observée dans les cancers peut également être attribuée à des altérations dans la régulation post-traductionnelle de ces protéines. En effet, Löffler *et al* ont suggéré que la surexpression de CDC25A dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses mammaires était liée, non pas à une induction de la transcription, mais à une augmentation de la stabilité protéique [Löffler *et al*, 2003]. Cette observation est renforcée par la corrélation rapportée dans divers tissus tumoraux entre l'expression élevée de CDC25A et l'inactivation de GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 beta*), une enzyme favorisant l'ubiquitinylation et la protéolyse de CDC25A [Kang *et al*, 2008]. De manière similaire, une corrélation a récemment été établie entre l'augmentation des niveaux de CDC25A et la surexpression de DUB3 dans des tumeurs de sein. Cette ubiquitine hydrolase est capable d'hydrolyser la queue poly-ubiquitinylée de CDC25A et ainsi d'empêcher sa dégradation par le protéasome. DUB3 possède un pouvoir oncogénique puisqu'elle est capable d'induire la transformation des cellules NIH-3T3. De plus, l'extinction de son expression permet de diminuer de façon significative la croissance de xénogreffes de tumeurs de sein [Pereg *et al*, 2010].

IV.2. CDC25 et cancérogenèse

La surexpression des phosphatases CDC25 observée dans les cancers semble contribuer à la transformation des cellules, mais nécessite une association avec d'autres événements oncogéniques. En effet, l'expression ectopique de CDC25A et CDC25B (mais pas CDC25C) coopère avec l'activation de HRAS ou la perte de RB1 pour induire la transformation de fibroblastes embryonnaires de souris en culture [Galaktionov *et al*, 1995]. De même, la surexpression de CDC25A et CDC25B *in vivo* dans des souris transgéniques résulte en une hyperplasie du tissu mammaire, mais est insuffisante pour induire une tumorigenèse spontanée [Ma *et al*, 1999 ; Ray *et al*, 2007a]. Par contre, la surexpression de CDC25A dans des souris MMTV-*v-Ha-ras* ou MMTV-*c-neu* accélère la croissance tumorale et conduit à une dérégulation du cycle cellulaire et à de multiples aberrations chromosomiques [Ray *et al*, 2007a]. A l'inverse, une expression hétérozygote de CDC25A inhibe la tumorigenèse

mammaire induite par MMTV-*v-Ha-ras* ou MMTV-*c-neu* [Ray *et al*, 2007b]. Concernant CDC25B, sa surexpression augmente la susceptibilité des tissus mammaires murins à l'oncogenèse induite par le carcinogène DMBA (9,10-diméthyl-1,2-benzanthracene) [Yao *et al*, 1999]. Finalement, l'implication potentielle de CDC25C dans la tumorigenèse reste à déterminer de manière claire.

Le potentiel oncogénique des CDC25 pourrait s'expliquer par le fait qu'une surexpression de CDC25A et/ou CDC25B résulterait en une activation continue des complexes CDK/cycline, forçant ainsi les cellules à progresser dans le cycle de manière inappropriée et à contourner les points de contrôle, la conséquence finale étant une accumulation d'aberrations génétiques. Cette hypothèse est soutenue par des études montrant qu'une surexpression modérée de CDC25A et CDC25B est suffisante pour contourner les points de contrôle G₁/S et G₂/M et favorise ainsi l'instabilité génomique [Boutros *et al*, 2007a ; Bugler *et al*, 2006 ; Bugler *et al*, 2010 ; Mailand *et al*, 2002].

En raison de la surexpression des phosphatases CDC25 dans les cancers et de leur pouvoir oncogénique, ces enzymes ont émergé en tant que cibles pharmacologiques potentielles.

IV.3. CDC25 : cibles thérapeutiques potentielles dans le cancer ?

Le développement d'inhibiteurs pharmacologiques de CDC25 a connu un essor considérable ces dernières années. Parmi les composés de synthèse les plus puissants se trouvent de nombreux dérivés de quinone. Par exemple, le composé bis-quinonique IRC-083864 inhibe de manière sélective les trois isoformes de CDC25 *in vitro* avec une CI₅₀ de l'ordre de 20 nM et est également capable de limiter efficacement la prolifération de nombreuses cellules cancéreuses en culture. De plus, ce composé réduit de manière significative la croissance de xénogreffes de tumeurs pancréatique et prostatique chez la souris *nude* [Brezac *et al*, 2009]. Certaines molécules d'origine naturelle présentent également un potentiel inhibiteur de CDC25 intéressant, bien que moindre par rapport aux inhibiteurs synthétiques, telles que la vitamine D₃, la dysidiolide retrouvée dans l'éponge de mer *Dysidea etheria* ou les diallylsulfures présents dans l'ail et l'oignon [Lavecchia *et al*, 2010 ; Viry *et al*, 2010].

Une approche totalement différente a récemment été envisagée, consistant en l'activation des CDC25. En effet, il a été montré qu'une faible induction de l'expression de CDC25B permettait de contourner le point de contrôle G₂/M et ainsi de sensibiliser les cellules vis-à-vis d'un traitement génotoxique et de radiations ionisantes [Aressy *et al*, 2008]. Dans ces conditions, la cellule serait forcée à entrer en mitose catastrophique, en dépit de la présence de dommages dans l'ADN, ce qui conduirait vraisemblablement à la mort de cette cellule par apoptose. L'intérêt de cette stratégie est renforcé par le fait que la surexpression de CDC25B retrouvée dans les carcinomes de l'œsophage est corrélée à une plus grande sensibilité des patients à la radiothérapie [Miyata *et al*, 2000]. Jusqu'à présent aucune molécule capable d'activer CDC25 de manière directe n'a été décrite. Mais d'autres pistes ont été considérées comme l'inhibition des kinases CHK ou p38 contrôlant négativement l'activité de CDC25 [Boutros *et al*, 2007a].

V. ÉPISSAGE ALTERNATIF DES CDC25

Comme précédemment évoqué, les trois gènes codant les CDC25 sont soumis à un mécanisme d'épissage alternatif, qui contribue probablement à la régulation de l'activité de ces phosphatases. Avant de présenter les différents variants d'épissage de CDC25 actuellement connus et de discuter de leur implication dans les cancers, il est dans un premier temps nécessaire de présenter le processus d'épissage alternatif en lui-même, son importance dans les cancers, ainsi que dans la réponse des cellules en conditions de stress.

V.1. Principes généraux de l'épissage alternatif

V.1.1. Mécanisme d'épissage des pré-ARNm

Lors de la transcription de l'ADN, des ARN messagers immatures sont formés (pré-ARNm). La maturation des pré-ARNm consiste en une série de modifications post-transcriptionnelles comprenant l'ajout d'une coiffe de 7-méthylguanosine en 5', le clivage et la polyadénylation en 3', l'édition d'ARN, ainsi que l'épissage. Les ARNm matures ainsi formés pourront être exportés vers le cytoplasme où ils seront traduits en protéines [Hui, 2009].

L'épissage des pré-ARNm consiste en l'élimination des introns (séquences intercalaires non codantes) afin de ne garder que les séquences codantes, appelées exons, au sein de l'ARNm mature. Ce processus a été découvert en 1977 par les docteurs Richard Roberts et Phillip Sharp qui ont reçu le prix Nobel de médecine en 1993 pour ces travaux [Berget *et al*, 1977 ; Chow *et al*, 1977]. La réaction d'épissage des pré-ARNm s'effectue de manière coordonnée avec la transcription et est catalysée par un complexe macromoléculaire nommé spliceosome qui comprend cinq petites ribonucléoprotéines nucléaires riches en uridine (U snRNP – U1, U2, U4, U5 et U6) ainsi que plus de 150 facteurs d'épissage non snRNP [Corcos et Solier, 2005 ; Hui, 2009]. Le spliceosome classique (décrit ci-dessus) est requis pour l'épissage de plus de 99% des gènes transcrits par l'ARN polymérase II et obéit à la règle GU-AG. Il reconnaît d'une part le site d'épissage "donneur" en 5' de l'intron commençant par le dinucléotide GU et suivi par une séquence consensus moins conservée et d'autre part le site de branchement contenant généralement un résidu adénine et le site d'épissage "accepteur" en 3' constitué d'une région riche en pyrimidine et terminant par le dinucléotide AG (**Figure 10A**). Un second type de spliceosome, dont nous ne détaillerons pas le mécanisme, agit sur des introns de type mineur obéissant à la règle AU-AC [Srebrow et Kornblihtt, 2006 ; Blaustein *et al*, 2007].

L'assemblage du spliceosome majeur débute par la reconnaissance du site d'épissage 5' par la snRNP U1 et par la fixation de SF1 (*splicing factor 1*) au niveau du site de branchement et du facteur U2AF (*U2 auxiliary factor*) au niveau du site d'épissage 3' (**Figure 10B**). Cette première étape est indépendante de l'ATP et conduit à la formation du complexe E, qui est ensuite converti en complexe A après remplacement de SF1 par la snRNP U2 sur le site de branchement, réaction dépendante de l'ATP cette fois. Par la suite les snRNP U4/U6 et U5 sont recrutées pour former le complexe B. De nombreux changements conformationnels s'opèrent alors pour aboutir au complexe C, la forme catalytiquement active du spliceosome [Biamonti et Cáceres, 2009 ; Chen et Manley, 2009]. L'élimination des introns et la re-ligation des exons sont permises par deux réactions successives de trans-estérification [Corcos et Solier, 2005 ; Hui, 2009]. Au cours de la première, le groupement 2'-hydroxyle de l'adénosine du site de branchement attaque le phosphate du premier nucléotide de l'intron, au niveau du site d'épissage 5'. Cette réaction aboutit à la libération de l'exon en amont et à la formation d'une structure en lasso intermédiaire. Lors de la deuxième étape, le groupement 3'-hydroxyle libre de l'exon en amont attaque le 5' phosphate de l'exon en aval, au niveau du site d'épissage 3', ce qui conduit à la ligation des deux exons. Deux produits d'épissage sont

donc finalement libérés : l'ARNm épissé et l'intron sous forme de lasso qui sera ensuite dégradé ou servira de précurseur de petits ARN tels que les microARN (**Figure 10B**).

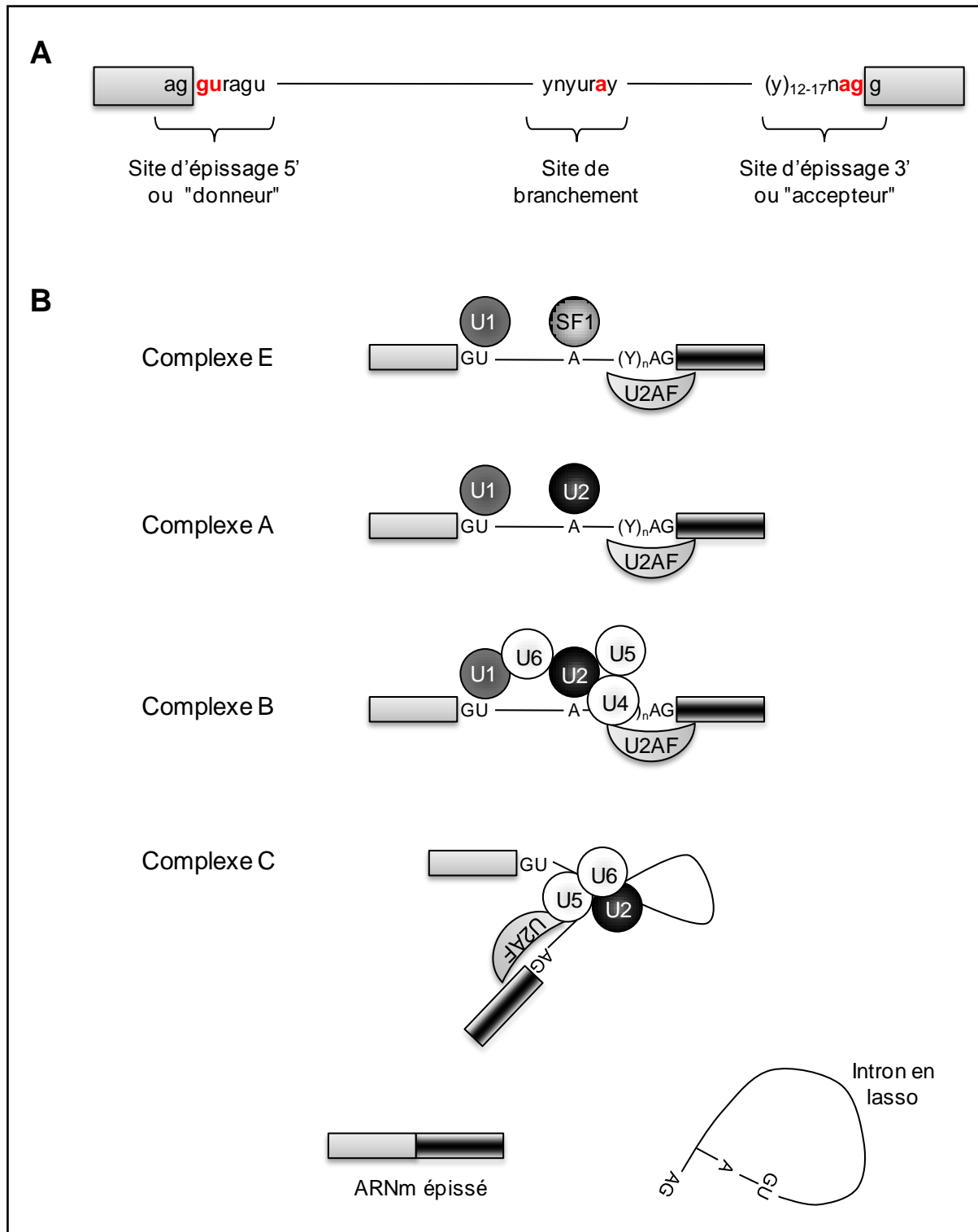


Figure 10. Epissage des pré-ARNm [adapté d'après Blaustein *et al*, 2007 ; Biamonti et Cáceres, 2009]. Les rectangles gris ou noirs représentent les exons et les traits noirs symbolisent les introns. (A) Représentation des séquences consensus au niveau du site d'épissage 5' (site donneur), du site de branchement et du site d'épissage 3' (site accepteur). (B) Représentation schématique du processus d'assemblage du spliceosome. Se référer au texte pour l'explication détaillée de ce processus.

En plus des sites d'épissage, d'autres séquences *cis*-régulatrices localisées dans les exons et les introns influencent la reconnaissance correcte des jonctions exon-intron et permettent de prévenir l'inclusion de pseudoexons dans l'ARNm. Il s'agit de courtes séquences conservées (d'environ 10 nucléotides) largement distribuées dans le génome qui peuvent, selon leur nature, activer (ESE : *exonic splicing enhancers* et ISE : *intrinsic splicing enhancers*) ou inhiber (ESS : *exonic splicing silencers* et ISS : *intrinsic splicing silencers*) la reconnaissance d'un exon par le spliceosome (**Figure 11**). Ces éléments en *cis* exercent leurs effets grâce à la fixation de facteurs d'épissage *trans*-régulateurs, dont la majorité appartient aux familles des protéines SR (*serine-arginine rich proteins*) et des protéines hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*). Les protéines SR, en se fixant sur les ESE ou les ISE, vont faciliter la reconnaissance du site d'épissage notamment en favorisant le recrutement de la snRNP U1 au niveau du site d'épissage en 3', ainsi que du complexe U2AF et de la snRNP U2 au niveau du site d'épissage en 5', ainsi que du complexe U2AF et de la snRNP U2 au niveau du site d'épissage en 3' par interaction directe avec ces protéines [Chen et Manley, 2009]. A l'inverse, les protéines hnRNP, recrutées au niveau des ESS ou des ISS, vont généralement inhiber la reconnaissance des sites d'épissage par différents moyens. D'une part, la fixation des hnRNP peut, par le biais d'un encombrement stérique, bloquer l'accès des U snRNP et des protéines SR. D'autre part, un autre modèle propose que des protéines hnRNP fixées sur des ISS présents de part et d'autre d'un exon peuvent dans certains cas interagir entre-elles et former une structure secondaire en forme de boucle, empêchant ainsi l'accès du spliceosome et l'épissage de cet exon [Chen et Manley, 2009 ; Revil *et al*, 2006]. Outre leur rôle dans le contrôle de l'épissage constitutif, ces éléments *cis*- et *trans*-régulateurs s'avèrent particulièrement importants dans la sélection de certains sites d'épissage au cours du processus d'épissage alternatif.

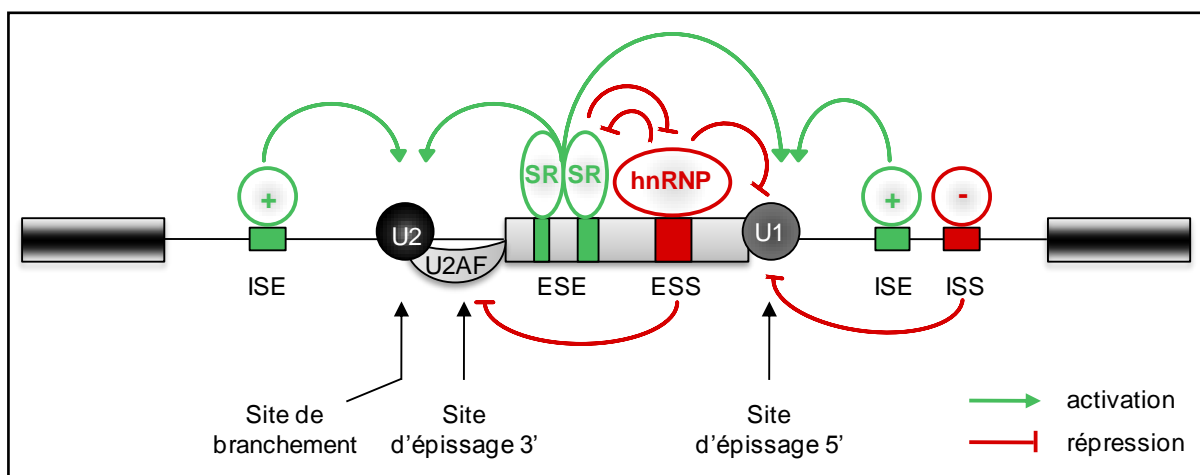


Figure 11. Contrôle de l'épissage par l'action combinée de séquences *cis*-régulatrices et de facteurs d'épissage *trans*-régulateurs.

V.1.2. Contrôle de l'épissage alternatif

L'épissage alternatif est un mécanisme fondamental de la modulation de l'expression des gènes. Il consiste en l'inclusion régulée et sélective de certains exons dans les ARNm et permet ainsi de produire diverses protéines avec une structure et une fonction différentes à partir d'un seul gène. Ce mécanisme permet donc d'expliquer comment une si grande variété de protéines peut être générée chez les Mammifères à partir d'un nombre relativement limité de gènes. De récentes études de séquençage des transcriptomes de différents tissus ont révélé que plus de 90% des gènes humains subissent au moins un événement d'épissage alternatif [Pan *et al*, 2008 ; Wang *et al*, 2008b], ce qui confère à ce processus le statut de règle et non plus d'exception comme initialement envisagé. L'épissage alternatif dépend fortement du tissu et du stade de développement considérés. Par ailleurs, il peut être régulé dans certaines conditions pathologiques ou en réponse à un stress cellulaire (cf. V.2. et V.3.). Cinq profils distincts d'épissage alternatif ont été observés et sont illustrés sur la **Figure 12**. En outre, l'utilisation de promoteurs ou de sites de polyadénylation alternatifs augmente la diversité des ARNm produits et peut éventuellement être source d'épissage alternatif. Dans certains cas, les événements d'épissage alternatif induisent l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'ARNm qui est généralement dégradé par le système de dégradation des ARNm non-sens (NMD, *nonsense-mediated decay*) afin d'empêcher la production d'une protéine tronquée, potentiellement délétère pour la cellule [Gardner, 2010].

L'épissage alternatif concerne essentiellement des sites d'épissage dits "faibles" dont la séquence s'éloigne de la séquence consensus, diminuant ainsi l'affinité du spliceosome pour ces sites. Dans ce contexte, la décision d'inclure ou non un exon alternatif dans l'ARNm dépend principalement de l'action combinée des éléments *cis*-régulateurs et des facteurs d'épissage *trans*-régulateurs précédemment évoqués (cf. V.1.1). Néanmoins, de récentes études suggèrent que la régulation du processus d'épissage peut également être influencée par la transcription et par certaines modifications épigénétiques. De plus, la structure secondaire de l'ARNm joue un rôle important car elle peut masquer ou au contraire exposer certains sites. Par exemple, un exon pris dans une structure en épingle à cheveux n'est en principe pas épissé [Chen et Manley, 2009 ; Hui, 2009].

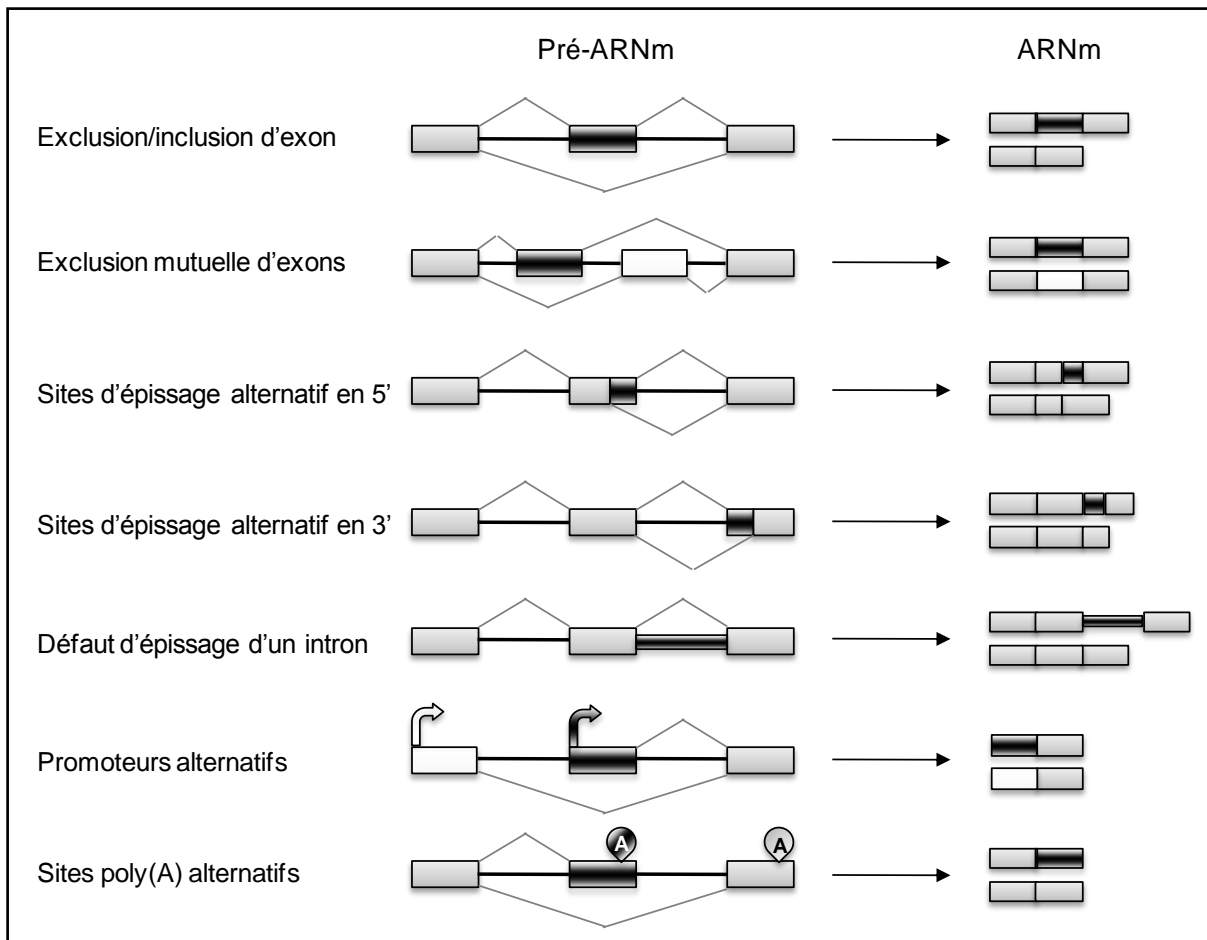


Figure 12. Représentation des différents types d'épissage alternatif [adaptée de Blaustein *et al*, 2007 ; Corcos et Solier, 2005]. Les exons constitutifs sont représentés par des rectangles gris clairs, les exons alternatifs par des rectangles noirs ou blancs et les introns par des traits pleins. Différentes combinaisons sont possibles pour l'assemblage des exons, voire la rétention d'un intron. L'utilisation de promoteurs ou de sites poly(A) alternatifs représente un mécanisme supplémentaire conduisant à la diversité des ARNm, qui peut éventuellement dicter les choix d'épissage, bien que ce processus soit mécaniquement différent de celui d'épissage alternatif à proprement parlé.

a. Contrôle de l'épissage alternatif par compétition entre les facteurs d'épissage activateurs et inhibiteurs

L'utilisation des sites d'épissage alternatifs dépend, dans la majorité des cas, de la fixation d'éléments *trans*-régulateurs sur des séquences *cis*-régulatrices (**Figure 11**). Elle est plus précisément dictée par l'abondance relative des facteurs d'épissage antagonistes SR et hnRNP dans le noyau. Un exemple de cet antagonisme est illustré par les niveaux d'expression de la protéine SR SF2/ASF et de hnRNP A1 : une expression élevée de SF2/ASF induit l'inclusion de l'exon alternatif, tandis que des niveaux élevés de hnRNP A1 conduisent à l'exclusion de cet exon [Ghigna *et al*, 2008]. Dans certains cas, l'épissage alternatif est contrôlé par l'expression de facteurs d'épissage tissu-spécifiques. C'est le cas par exemple du

facteur NOVA1 qui est exprimé uniquement dans les cellules neuronales [Chen et Manley, 2009]. De manière intéressante, l'activation de voies de signalisation, observée dans certaines pathologies ou en réponse à un stress cellulaire, peut contrôler les décisions d'épissage en phosphorylant des facteurs d'épissage et en modifiant leur activité, leur capacité d'interaction avec l'ARN ou d'autres protéines ou encore leur localisation subcellulaire [Hui, 2009].

b. Couplage entre la transcription et l'épissage alternatif

Chez les Mammifères, la transcription et la maturation des pré-ARNm se produisent de manière coordonnée dans le temps et l'espace. De plus, il existe un couplage fonctionnel entre le processus de transcription et l'épissage alternatif. Deux modèles, non exclusifs, ont été décrits pour expliquer la régulation de l'épissage par la machinerie transcriptionnelle [Cáceres et Kornblihtt, 2002 ; Chen et Manley, 2009]. Le premier modèle, ou modèle cinétique, suggère que la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II influence l'inclusion des exons alternatifs. Lorsque l'élongation est rapide, un site d'épissage faible (alternatif) est disponible en même temps qu'un site d'épissage fort (constitutif) présent en aval avec lequel il va entrer en compétition pour le recrutement du spliceosome. Cette compétition conduit à l'exclusion de l'exon le plus faible. A l'inverse, lorsque la vitesse d'élongation diminue ou que l'ARN polymérase II marque un temps d'arrêt, la machinerie d'épissage a tendance à être recrutée sur le premier exon transcrit, même si il est faible, ce qui aboutit à l'incorporation de cet exon alternatif. Selon le deuxième modèle, ou modèle de recrutement, certains facteurs de transcription ainsi que le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II sont capables d'interagir, directement ou indirectement, avec des facteurs d'épissage, modulant ainsi l'efficacité de l'épissage.

c. Régulation de l'épissage alternatif par des modifications épigénétiques

La conformation de la chromatine représente un aspect important dans la régulation de l'épissage. En effet, la compaction de la chromatine peut empêcher l'accès du spliceosome au niveau des sites d'épissage. Par ailleurs, certaines modifications des histones induisent la fixation d'une protéine adaptatrice, recrutant à son tour certains facteurs d'épissage. Par exemple, la triméthylation de la lysine 36 de l'histone 3 interagit avec la protéine adaptatrice MRG15 qui permet le recrutement du facteur d'épissage PTB, inhibiteur de l'épissage. A

l'inverse, en cas d'hyperméthylation de l'histone 3, la protéine adaptatrice ne se fixe pas, favorisant l'inclusion de l'exon [Luco *et al*, 2011].

Enfin, il a été montré que pas moins de 50% des mutations responsables de maladies génétiques affectent le processus d'épissage [López-Bigas *et al*, 2005]. Ces mutations, qui peuvent être silencieuses au niveau traductionnel, peuvent créer ou altérer des sites d'épissage ou des séquences *cis*-régulatrices, modifier la structure secondaire du pré-ARNm, changer la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II ou encore affecter l'expression de facteurs d'épissage. Toutes ces modifications aboutissent soit à un épissage dit "aberrant" c'est-à-dire à la production de nouveaux variants associés à la maladie qui ne sont pas retrouvés dans les tissus normaux, soit à un épissage "anormal" qui correspond à une altération du rapport entre les transcrits normalement existants. De nombreuses maladies sont concernées comme la neurofibromatose de type 1, la fibrose kystique ou encore le cancer [pour des revues voir Cáceres et Kornblihtt, 2002 ; Corcos et Solier, 2005 ; Tazi *et al*, 2009 ; Ward et Cooper, 2010].

V.2. Épissage alternatif et cancer

V.2.1. Altération de l'épissage alternatif de nombreux gènes dans les cancers

Le développement de méthodes d'analyse à grande échelle, comme les biopuces utilisant des sondes reconnaissant les exons ou les jonctions exon-exon ou plus récemment les analyses de séquençage des transcriptomes haut débit, a permis l'identification et la caractérisation de très nombreux variants d'épissage associés au cancer. Plusieurs revues fournissent une liste des principaux gènes dont l'altération d'épissage est liée au cancer [Brinkman, 2004 ; David et Manley, 2010 ; Srebrow et Kornblihtt, 2006]. Nous présenterons uniquement quelques exemples de modifications d'épissage associées au cancer du sein. Deux mécanismes principaux sont à l'origine de cet épissage alternatif aberrant, à savoir des mutations en *cis* au niveau de sites d'épissage ou d'éléments régulateurs et des changements affectant les éléments *trans*-régulateurs de la machinerie d'épissage.

Un exemple bien connu de mutation *cis* concerne le gène *BRCA1*, un marqueur de prédisposition aux cancers du sein et de l'ovaire. En effet, une mutation ponctuelle héréditaire

affectant un site de fixation du facteur d'épissage ASF/SF2 dans l'exon 18 provoque l'exclusion de cet exon [Mazoyer *et al*, 1998].

Par ailleurs, de nombreuses évidences indiquent que la machinerie d'épissage est altérée dans les cancers. Par exemple, certains facteurs d'épissage de la famille des protéines SR comme SRp40, SRp55 ou TRA2-b1 sont surexprimés dans le cancer du sein [Dutertre *et al*, 2010b]. Dans ce contexte, les modifications d'épissage du gène *CD44* observées au cours de la progression du cancer mammaire chez la souris sont liées à des changements dans les concentrations relatives de certaines protéines SR [Pajares *et al*, 2007]. A l'inverse, la diminution d'expression du facteur d'épissage FOX2 retrouvée dans les cancers du sein et de l'ovaire est associée à bon nombre d'événements d'épissage aberrants [Venables *et al*, 2009]. De plus, plusieurs voies de signalisation, potentiellement perturbées dans les cancers, contrôlent l'activité ou la distribution subcellulaire des facteurs d'épissage. Par exemple, la protéine kinase SRPK1 responsable de la phosphorylation de protéines SR est surexprimée dans le cancer du sein [Dutertre *et al*, 2010b]. D'autres protéines sont capables de réguler l'activité de facteurs d'épissage comme les kinases ERK, GSK3, ATM/ATR ou les phosphatases PP1, PP2A [Dutertre *et al*, 2010b ; Matsuoka *et al*, 2007]. Enfin, d'autres facteurs sont à prendre en considération comme l'altération de la machinerie de transcription et les modifications épigénétiques observées dans les cancers qui pourraient également avoir un impact sur la régulation de l'épissage (cf. V.1.2 a et b).

Malgré les nombreux exemples de modifications de l'épissage observés dans les cancers, il est difficile de déterminer si ces nouveaux profils d'épissage constituent un "bruit de fond" et sont simplement liés aux très nombreuses altérations moléculaires rencontrées dans les cancers ou s'ils sont directement impliqués dans la tumorigenèse et la progression tumorale [Dutertre *et al*, 2010b ; Skotheim et Nees, 2007]. Toutefois, les cellules cancéreuses semblent tirer un certain avantage de ces altérations d'épissage puisqu'elles peuvent affecter des gènes impliqués dans des processus cellulaires majeurs comme l'apoptose, la prolifération cellulaire ou l'angiogenèse. En effet, la plupart des gènes impliqués dans l'apoptose génèrent à la fois des isoformes pro- et anti-apoptotiques issues d'épissage alternatif. Dans ce contexte, il a été montré que l'expression du variant d'épissage survivine-2B, possédant des propriétés pro-apoptotiques contrairement à la survivine, est réprimée dans le cancer du sein de stade avancé, indiquant un rôle potentiellement défavorable de ce variant dans la progression tumorale [Vegran *et al*, 2005]. Certains gènes impliqués dans la prolifération cellulaire sont également concernés par les altérations d'épissage observées dans les cancers. Par exemple, le gène de la

cycline D1, un régulateur du cycle cellulaire, produit deux variants d'épissage : *D1a* et *D1b*. Le variant *D1b* conduit à une protéine exclusivement nucléaire qui présente un potentiel oncogénique plus élevé que *D1a*. De manière intéressante, ce variant est surexprimé dans le cancer du sein [David et Manley, 2010]. Enfin, le processus d'épissage du VEGF, qui permet de produire des isoformes pro-angiogéniques ou anti-angiogéniques, est dérégulé dans les cancers. De même, l'épissage du gène codant le récepteur au VEGF (VEGFR1) est altéré dans le cancer du sein et aboutit à la production d'un récepteur soluble [Dutertre *et al*, 2010b].

V.2.2. Valeur pronostique des variants d'épissage et nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses

La découverte de variants d'épissage spécifiques du cancer a rapidement suscité un intérêt pour leur potentielle utilisation en tant que biomarqueurs. En théorie, une forme d'épissage retrouvée exclusivement dans les tissus tumoraux pourrait représenter un biomarqueur diagnostique, pronostique ou prédictif intéressant, à condition bien sûr que des méthodes de détection suffisamment sensibles et spécifiques soient disponibles [Pajares *et al*, 2007]. En utilisant un système de RT-PCR haut débit, Venables *et al* ont analysés les profils d'épissage alternatif de 600 gènes associés au cancer et ont ainsi identifié 41 événements d'épissage significativement différents entre les tissus de sein normaux et tumoraux. Cinq d'entre eux ont également permis une classification des tumeurs selon leur grade histopathologique [Venables *et al*, 2008]. D'autres études ont montré une association entre l'expression différentielle de certains variants d'épissage et la progression tumorale. Par exemple, l'expression de transcrits aberrants de *MDM2*, un régulateur négatif de p53, est corrélée à une survie globale plus courte pour les patientes atteintes d'un cancer du sein [Lukas *et al*, 2001]. De même, la surexpression du variant *cycline D1b* observée dans le cancer du sein confère une résistance aux traitements thérapeutiques et est associée à un mauvais pronostic pour les patientes [Millar *et al*, 2009 ; Wang *et al*, 2008a]. Un autre exemple concerne le gène *CD44*, codant une protéine transmembranaire impliquée dans l'adhésion cellule-cellule. La surexpression du variant *CD44v6* est retrouvée dans les cancers gastriques de haut grade et est associée à une diminution du taux de survie. Par ailleurs, l'expression du variant *CD44v10* permet de faire la distinction entre les cancers pancréatiques métastatiques et non métastatiques [Brinkman, 2004]. Fait intéressant, des variants aberrants de *CD44* ont été retrouvés dans le sang de patients atteints d'un cancer, ce qui pourrait permettre la mise en place d'analyses cliniques de routine peu invasives [Pajares *et al*, 2007].

L'intérêt des variants d'épissage comme marqueurs tumoraux potentiels a en même temps fait émerger de nouvelles perspectives thérapeutiques basées sur le ciblage de l'épissage (**Figure 13**). Une des stratégies consiste en l'utilisation d'oligonucléotides synthétiquement modifiés qui sont capables d'empêcher la reconnaissance de sites d'épissage ou de séquences *cis*-régulatrices spécifiques, limitant ainsi la génération du variant d'épissage associé au cancer (**Figure 13A**). Cette approche a par exemple été utilisée avec succès pour modifier le rapport entre les protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques produites par le gène *Bcl-x* et sensibiliser des cellules cancéreuses à l'apoptose induite par un traitement chimiothérapeutique [Dutertre *et al*, 2010b]. Une autre stratégie utilise le mécanisme d'ARN

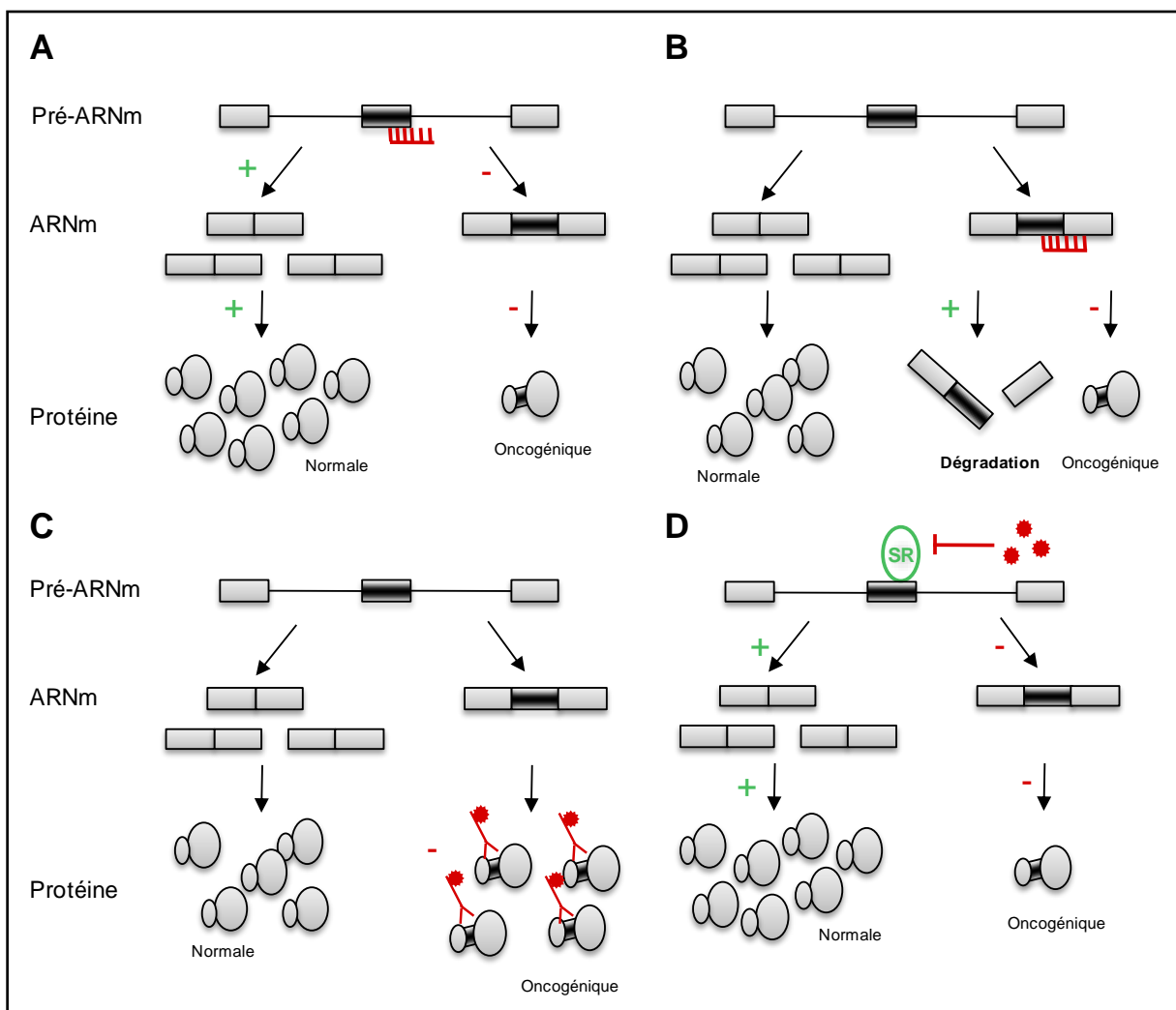


Figure 13. Stratégies de traitements anticancéreux basés sur le ciblage de l'épissage [adaptées de Pajares *et al*, 2007 ; Ghigna *et al*, 2008]. (A) Blocage de sites d'épissage ou régulateurs spécifiques par des oligonucléotides antisens synthétiques qui favorisent la production de la protéine normale aux dépens de la protéine oncogénique. (B) Élimination d'un transcrite potentiellement oncogénique, possédant des séquences uniques, par ARN interférence. (C) Ciblage des épitopes spécifiques de la protéine associée au cancer par des anticorps monoclonaux éventuellement conjugués à une toxine. (D) Inhibition des protéines kinases phosphorylant des protéines SR par des molécules pharmacologiques.

interférence qui induit la dégradation de l'ARNm oncogénique après fixation du siRNA sur une séquence unique (**Figure 13B**). Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps dirigés contre un épitope présent uniquement dans l'isoforme protéique associée au cancer représente un outil thérapeutique prometteur (**Figure 13C**). Des anticorps radiomarqués ciblant le variant *CD44v6* sont actuellement en essais cliniques pour le traitement du cancer de la tête et du cou [Borjesson *et al*, 2003]. Finalement, il est également possible d'envisager de corriger l'épissage de certains gènes en agissant sur les protéines kinases responsables de la phosphorylation de facteurs d'épissage de la famille des protéines SR (**Figure 13D**). Le développement de petites molécules pouvant inhiber la protéine kinase SRPK1 est actuellement à l'étude [Ghigna *et al*, 2008].

V.3. Régulation de l'épissage alternatif en conditions de stress cellulaire

L'épissage alternatif de nombreux gènes est modulé en conditions de stress cellulaire tel qu'un stress oxydant, un choc thermique ou une hypoxie [Biamonti et Cáceres, 2009]. En particulier, bon nombre d'études récentes ont mis en lumière le rôle crucial de l'épissage alternatif en réponse à un stress génotoxique [Busà et Sette, 2010]. La régulation globale du processus d'épissage alternatif permet probablement aux cellules cancéreuses de s'adapter à un environnement hostile, grâce à la production de transcrits spécifiques. De manière intéressante, les irradiations ou les molécules chimiothérapeutiques générant des dommages à l'ADN affectent l'épissage de gènes impliqués dans des processus majeurs comme l'apoptose (*caspase 2*, *Bcl-x*, *FAS*) [Solier *et al*, 2004 ; Shkreta *et al*, 2010 ; Filippov *et al*, 2008], la motilité cellulaire (*CD44*) [Filippov *et al*, 2007] ou le contrôle du cycle cellulaire (*cyclin D1*, *MDM2* and *MDM4*) [Wang *et al*, 2008a; Lents *et al*, 2008; Chandler *et al*, 2006].

Les cellules cancéreuses ont développé différents mécanismes pour modifier les profils d'épissage alternatif en réponse aux dommages à l'ADN. Selon la nature et l'intensité du stress génotoxique, les cellules induisent différentes voies de signalisation capables de phosphoryler des facteurs d'épissage et de changer ainsi leur activité et leur distribution cellulaire. Par exemple, Busá *et al* ont montré qu'un stress génotoxique, induit par un traitement à la mitoxantrone, provoquait la relocalisation de facteurs d'épissage tels que Sam68, hnRNP A1 ou ASF/SF2 au niveau de granules nucléaires, régulant ainsi le processus d'épissage [Busá *et al*, 2010]. De plus, le traitement des cellules par l'agent génotoxique

mitomycine C induit l'expression du facteur d'épissage SRp55 et consécutivement l'altération des profils d'épissage des gènes codant le récepteur CD44, la cytokine mda7/IL24 et les kinases KSR1 et ZAK [Filipov *et al*, 2007 ; 2008]. Par ailleurs, il a également été proposé que les dommages à l'ADN modifient la machinerie transcriptionnelle. Par exemple, les irradiations UV affectent l'épissage alternatif co-transcriptionnel du gène *Bcl-x* du fait d'une hyperphosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase, qui conduit à une diminution de la vitesse d'élongation et à l'exclusion de certains exons [Muñoz *et al*, 2009]. Une autre équipe a montré que des agents génotoxiques, notamment l'inhibiteur de topoisomérase I camptothécine, étaient capables d'altérer le couplage existant entre la machinerie transcriptionnelle et la machinerie d'épissage, résultant ainsi en l'exclusion de plusieurs exons dans le pré-ARNm *MDM2* [Dutertre *et al*, 2010a]. Enfin, de récentes études suggèrent que les changements des profils d'épissage observés en réponse aux dommages à l'ADN pourraient être en partie liés à des modifications épigénétiques des histones [Busà et Sette, 2010]. En effet, un stress génotoxique engendré par la camptothécine augmente l'acétylation de la chromatine et modifie l'épissage au niveau du locus *HIF1A* dans des cellules cancéreuses [Baranello *et al*, 2010].

La conséquence des modifications d'épissage sur la survie des cellules cancéreuses en réponse à un stress génotoxique varie selon les gènes considérés. La principale réponse à des agents cytotoxiques ou à des irradiations consiste en l'activation des voies de mort cellulaire. Dans ce contexte, l'altération de l'épissage observée en réponse aux dommages à l'ADN favorise souvent la génération d'isoformes pro-apoptotiques. C'est le cas par exemple pour l'augmentation de la proportion du transcrit court de *Bcl-x* en réponse à une exposition aux UV ou pour la surexpression du variant *survivine-2B* après un traitement par la doxorubicine [Muñoz *et al*, 2009 ; Zhu *et al*, 2004]. Cependant, ces effets pro-apoptotiques peuvent être en partie atténués par l'induction simultanée de mécanismes protecteurs. En effet, la modulation d'épissage du pré-ARNm *caspase-2* en réponse à des inhibiteurs de topoisomérase conduit à une régulation positive du transcrit court, anti-apoptotique, de la caspase-2 [Solier *et al*, 2004]. De même, la modification du profil d'épissage du gène codant le récepteur FAS, induite par la mitomycine C, résulte en un enrichissement de l'isoforme soluble, anti-apoptotique, de FAS [Filippov *et al*, 2008].

V.4. Les différents variants d'épissage des CDC25

Comme évoqué précédemment, les phosphatases CDC25 sont représentées, chez l'Homme, par trois isoformes codées par des gènes différents : *CDC25A*, *CDC25B* et *CDC25C*, localisés respectivement sur les chromosomes 3p21, 20p13 et 5q31. Chacun de ces gènes est soumis à de multiples événements d'épissage alternatif (introns suivant la règle classique GU-AG) au niveau du domaine de régulation N-terminal, conduisant à la production de différents variants. Ces variants d'épissage possèdent très probablement des fonctions distinctes du fait de la présence ou non de certains sites de régulation. Par ailleurs, certains variants pourraient avoir un rôle préférentiel dans l'oncogenèse et le développement du cancer, comme cela a été rapporté ci-dessus pour d'autres gènes. Nous avons tenté d'établir un lien entre la présence différentielle de certains motifs de régulation dans les diverses isoformes protéiques de CDC25 et les données provenant des quelques études s'étant intéressées aux fonctions spécifiques et à l'implication des différents variants d'épissage de CDC25 dans les cancers. Pour cela, les séquences des ARNm et des protéines des différents variants d'épissage ont été recherchées sur plusieurs bases de données [GenBank ; Ensembl Genome Browser ; Fast-DB, de la Grange *et al*, 2005] et alignées [Multalin, Corpet, 1988]. Ensuite, les sites de régulation potentiels au sein des différentes protéines ont été identifiés à l'aide des données de la littérature et d'un logiciel de recherche de motifs [ELM-Functional Sites in Proteins].

V.4.1. CDC25A

Le gène *CDC25A* est composé de 15 exons et génère deux variants d'épissage connus à ce jour [Wegener *et al*, 2000] : *CDC25A1* (n° d'accension GenBank : NM_001789, Ensembl : ENST00000302506) et *CDC25A2* (NM_201567, ENST00000351231). Le transcrit alternatif *CDC25A2* diffère du transcrit constitutif *CDC25A1* par l'exclusion de l'exon 6 (**Figure 14**).

Bien que l'activité catalytique soit maintenue pour les deux isoenzymes, la disparition de certains sites de régulation au niveau de la protéine CDC25A2 pourrait modifier son activité (**Figure 14C**). L'exon 6 possède deux sites potentiels de phosphorylation par la kinase CaMKII dont la fonctionnalité et la conséquence sur l'activité de CDC25A1 ne sont pas connues. De pareils sites ont également été identifiés dans CDC25C. Néanmoins, leur rôle reste ambigu puisque Patel *et al* ont montré que la phosphorylation de CDC25C par CaMKII augmente l'activité phosphatase *in vitro*, tandis que Hutchins *et al* ont observé une inhibition

de la CDC25C de Xénope après phosphorylation de la Ser287 par CaMKII [Hutchins *et al*, 2003 ; Patel *et al*, 1999]. De plus, deux sites de régulation négative sont présents dans l'exon 6 : le motif D-*box* permettant le recrutement du complexe APC/C^{Cdh1} ubiquitine ligase et la dégradation successive de la protéine par le protéasome en sortie de mitose [Donzelli *et al*, 2002] et la Ser178 qui peut être phosphorylée de manière constitutive durant l'interphase par la kinase CHK1 ou en réponse à des dommages dans l'ADN par CHK1 et CHK2, cette phosphorylation conduisant à la séquestration de la protéine dans le cytoplasme [Chen *et al*, 2003]. L'absence de ces motifs pourrait augmenter la stabilité et la localisation nucléaire de la protéine CDC25A2 et ainsi lui conférer un pouvoir oncogénique supérieur à celui de CDC25A1. Cependant, l'implication de l'isoforme CDC25A2 dans les cancers n'a jusqu'à présent jamais été déterminée.

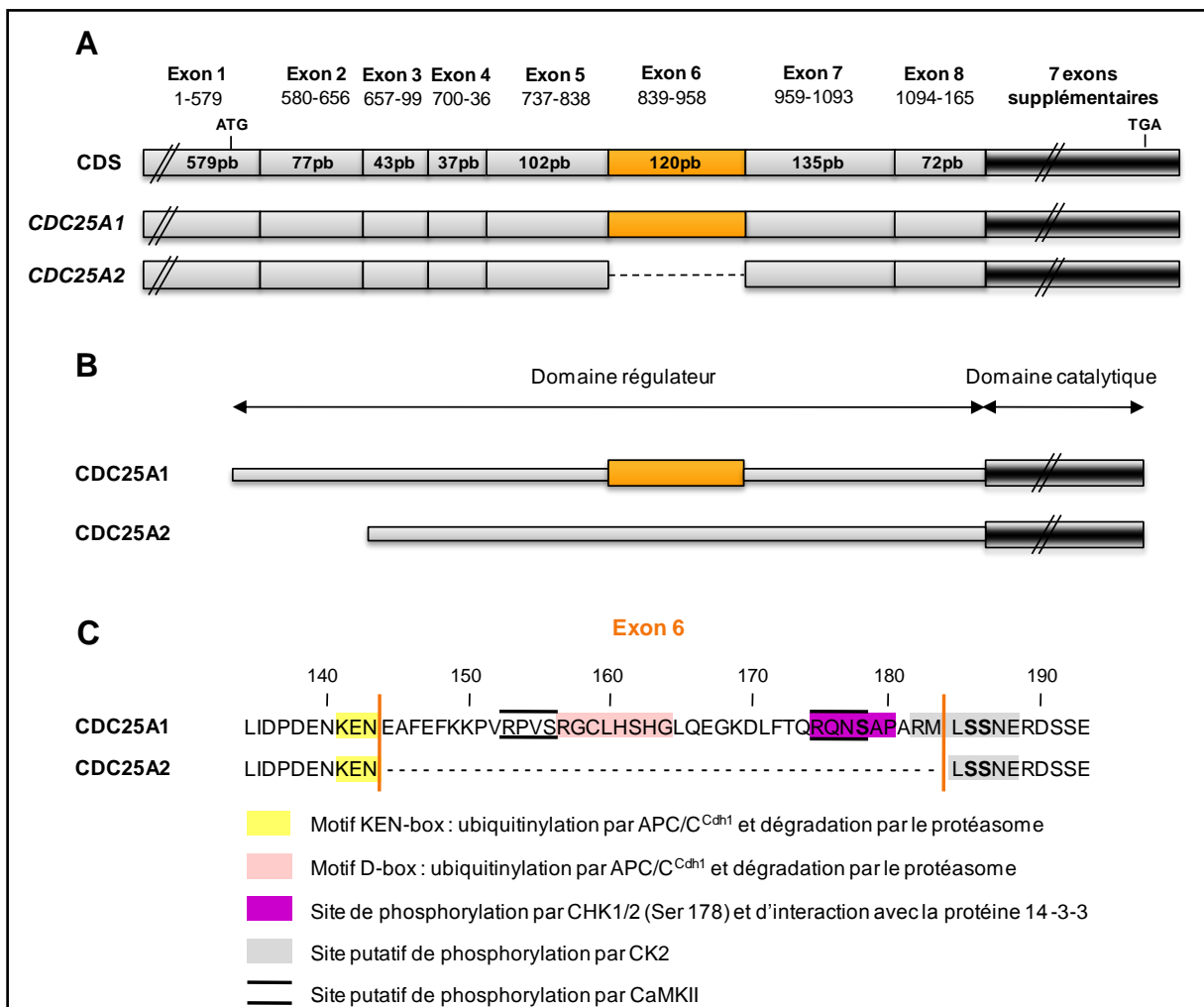
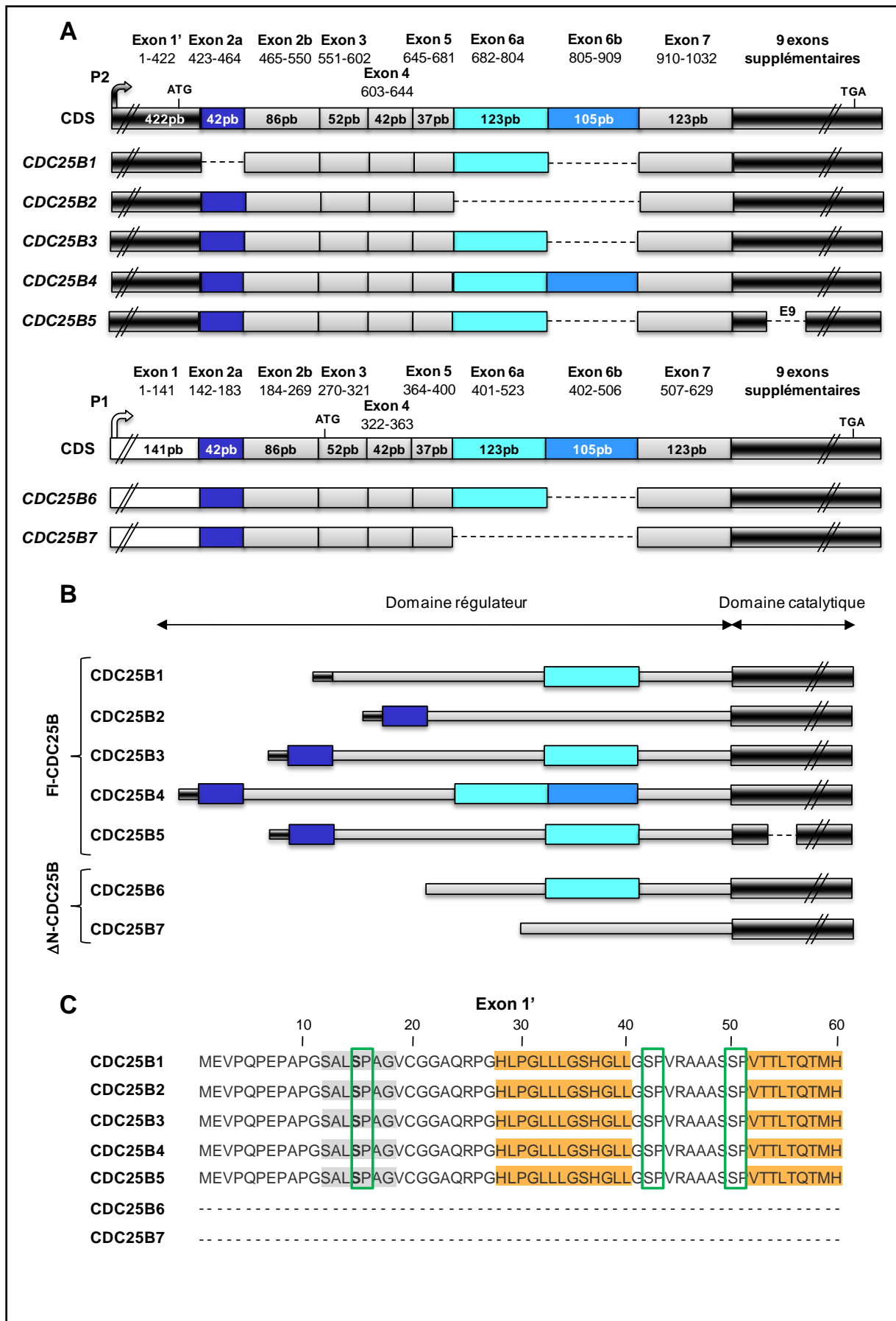


Figure 14. Représentation schématique des variants d'épissage de CDC25A. (A) La séquence codante (CDS) est représentée au-dessus des ARNm des différents variants. Le rectangle orange correspond à l'exon épissé alternativement (exon 6). ATG : codon d'initiation de la traduction ; TGA : codon stop. (B) Représentation de la séquence protéique de chaque isoforme. (C) Localisation des sites de régulation majeurs au sein de l'exon soumis à épissage alternatif (exon 6).

V.4.2. CDC25B

Sept variants d'épissage ont actuellement été identifiés pour le gène *CDC25B* et sont divisés en deux classes distinctes selon le promoteur transcriptionnel utilisé (**Figure 15A et B**). Les premiers variants à avoir été identifiés sont issus de l'utilisation du promoteur P2 et appartiennent au groupe "Fl-CDC25B" (*full-length CDC25B*): *CDC25B1* (NM_004358.3, ENST00000439880), *B2* (NM_021872.2, ENST00000340833), *B3* (NM_021873.2, ENST00000245960), *B4* (AF036233, ENST00000379598) et *B5* (AA349952, ENST00000344256) [Baldin *et al*, 1997b ; Forrest *et al*, 1999]. Deux autres variants ont été découverts très récemment : *CDC25B6* (FR695900) et *B7* (FR695901) désignés, par opposition, comme " Δ N-CDC25B" (*CDC25B* tronquées dans la partie N-terminale) [Jullien *et al*, 2011]. En effet, ces transcrits sont issus de l'usage du promoteur P1 qui entraîne la perte du codon ATG conventionnel par épissage du premier intron, déplaçant ainsi l'initiation de la traduction jusqu'à la méthionine-113 de l'exon 3 et générant des formes protéiques tronquées de *CDC25B* au niveau N-terminal (**Figure 15B**). Les isoformes Δ N-CDC25B présentent des propriétés tout à fait particulières par rapport aux Fl-CDC25B, puisqu'elles sont localisées exclusivement au niveau nucléaire du fait de l'absence des deux motifs d'export nucléaire (**Figure 15C**) [Jullien *et al*, 2011]. De plus, elles semblent moins sujettes à la dégradation par le protéasome que les formes longues, peut-être en partie à cause de l'absence du motif *D-box*, cible de l'ubiquitinylation par le complexe APC/C^{Cdh1}. Par ailleurs, Jullien *et al* ont montré que ces isoformes possèdent des fonctions bien spécifiques et non redondantes par rapport aux isoformes classiques de *CDC25B* étant donné qu'elles n'interviennent pas dans l'activation des complexes CDK1/cycline B en conditions normales, mais apparaissent essentielles pour la reprise du cycle cellulaire après un blocage en phase G₂/M induit par des dommages à l'ADN [Jullien *et al*, 2011].

Des disparités existent également au sein de la classe des Fl-CDC25B. Le variant d'épissage majoritaire dans les cellules humaines est *CDC25B3* [Baldin *et al*, 1997b ; Forrest *et al*, 1999 ; Guo *et al*, 2004]. Pour le transcrit *CDC25B1*, l'utilisation d'un site d'épissage alternatif en 3' engendre l'exclusion d'une séquence de 42 pb nommée exon 2a (**Figure 15A**). Le variant *CDC25B2*, quant à lui, provient de l'exclusion de l'exon 6a. L'ARNm *CDC25B4* possède une séquence supplémentaire de 105 pb (exon 6b) par rapport à *CDC25B3*, provenant de l'utilisation d'un site d'épissage alternatif en 3', tandis que l'ARNm *CDC25B5* est dépourvu de l'exon 9. La présence de ces deux derniers variants n'a été montrée que dans une



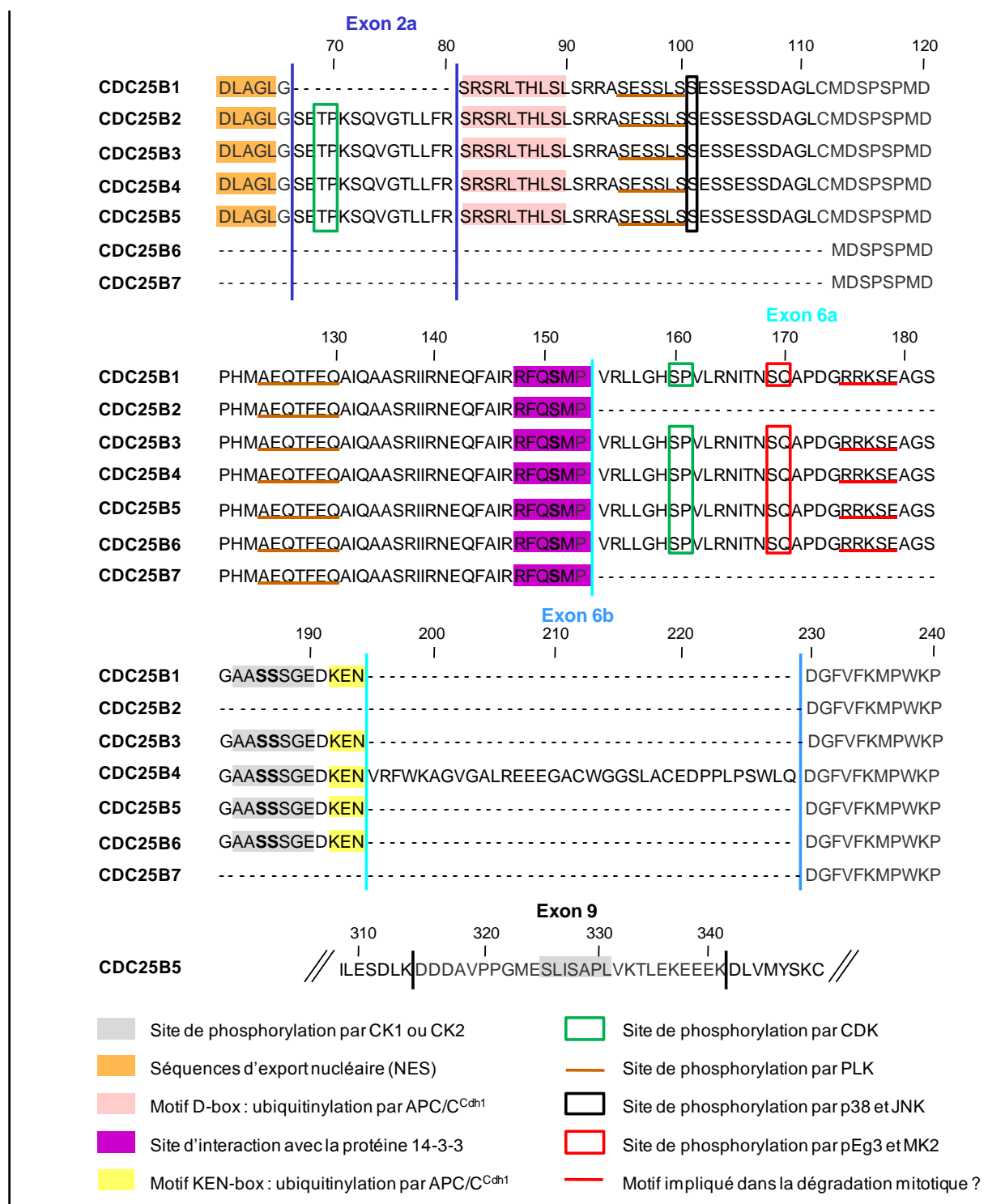


Figure 15. Représentation schématique des variants d'épissage de CDC25B. (A) La séquence codante (CDS) est représentée au-dessus des ARNm des différents variants. Les rectangles de couleur correspondent aux exons épissés alternativement. ATG : codon d'initiation de la traduction ; TGA : codon stop. Les transcrits *CDC25B1*, *B2*, *B3*, *B4* et *B5* sont issus de l'utilisation du promoteur P2 (Fl-CDC25B, full-length CDC25B), tandis que les transcrits *B6* et *B7* proviennent de l'utilisation du promoteur P1 (Δ N-CDC25B, CDC25B tronquées au niveau de la partie N-terminale). (B) Représentation de la séquence protéique de chaque isoforme. (C) Localisation des sites de régulation majeurs au sein des exons soumis à épissage alternatif (exons 2a, 6a, 6b et 9).

seule étude et leur fonction reste inconnue [Forrest *et al*, 1999]. Nous nous focaliserons donc sur les propriétés spécifiques des isoformes CDC25B1 à B3. Ces trois isoformes sont capables de remplacer l'activité phosphatase de la CDC25 de *S. pombe*, bien que le variant CDC25B2 s'avère bien plus actif dans ces conditions pour induire la mitose (B2>B3>B1) [Baldin *et al*, 1997b ; Lemaire *et al*, 2004]. Cette activité accrue de CDC25B2 pourrait en partie être expliquée par une plus grande stabilité de cette isoforme, due à l'absence des motifs RRKSE et KEN impliqués dans la dégradation mitotique de CDC25B (**Figure 15C**) [Kieffer *et al*, 2007] et également par la disparition d'un site de régulation négative ciblé par la kinase pEg3 [Davezac *et al*, 2002]. *A contrario*, l'activité moindre de CDC25B1 pourrait être liée à la disparition d'un site de phosphorylation par CDK1 (Thr69). Le rôle précis de chaque isoforme de CDC25B au cours de la transition G₂/M reste encore assez flou, mais il apparaît évident que chacune d'elles possède ses propres particularités, notamment en terme de localisation subcellulaire. L'isoforme CDC25B3 semble avoir une distribution homogène au sein de la cellule, indépendamment de la phase du cycle cellulaire considérée, alors que CDC25B2 est majoritairement cytoplasmique pendant la phase G₁ et migre progressivement vers le noyau lorsque les cellules passent de la phase S à la transition G₂/M [Woo *et al*, 1999]. Quant à CDC25B1, Baldin *et al* ont démontré que la localisation nucléaire de cette isoforme était requise pour l'induction de la mitose [Baldin *et al*, 2002]. Ces observations permettent de proposer un modèle hypothétique dans lequel CDC25B3 serait responsable de l'activation initiale en G₂/M des complexes CDK1/cycline B au niveau des centrosomes, qui serait alors suivie par l'activation complète des complexes CDK1/cycline B nucléaires par CDC25B1 et B2 au cours de la mitose [Baldin *et al*, 2002 ; Gabrielli *et al*, 1996].

Les données provenant d'études indépendantes s'intéressant au rôle de CDC25B dans le développement des cancers ont fourni des résultats plutôt contradictoires (cf. IV.1.). Dans ce contexte, l'étude de l'implication des différents variants d'épissage de CDC25B pourrait apporter un début de réponse à ces résultats conflictuels. Par exemple, une surexpression du transcrit *CDC25B3* a été rapportée dans le cancer du pancréas [Guo *et al*, 2004], tandis que l'augmentation d'expression du variant *CDC25B2* est corrélée à faible degré de différenciation dans le cancer colorectal [Hernández *et al*, 2001] et à l'agressivité tumorale dans le lymphome non-hodgkinien [Hernández *et al*, 2000]. De manière intéressante, l'expression de ce variant CDC25B2, stable et plus actif, comme discuté ci-dessus, pourrait favoriser l'entrée inappropriée en mitose et ainsi contribuer à l'instabilité génétique des cellules cancéreuses.

V.4.3. CDC25C

Le pré-ARNm *CDC25C* est soumis à plusieurs événements d'épissage alternatif conduisant à la production d'au moins cinq transcrits différents [Bureik *et al*, 2000 ; Wegener *et al*, 2000] : *CDC25C1* (NM_001790 ; ENST00000323760), *C2* (AF277723 ; ENST00000356505), *C3* (AF277724), *C4* (AF277725 ; ENST00000357274) et *C5* (ou *CDC25Cdm* ; NM_022809.2 ; ENST00000357274). Ces variants d'épissage sont issus de l'exclusion/inclusion alternative des exons 3, 5 et 6 (**Figure 16A**). Toutes ces isoformes possèdent un domaine catalytique intact, exceptée *CDC25C3* qui aboutit à une protéine tronquée dépourvue d'activité phosphatase, en raison d'un décalage du cadre de lecture faisant apparaître un codon stop prématuré (**Figure 16B**). L'exclusion de l'exon 3 dans les variants *CDC25C4* et *C5* résulte également en un décalage du cadre de lecture et en l'apparition de 15 nouveaux résidus d'acides aminés, mais le cadre de lecture d'origine est ensuite rétabli par exclusion de l'exon 5, empêchant l'apparition d'un codon stop prématuré. Ces divers événements d'épissage alternatif conduisent à la disparition ou à l'apparition de sites de phosphorylation et d'ubiquitylation (**Figure 16C**), et contribuent probablement à une régulation différentielle des isoformes *CDC25C*, bien que leur fonction spécifique soit pour le moment peu connue.

Comme discuté au paragraphe IV.1., le rôle éventuel de *CDC25C* dans le développement tumoral reste sujet à controverse et pourrait être clarifié par la considération individuelle de chaque variant d'épissage. En effet, le transcrit *CDC25C5* semble particulièrement impliqué dans les cancers, puisqu'une surexpression de ce variant a été observée dans le cancer colorectal [Hernández *et al*, 2001], ainsi que dans le cancer de la prostate en association avec le paramètre de récurrence biochimique (antigène prostate-spécifique) [Ozen et Ittmann, 2005]. De manière intéressante, ce variant est capable d'altérer la dépendance existant entre l'accomplissement correct de la réplication de l'ADN et l'entrée en mitose chez *S. pombe* et pourrait de ce fait contribuer à la transformation oncogénique des cellules [Bureik *et al*, 2000]. Cette caractéristique particulière de *CDC25C5* pourrait provenir d'une plus grande stabilité de cette protéine liée à la délétion du motif de dégradation KEN, comme cela a précédemment été décrit pour le variant *CDC25B2* (**Figure 16C**) [Chen *et al*, 2002 ; Kieffer *et al*, 2007].

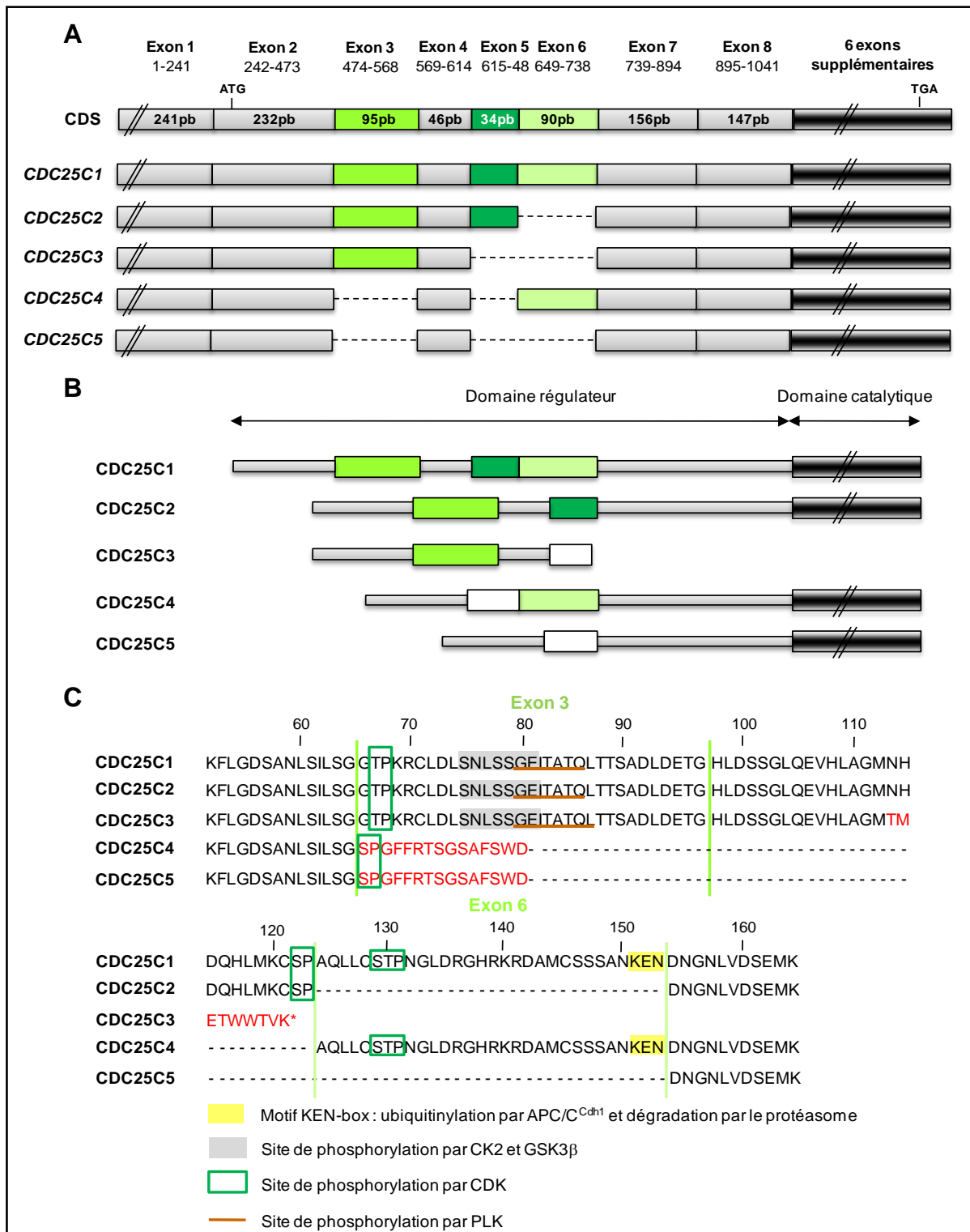


Figure 16. Représentation schématique des variants d'épissage de CDC25C. (A) La séquence codante (CDS) est représentée au-dessus des ARNm des différents variants. Les rectangles de couleur correspondent aux exons épissés alternativement. ATG : codon d'initiation de la traduction ; TGA : codon stop. (B) Représentation de la séquence protéique de chaque isoforme. Dans *CDC25C3*, *C4* et *C5*, l'épissage alternatif résulte en un décalage du cadre de lecture et en l'apparition de nouveaux acides aminés (rectangles blancs). (C) Localisation des sites de régulation majeurs au sein des exons soumis à épissage alternatif (exons 3, 5, et 6). Les résidus en rouge correspondent aux nouveaux acides aminés générés par décalage du cadre de lecture.

L'étude de l'expression des différents variants d'épissage de CDC25 dans les cancers, combinée à l'évaluation de leurs rôles spécifiques, pourrait permettre de clarifier le potentiel pronostique de ces phosphatases et éventuellement d'envisager de nouvelles perspectives de traitement personnalisé.

Objectifs et Stratégie

I. OBJECTIFS

Le cancer du sein représente la principale cause de décès chez les femmes atteintes d'un cancer. Malgré les progrès majeurs réalisés dans la prise en charge thérapeutique de cette maladie, de nombreux efforts sont encore requis afin de mieux appréhender les profils moléculaires spécifiques de chaque tumeur et ainsi d'évoluer vers une médecine plus personnalisée. La recherche de nouveaux biomarqueurs pronostiques et/ou prédictifs pertinents constitue par conséquent un enjeu considérable. Dans ce contexte, les phosphatases CDC25 sont apparues comme des candidates intéressantes.

Les CDC25 jouent un rôle important dans la progression du cycle cellulaire en régulant l'activité des complexes CDK/cycline. Par ailleurs, une surexpression des CDC25 est retrouvée dans de nombreux cancers, notamment dans le cancer du sein, et est souvent corrélée à un pronostic défavorable. Néanmoins, l'utilisation des CDC25 comme biomarqueur pronostique est pour le moment contrariée par certains résultats contradictoires, pouvant être expliqués au moins en partie par la non-considération de son épissage alternatif dans la majorité des études menées jusqu'à présent. En effet, les CDC25 sont constituées de trois isoformes : CDC25A, CDC25B et CDC25C codées par des gènes distincts, tous trois soumis à un mécanisme d'épissage alternatif. Quelques rares études ont suggéré que certains de ces variants d'épissage pourraient être plus impliqués dans les cancers que d'autres, mais aucune étude n'a été conduite à ce jour dans le cancer du sein.

Nous nous proposons donc d'évaluer l'implication des différents variants d'épissage de CDC25 dans le cancer du sein. L'objectif final de cette étude étant de pouvoir clarifier l'intérêt des phosphatases CDC25 en tant que biomarqueur potentiel dans cette pathologie.

Deux approches différentes et complémentaires seront développées à cette fin :

- L'expression de chaque variant d'épissage de CDC25 sera évaluée dans différents modèles de cancer du sein, afin de mieux comprendre leur contribution au développement tumoral.
- Le processus d'épissage alternatif des CDC25 sera étudié d'un point de vue plus mécanistique. En particulier, nous rechercherons une éventuelle régulation de ce processus en présence d'agents génotoxiques, ce qui pourrait nous éclairer sur le rôle des CDC25 dans la résistance à la chimiothérapie acquise par les cellules cancéreuses.

II. STRATÉGIE

II.1. Expression des variants d'épissage de CDC25 dans le cancer du sein

Dans un premier temps, il s'agira de mettre au point une technique de RT-PCR quantitative originale permettant d'évaluer de manière spécifique l'expression des différents transcrits alternatifs de *CDC25*. Grâce à cette technique, l'expression des variants d'épissage de *CDC25* sera déterminée dans différentes lignées cellulaires de carcinome mammaire humain en culture. La lignée mammaire non cancéreuse hTERT-HME1 sera utilisée comme contrôle et comparée à plusieurs lignées cancéreuses sensibles (MCF-7 et MDA-MB-231) et résistantes (Vcr-R et Adr-R). Cette étude sera complétée par l'analyse de l'expression de ces variants dans des tissus mammaires tumoraux et péri-tumoraux appariés et par la recherche d'une éventuelle corrélation avec les caractéristiques cliniques et histopathologiques des tumeurs. Cet aspect de l'étude nécessitera une collaboration étroite entre le laboratoire, les chirurgiens, les anatomopathologistes et les biostatisticiens.

II.2. Régulation de l'épissage des CDC25 en conditions de stress génotoxique

De nombreuses études récentes s'intéressent à la régulation de l'épissage alternatif de certains gènes en conditions de stress cellulaire, mais aucune n'a jusqu'à présent été conduite sur *CDC25*. Le second volet de ce projet se propose donc d'étudier la régulation de l'épissage de *CDC25* dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein traitées par des molécules induisant des dommages à l'ADN, telles que des agents anticancéreux génotoxiques (doxorubicine, étoposide, camptothécine, cisplatine) et des molécules génératrices de stress oxydant (peroxyde d'hydrogène, *tert*-butyl hydroperoxyde). Nous rechercherons également les mécanismes cellulaires associés à cette régulation (induction des voies de réponse aux dommages à l'ADN, blocage du cycle cellulaire, apoptose). Enfin, nous tenterons d'identifier les voies de signalisation impliquées dans la modulation de l'épissage de *CDC25*.

Résultats et Discussion

1^{ère} partie : Expression des variants d'épissage de CDC25 dans le cancer du sein

Peu d'informations ont été rapportées à ce jour concernant les fonctions spécifiques de chaque variant d'épissage de CDC25, leur expression dans les tumeurs et leur rôle potentiel dans l'oncogenèse. Plus particulièrement, aucune étude de l'expression de ces variants dans le cancer du sein n'a été rapportée à notre connaissance. Or, l'altération des processus d'épissage constitue un phénomène récurrent au cours de la tumorigenèse [Pajares *et al*, 2007] et les variants d'épissage ont émergé comme des biomarqueurs d'intérêt [Brinkman, 2004] (cf. « Introduction », paragraphe V.2.).

Nous nous proposons donc d'évaluer l'expression des variants d'épissage de CDC25 dans le cancer du sein, afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels. Dans un premier temps, nous avons mis au point une méthode inédite de RT-PCR quantitative permettant de détecter chaque transcrite alternatif de *CDC25* séparément. Puis, l'expression des différents variants d'épissage de CDC25 a été évaluée dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein sensibles et résistantes pour tenter de comprendre leur rôle dans la progression tumorale d'une part et dans la mise en place des mécanismes de résistance d'autre part. Enfin, cette étude a été étendue à des tumeurs primaires de sein afin de rechercher une implication préférentielle de certains transcrits alternatifs de *CDC25*, ainsi qu'une possible corrélation avec les paramètres cliniques et anatomopathologiques des tumeurs.

I. DÉVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE ORIGINALE DE RT-PCR QUANTITATIVE POUR LA DÉTECTION DES VARIANTS DE CDC25

I.1. Avantage de la méthode de RT-PCR quantitative pour cette étude

La RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) est une méthode largement utilisée pour étudier l'expression des gènes. Les données peuvent être collectées soit à la fin de la réaction (RT-PCR semi-quantitative, en point final), soit au cours de la phase d'amplification (RT-PCR quantitative, en temps réel). Dans notre étude, nous avons besoin d'une méthode capable de détecter de faibles différences dans l'expression des variants d'épissage d'un échantillon à l'autre. Nous avons donc utilisé la technique de PCR

quantitative (PCRq) qui est une méthode très sensible, reproductible et précise. La PCRq permet de détecter la fluorescence émise au cours de chaque cycle d'amplification, grâce à l'utilisation d'un fluorochrome (couplé ici à une sonde hydrolysable TaqMan®) (**Figure 17**). Dans ce cas, l'augmentation du signal de fluorescence est directement proportionnel au nombre d'amplicons et permet ainsi de déterminer la quantité initiale de la séquence cible.

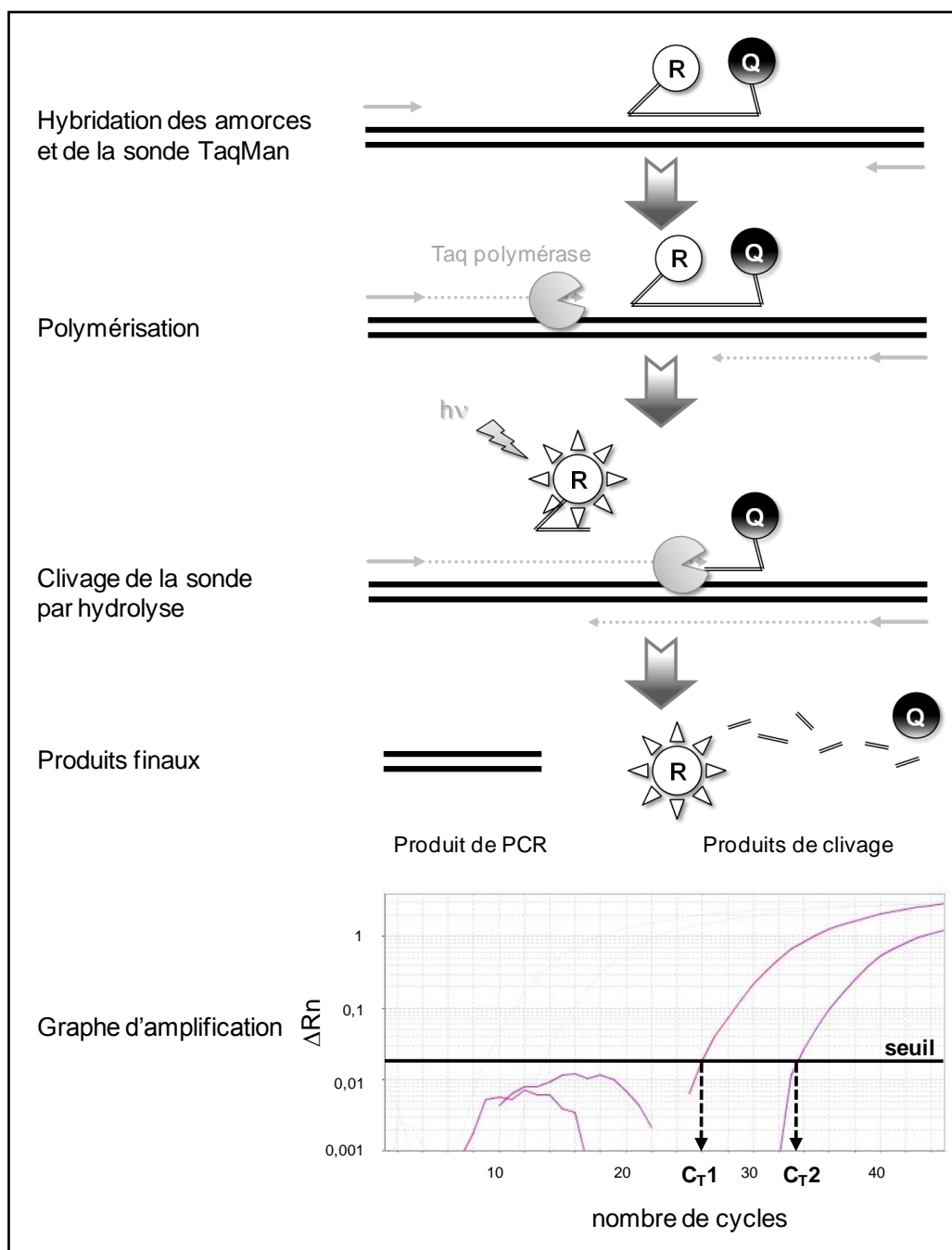


Figure 17. Principe de la réaction de PCR en temps réel (sonde TaqMan®). Cette technique repose sur l'utilisation d'une sonde hydrolysable TaqMan® portant un fluorochrome (R = reporter) et un *quencher* (Q), s'hybridant spécifiquement au gène d'intérêt. Au départ, le *quencher* absorbe l'énergie émise par le fluorochrome du fait de leur proximité dans l'espace (principe de FRET). Au cours de l'amplification, l'ADN polymérase hydrolyse la sonde et l'énergie ne peut alors plus être absorbée par le *quencher*, la fluorescence devient visible.

La concentration initiale de la cible est corrélée à son C_T (*Cycle Threshold*), qui correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour atteindre la ligne de seuil (**Figure 17**). Cette ligne est placée au niveau de la phase exponentielle d'amplification, de façon à dépasser le bruit de fond. Deux méthodes principales de quantification existent : la quantification absolue (méthode de la courbe standard) et la quantification relative. La plupart des études d'expression des gènes utilisent la quantification relative et plus spécifiquement la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [Schmittgen et Livak, 2008]. Cette méthode permet de calculer le rapport d'expression d'un gène cible entre un échantillon à analyser et un contrôle (cellule non cancéreuse, cellules non traitées, tissu péri-tumoral...), en normalisant les résultats avec un gène endogène de référence (l'ARNr 18S dans notre étude). Tout d'abord, les différences ΔC_T entre les valeurs de C_T du gène cible et du gène de référence sont déterminées pour l'échantillon à analyser et le contrôle :

$$\Delta C_T \text{ échantillon} = C_T \text{ gène cible} - C_T \text{ gène de référence}$$

$$\Delta C_T \text{ contrôle} = C_T \text{ gène cible} - C_T \text{ gène de référence}$$

Ensuite, le $\Delta\Delta C_T$ entre le contrôle et l'échantillon est calculé :

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ échantillon} - \Delta C_T \text{ contrôle}$$

Finalement, le rapport d'expression relative du gène cible est déterminé par la formule :

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Mathématiquement, si $2^{-\Delta\Delta C_T} > 1$, le gène cible est surexprimé dans l'échantillon par rapport au contrôle et si $2^{-\Delta\Delta C_T} < 1$, le gène est sous-exprimé.

I.2 Optimisation des conditions expérimentales de PCR en temps réel

I.2.1. Design des amorces et des sondes TaqMan®

Notre étude a nécessité le design d'amorces et de sondes TaqMan® inédites permettant l'amplification spécifique de chaque variant d'épissage de *CDC25*. La première étape a consisté à rechercher les séquences nucléotidiques de tous les variants d'épissage de *CDC25* et à les aligner afin d'identifier les séquences divergeant d'un transcrite à l'autre (**Figures 14 à 16**, « Introduction », paragraphe V.4.). Sur cette base, le design d'amorces et de sondes TaqMan® discriminantes a alors pu être réalisé grâce à des logiciels comme PrimerQuest ou Primer 3, en tenant compte des critères usuellement recommandés, tels que l'absence d'hybridation intra- ou inter-moléculaire entre les amorces, une température de fusion

supérieure pour la sonde par rapport aux amorces, l'absence de G à l'extrémité 5' de la sonde, une taille d'amplicon comprise entre 50 et 150 pb... Il a cependant parfois été difficile de choisir des amorces répondant scrupuleusement à tous ces critères tout en préservant leur propriété discriminante. Etant donné la faible quantité d'ARN disponible dans les échantillons tissulaires provenant d'exérèse de tumeurs mammaires, nous avons choisi de nous limiter à l'étude des variants d'épissage suivants : *CDC25A1* et *A2* ; *CDC25B1* et *B2* ; *CDC25C1* et *C5*, ainsi qu'à l'expression globale des trois isoformes de *CDC25* (**Figure 18**).

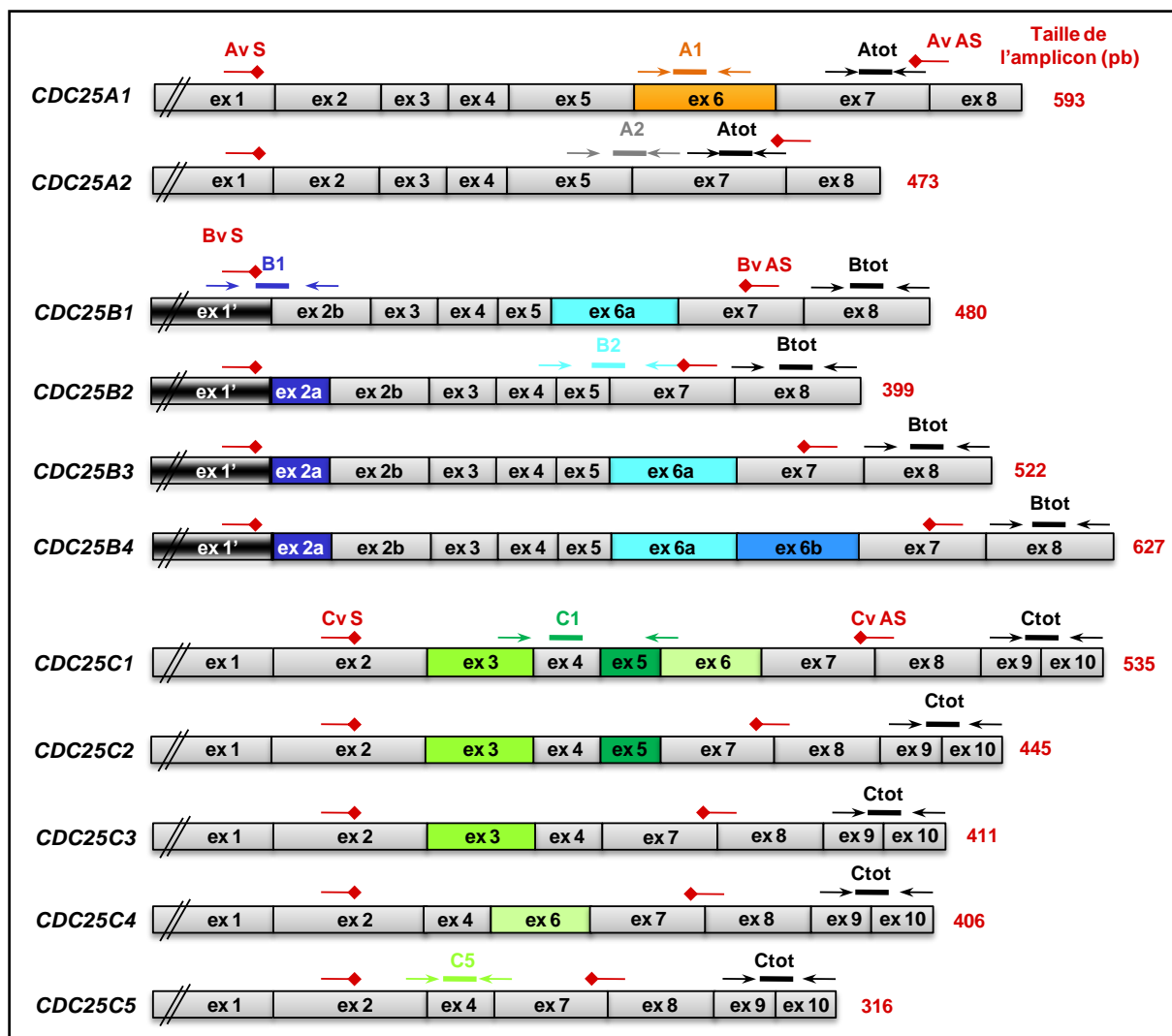


Figure 18. Localisation des amorces et des sondes TaqMan® utilisées pour la PCR quantitative et la PCR semi-quantitative. Les flèches et le trait noirs représentent respectivement les amorces et la sonde utilisées pour évaluer l'expression globale de chaque isoforme de *CDC25* par PCRq (Atot, Btot et Ctot). Les flèches et le trait de couleurs représentent respectivement les amorces et la sonde utilisées pour détecter spécifiquement un variant d'épissage de *CDC25* par PCRq (A1, A2, B1, B2, C1, C5). Les flèches rouges terminées par un losange illustrent les amorces sens et antisens utilisées pour détecter simultanément l'ensemble des variants de chaque isoforme de *CDC25* par PCR semi-quantitative (Av S/AS, Bv S/AS, Cv S/AS). A droite de la figure, en rouge, est indiquée la taille des amplicons obtenus par PCR semi-quantitative à partir des différents variants d'épissage de *CDC25*.

I.2.2. Choix du gène endogène de référence

Il a été montré que les gènes de ménages classiques comme *ACTB* (gène de la β -actine) ou *GAPDH* (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) ne sont pas adaptés en tant que gène de référence pour la PCRq car leur expression augmente dans les cellules proliférantes et les cancers agressifs. A l'inverse les ARNr semblent moins affectés par les conditions expérimentales. Ainsi, l'ARNr 18S que nous avons choisi pour notre étude a été utilisé dans de nombreuses études et est exprimé à un niveau relativement constant dans divers types de cancers [Aerts *et al*, 2004 ; Ho-Pun-Cheung *et al*, 2008]. Certaines limitations à l'utilisation de l'ARNr 18S ont toutefois été rapportées. En effet, les ARN ribosomiaux ne sont pas toujours représentatifs de la population globale des ARNm cellulaires. De plus, les ARNr sont très abondants et donnent des valeurs de C_T faibles, ce qui n'est pas forcément souhaitable. Depuis, de nouveaux gènes endogènes plus adaptés ont été identifiés, par exemple *SDHA* (succinate deshydrogénase 1) et *PUM1* (*pumilio homolog 1*) [Gur-Dedeoglu *et al*, 2009 ; Lyng *et al*, 2008].

I.2.3. Efficacité des réactions d'amplification

Un pré-requis à l'utilisation de la quantification relative est d'avoir des réactions d'amplification avec une efficacité proche de 100% (entre 90 et 110%), ce qui signifie qu'à chaque cycle d'amplification la concentration en produits de PCR est doublée. De plus, les efficacités d'amplification du gène cible et du gène de référence doivent être proches (maximum 10% d'intervalle). Afin d'évaluer l'efficacité des différentes réactions de PCR en temps réel, une série de dilutions d'ADNc (x, x/4, x/16, x/64, x/256) provenant de cellules MCF-7 a été utilisée et amplifiée avec les différents couples d'amorces/sonde nécessaires à notre étude. Les valeurs de C_T obtenues ont ensuite été reportées graphiquement en fonction du logarithme de la dilution d'ADNc et la pente de la droite a été déterminée (**Figure 19A**). L'efficacité de chaque réaction a alors été calculée grâce à l'équation $E = 10^{(1/\text{pente})} - 1$ (**Figure 19B**).

La majorité des couples amorces/sonde ont une efficacité correcte, comprise entre 90 et 100%, même si certains d'entre eux ont une efficacité légèrement inférieure comme ceux permettant la détection de *CDC25A2*, *B2* et *C1*. Cette efficacité moindre peut être expliquée par l'obligation d'utiliser des contraintes moins stringentes lors du design pour obtenir des amorces reconnaissant exclusivement la courte séquence spécifique à ces variants.

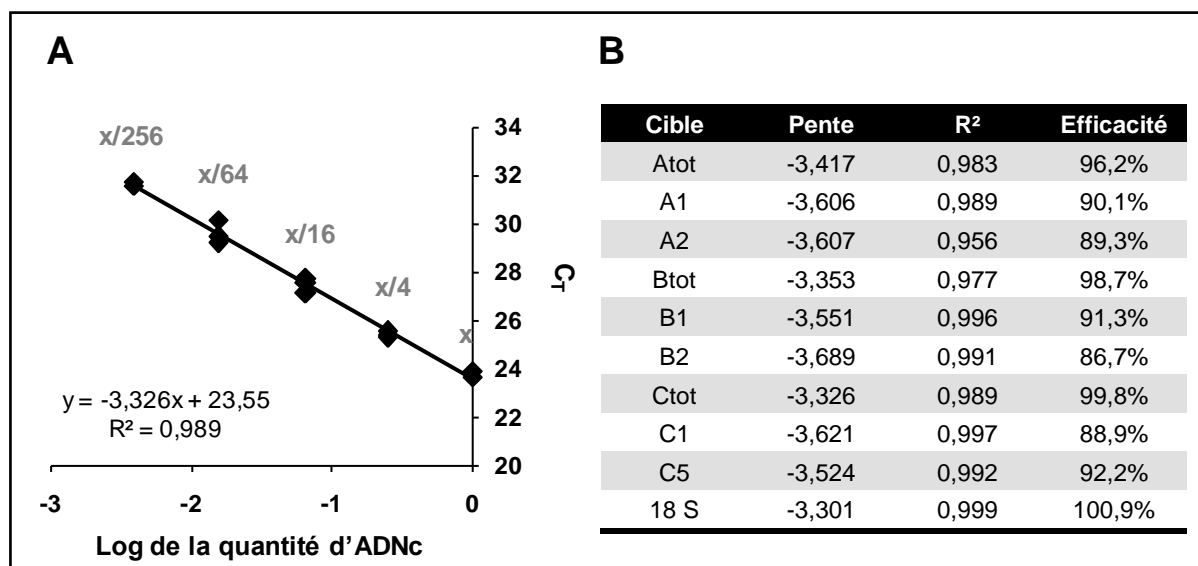


Figure 19. Détermination de l'efficacité des amorces et sondes TaqMan® utilisées pour la PCR quantitative. Différentes dilutions d'ADNc de cellules MCF-7 (x, x/4, x/16, x/64, x/256, en triplicat) ont été amplifiées par PCR quantitative. (A) Détermination de la pente de C_T en fonction du log de la dilution d'ADNc (exemple de Ctot) (B) L'efficacité de chaque couple amorces/sonde a été déterminée comme expliqué dans le texte.

I.2.4. Spécificité des réactions de PCR quantitative

Nous avons également vérifié la spécificité d'amplification de la séquence d'intérêt par les différents couples d'amorces. Pour cela, les produits de PCRq ont été déposés sur gel d'agarose. La spécificité d'amplification a été vérifiée pour chaque couple d'amorces par l'obtention d'un seul amplicon à la taille attendue (**Figure 20**).

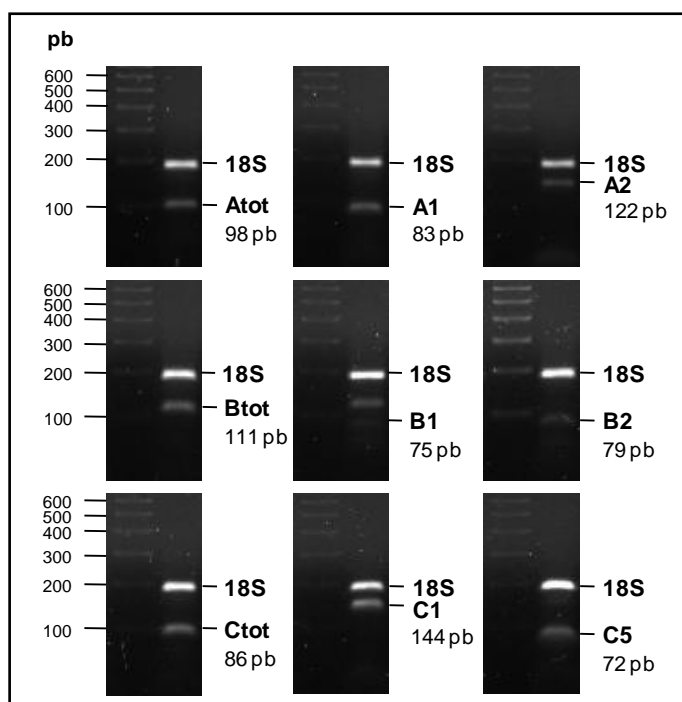


Figure 20. Vérification de la spécificité des amorces utilisées pour la PCR quantitative. Les ADNc des cellules MCF-7 ont été amplifiés en présence des différents couples d'amorces/sonde, puis déposés sur gel d'agarose.

II. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES VARIANTS D'ÉPISSAGE DE CDC25 DANS DIFFÉRENTES LIGNÉES DE CANCER DU SEIN

II.1. Présentation des lignées cellulaires modèles

Cinq lignées cellulaires mammaires humaines ont été utilisées pour cette étude :

- La lignée épithéliale mammaire, non-cancéreuse, **hTERT-HME1**. Cette lignée a été obtenue à partir d'une femme de 53 ans ayant subi une chirurgie plastique de réduction mammaire, sans antécédent de cancer du sein. Ces cellules HME1 ont été immortalisées par transfection rétrovirale de la transcriptase inverse de la télomérase humaine (hTERT). Elles ont été utilisées comme modèle de cellules **non cancéreuses** et comparées à diverses lignées d'adénocarcinome mammaire humain.

- La lignée d'adénocarcinome mammaire humain **MCF-7**. Cette lignée a été établie en 1970 à partir de l'épanchement pleural d'une patiente de 69 ans de type caucasien, atteinte d'un cancer du sein métastatique [Soule *et al*, 1973]. Ces cellules présentent une morphologie épithéliale et ont conservé certaines caractéristiques de l'épithélium mammaire différencié comme l'expression de récepteurs cytoplasmiques aux œstrogènes et la capacité à former des dômes lorsqu'elles sont mises en culture [Brooks *et al*, 1973].

- La lignée d'adénocarcinome mammaire humain **MDA-MB-231**. Cette lignée provient également d'une effusion pleurale, d'une autre patiente caucasienne de 51 ans présentant un cancer du sein métastatique [Cailleau *et al*, 1974]. Ces cellules ont gardé une morphologie épithéliale, mais n'expriment pas les récepteurs aux œstrogènes. Elles possèdent en outre la capacité de former des tumeurs dans des souris *nude*.

Ces deux dernières lignées : MCF-7 et MDA-MB-231, sont considérées comme sensibles envers divers agents anticancéreux et seront donc utilisées comme modèles de cellules **sensibles** dans notre étude.

- La lignée **Vcr-R** (initialement nommée VCREMS) correspond à des cellules MCF-7 ayant été sélectionnées pour leur résistance à la vincristine suite à un traitement par un agent mutagène [Whelan *et al*, 1992]. Elles présentent également une résistance croisée à d'autres agents anticancéreux comme la doxorubicine ou l'étoposide. Leur propriété de résistance est en partie liée à la surexpression de la glycoprotéine P et à une activité accrue de certaines enzymes du système du glutathion comme la glutathion *S*-transférase π [Whelan *et al*, 1992].

- La lignée **Adr-R** dérive de cellules MCF-7 sélectionnées pour leur résistance à la doxorubicine (ou adriamycine) par incubation progressive avec des concentrations croissantes en doxorubicine jusqu'à atteindre une concentration de 10 μ M [Batist *et al*, 1986]. A noter que ces cellules doivent ensuite être maintenues en culture en présence de cette concentration de doxorubicine pour ne pas perdre leur phénotype résistant. Cette lignée présente une résistance multiple à divers traitements anticancéreux comme l'étoposide et la vincristine, associée à une expression accrue de la glycoprotéine P et d'enzymes dépendantes du glutathion [Cowan *et al*, 1986].

Les lignées Vcr-R et Adr-R seront utilisées comme modèles de cellules **résistantes** par comparaison à leur lignée d'origine sensible MCF-7.

II.2. Mesure de l'expression des transcrits alternatifs de *CDC25* et d'autres gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire

L'expression des transcrits alternatifs de *CDC25* a tout d'abord été évaluée par RT-PCR semi-quantitative en utilisant des amorces situées de part et d'autre de la région soumise à épissage alternatif, générant des amplicons de taille différente pour chaque variant (**Figure 18**). Après quoi, la contribution des variants d'épissage principaux a été déterminée de manière plus rigoureuse par RT-PCR quantitative à l'aide des amorces et des sondes TaqMan® spécifiques décrites précédemment (**Figure 18**).

CDC25A. Comme l'indique les résultats de RT-PCR semi-quantitative, *CDC25A1* constitue le transcrite majoritaire dans toutes les lignées cellulaires testées, tandis que les niveaux d'ARNm *CDC25A2* sont très faibles (**Figure 21**).

Grâce à la technique plus précise de RT-PCRq, une surexpression globale de *CDC25A* (avec une augmentation concomitante des variants *CDC25A1* et *A2*) a été observée dans la lignée cellulaire MDA-MB-231 par comparaison aux cellules non-cancéreuses hTERT-HME1, mais pas dans la lignée MCF-7 (**Figure 22**). Cette divergence entre les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 pourrait dépendre du profil moléculaire distinct de ces cellules, les cellules MCF-7 étant de type luminal A (RE+, RP+, HER2-), tandis que les cellules MDA-MB-231 sont de type triple négatif (RE-, RP-, HER2-) (cf. « Introduction », paragraphe I.3.3.) [Kao *et al*, 2009 ; Subik *et al*, 2010]. A noter que le profil triple négatif est de mauvais pronostic et ne bénéficie à ce jour d'aucune option de traitement personnalisé contrairement aux autres sous-types moléculaires de cancer du sein (luminal A et B, HER2-enrichi). Dans ce

contexte, la recherche de nouveaux biomarqueurs spécifiques de ce sous-type de cancer représente un enjeu considérable et *CDC25A* pourrait constituer un candidat d'intérêt.

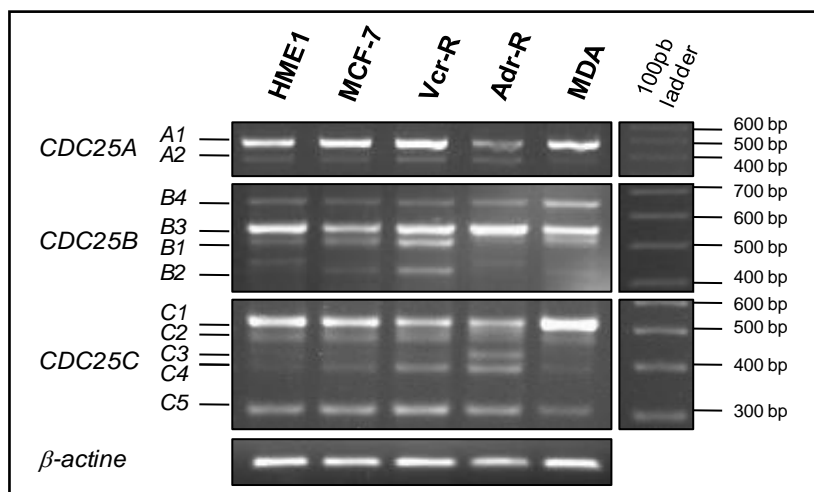


Figure 21. Analyse de l'expression des variants d'épissage de *CDC25* par RT-PCR semi-quantitative dans différentes lignées cellulaires mammaires humaines. Le gène *β-actine* a été utilisé comme contrôle interne.

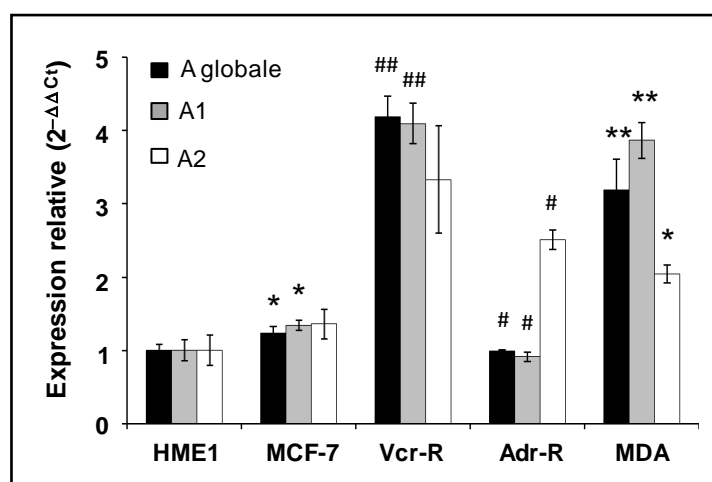


Figure 22. Analyse de l'expression des variants d'épissage de *CDC25A* par RT-PCR quantitative dans différentes lignées de cancer du sein. Les résultats sont exprimés comme la moyenne des $2^{-\Delta\Delta C_T} \pm$ écart-type (trois expériences indépendantes), avec l'utilisation de l'ARNr 18S comme gène endogène de référence. * et ** indiquent des différences significatives entre les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 et le contrôle hTERT-HME1 à $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement. # et ## indiquent des différences significatives entre les lignées résistantes Vcr-R et Adr-R et la lignée sensible MCF-7 à $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test t de Student).

De plus, l'expression globale de *CDC25A* et des variants *CDC25A1* et *A2* est régulée à la hausse dans la lignée résistante Vcr-R par rapport à sa lignée sensible d'origine MCF-7, alors que seule la proportion de *CDC25A2* est augmentée dans les cellules résistantes Adr-R (**Figure 22**). Bien que l'expression de *CDC25A2* soit plus faible que celle de *CDC25A1*, ces résultats suggèrent que le variant *CDC25A2* pourrait être associé au phénotype de résistance

dans ces cellules. Ce variant est dépourvu de l'exon 6, mais la conséquence de cette délétion est inconnue. Cependant, cette séquence contient de multiples sites de régulation dont un site de phosphorylation par CHK1 (Ser178) qui conduit à la séquestration cytoplasmique de la protéine CDC25A par interaction avec la protéine 14-3-3 [Chen *et al*, 2003], ainsi que le motif D-box impliqué dans sa dégradation dépendante du protéasome [Donzelli *et al*, 2002]. L'absence de ces sites pourrait augmenter l'activité nucléaire et la stabilité de CDC25A2 et par conséquent son potentiel oncogénique.

CDC25B. Le gène *CDC25B* génère au moins sept variants d'épissage connus à ce jour [Baldin *et al*, 1997b ; Forrest *et al*, 1999 ; Jullien *et al*, 2011]. Néanmoins, les amorces utilisées pour la RT-PCR semi-quantitative reconnaissent exclusivement les transcrits *CDC25B1* à *B4* (**Figure 18**). *CDC25B3* représente le transcrit le plus abondant dans l'ensemble des lignées étudiées (**Figure 21**), ce qui est en accord avec de précédentes études [Baldin *et al*, 1997 ; Forrest *et al*, 1999 ; Guo *et al*, 2004 ; Hernández *et al*, 2000, 2001]. De manière intéressante, les variants *CDC25B1* et *B4* sont exprimés à des niveaux relativement élevés dans nos modèles cellulaires, alors que de précédentes études menées sur d'autres types de lignées ou de tissus leur ont attribué un statut de transcrits rares [Forrest *et al*, 1999 ; Guo *et al*, 2004 ; Hernández *et al*, 2000, 2001]. Ces variants d'épissage pourraient donc avoir une implication particulière dans le tissu mammaire.

Nous avons ensuite choisi d'analyser plus précisément l'expression globale de *CDC25B* ainsi que celle des variants *CDC25B1* et *B2* par RT-PCRq. L'expression de *CDC25B3* n'a malheureusement pu être déterminée, car il a été impossible d'obtenir des amorces et une sonde TaqMan® respectant les conditions de taille d'amplicon recommandées pour ce type d'expérimentation. La **figure 23** indique que l'expression globale de *CDC25B* et celle du variant *CDC25B1* sont plutôt similaires dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 par rapport à la lignée hTERT-HME1, tandis que *CDC25B2* est surexprimé, suggérant un possible rôle de ce variant dans la transformation maligne de ces cellules. Les deux lignées cellulaires résistantes ont fourni des résultats opposés, la lignée Vcr-R surexprimant l'ensemble des transcrits de *CDC25B*, en particulier *CDC25B2*, contrairement à la lignée Adr-R (par rapport à MCF-7) (**Figure 23**). Le variant *CDC25B2* pourrait par conséquent être impliqué dans l'acquisition de certains types de résistance. De manière intéressante, une surexpression de ce transcrit a précédemment été décelée dans des carcinomes colorectaux faiblement différenciés ainsi que dans des lymphomes non-hodgkinien agressifs [Hernández *et al*, 2000, 2001]. De plus, *CDC25B2* est plus efficace que *CDC25B3* et *B1* en tant qu'inducteur de la mitose chez

la levure *S. pombe* [Baldin *et al*, 1997]. En outre, la protéine CDC25B2 est plus stable au cours de la mitose, car elle dépourvue du motif KEN (exon 6a) conduisant à la protéolyse des autres isoformes de CDC25B [Kieffer *et al*, 2007].

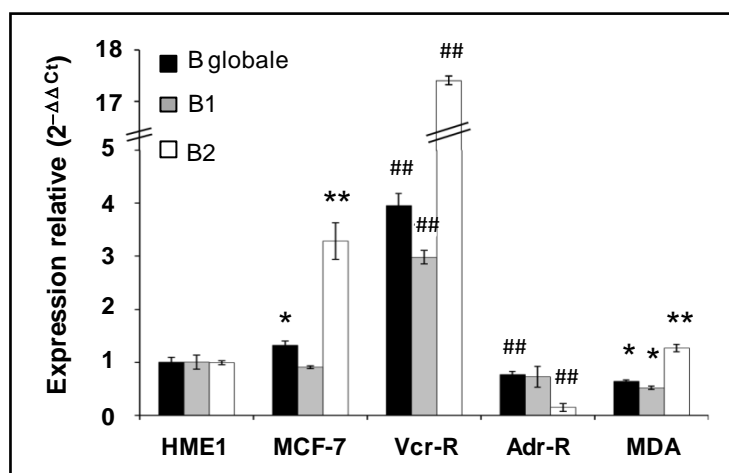


Figure 23. Analyse de l'expression des variants d'épissage de *CDC25B* par RT-PCR quantitative dans différentes lignées de cancer du sein. Les résultats sont exprimés comme la moyenne des $2^{-\Delta\Delta C_T} \pm$ écart-type (trois expériences indépendantes), avec l'utilisation de l'ARNr 18S comme gène endogène de référence. * et ** indiquent des différences significatives entre les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 et le contrôle hTERT-HME1 à $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement. # et ## indiquent des différences significatives entre les lignées résistantes Vcr-R et Adr-R et la lignée sensible MCF-7 à $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test t de Student).

CDC25C. L'expression des cinq variants d'épissage de *CDC25C* décrits par Wegener *et al* [2000] a été explorée par RT-PCR semi-quantitative. Les transcrits alternatifs principaux correspondent au variant le plus long *CDC25C1* et au variant le plus court *CDC25C5*, tandis que les autres variants sont exprimés plus faiblement (**Figure 21**), ce qui corrobore les résultats de la littérature [Ozen et Ittman, 2005 ; Wegener *et al*, 2000]. A noter que des variants additionnels de *CDC25C* (*CDC25C6-10*) ont été identifiés plus récemment dans des néoplasies hématologiques [Caudill *et al*, 2008]. Néanmoins, ces variants semblent spécifiques de ce type d'affection, car ils n'ont pas été détectés dans les études précédentes ou dans notre propre étude, malgré l'utilisation des mêmes amorces de RT-PCR. De façon remarquable, la **figure 21** indique que les lignées cellulaires résistantes aux agents anticancéreux présentent des profils d'épissage particuliers. En effet, l'expression des variants *CDC25C5* et *C4* est supérieure dans les cellules Vcr-R par rapport à MCF-7, tandis que l'expression des variants *CDC25C4* et *C3* est augmentée dans les cellules Adr-R ; dans les deux cas cette surexpression s'accompagne d'une diminution des transcrits *CDC25C1*. Au niveau protéique, les variants *CDC25C4* et *C5* possèdent 15 acides aminés uniques, incluant un site putatif de phosphorylation par CDK (**Figure 16**). La fonction de cette séquence est

inconnue, mais elle pourrait contribuer aux phénotypes de résistance multiple aux médicaments. Le rôle du transcrit *CDC25C3* générant une protéine dépourvue d'activité phosphatase et surexprimé dans les cellules Adr-R demeure pour le moment inexploré.

Afin d'approfondir ces observations, l'expression globale de *CDC25C* ainsi que celle des deux variants principaux *CDC25C1* et *C5* ont été évaluées par RT-PCRq. Bien que l'expression globale de *CDC25C* soit constante, la proportion des variants d'épissage est inégale entre les différentes lignées cellulaires (**Figure 24A**). L'expression des transcrits *CDC25C* n'est pas statistiquement différente dans les cellules MCF-7 par rapport à hTERT-HME1, alors que les cellules MDA-MB-231 affichent une augmentation de *CDC25C1* accompagnée d'une diminution de *CDC25C5* (**Figure 24A**).

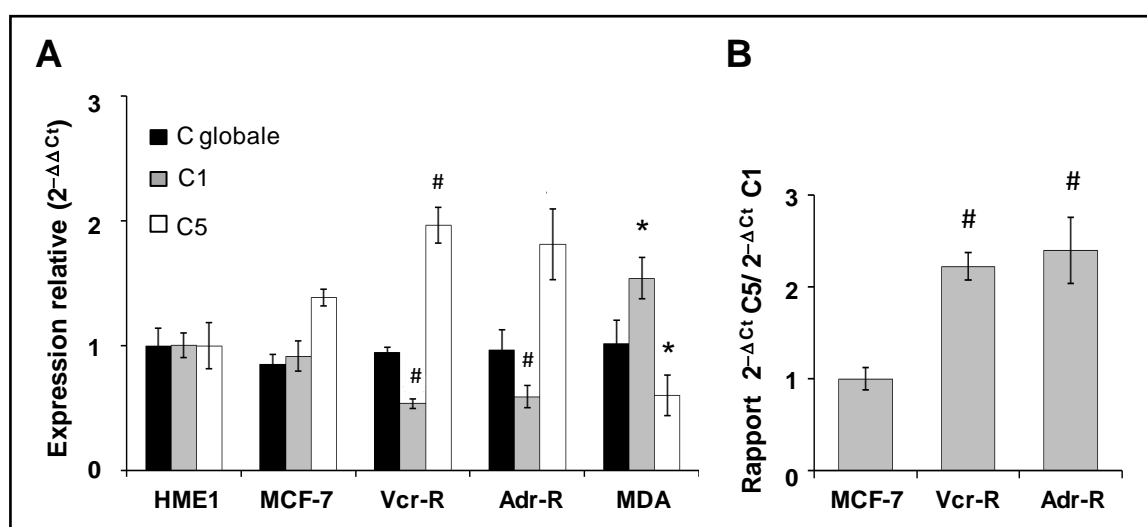


Figure 24. Analyse de l'expression des variants d'épissage de *CDC25C* par RT-PCR quantitative dans différentes lignées de cancer du sein. (A) Les résultats sont exprimés comme la moyenne des $2^{-\Delta\Delta C_T} \pm$ écart-type (trois expériences indépendantes), avec l'utilisation de l'ARNr 18S comme gène endogène de référence. * et ** indiquent des différences significatives entre les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 et le contrôle hTERT-HME1 à $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement. # et ## indiquent des différences significatives entre les lignées résistantes Vcr-R et Adr-R et la lignée sensible MCF-7 à $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test t de Student). (B) Le rapport entre l'expression de *CDC25C5* et celle de *CDC25C1* a été mesuré dans la lignée MCF-7 (contrôle) et comparé à celui de ses lignées homologues résistantes Vcr-R et Adr-R (# $p < 0,05$).

De manière intéressante, la proportion du variant *CDC25C5* augmente au détriment de celle de *CDC25C1* dans les cellules résistantes Vcr-R et Adr-R, par comparaison à la lignée sensible MCF-7 (**Figure 24A**). Plus précisément, le rapport *CDC25C5/C1* est doublé dans les cellules Vcr-R et Adr-R par rapport à leur lignée d'origine (augmentation relative de $2,2 \pm 0,2$ et $2,4 \pm 0,4$ fois respectivement) (**Figure 24B**). Par conséquent, le rapport *CDC25C5/C1* pourrait être considéré comme un marqueur potentiel du développement de résistances, plus significatif que l'expression de chaque variant pris séparément.

De manière intéressante, une surexpression du transcrite alternatif *CDC25C5* a déjà été rapportée dans des formes agressives du cancer de la prostate [Ozen et Ittmann, 2005]. De plus, Bureik *et al* ont observé que *CDC25C5* favorisait le découplage entre la mitose et la réplication de l'ADN par rapport à *CDC25C1* chez la levure *S. pombe* [Bureik *et al*, 2000]. Cette caractéristique pourrait être liée à l'absence du motif de dégradation KEN dans le variant *CDC25C5* [Chen *et al*, 2002]. L'expression de ce variant pourrait donc résulter en une instabilité génomique et ainsi faciliter l'émergence de maladies plus agressives.

Autre gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Afin de poursuivre la caractérisation de nos modèles cellulaires, l'expression de gènes clés du cycle cellulaire tels que *CDK1*, *CDK2*, et *p53* a été évaluée par RT-PCR semi-quantitative. Le niveau d'expression des *CDK* est constant dans l'ensemble des lignées testées (**Figure 25**), suggérant un rôle moindre de ces kinases dans le développement tumoral. Aucune étude n'a d'ailleurs montré une surexpression de *CDK1* et *CDK2* dans le cancer du sein à notre connaissance, alors que l'implication des phosphatases *CDC25* (**Tableau 1**) ou des cyclines [Boström *et al*, 2009] a largement été rapportée dans ce type de néoplasie. Par ailleurs, l'expression basale du facteur de transcription *p53* varie entre les différentes lignées. Particulièrement, le transcrite *p53* est sous-exprimé dans les cellules Vcr-R (**Figure 25**). De façon remarquable, la surexpression de *CDC25A* et *CDC25B* observée dans cette lignée pourrait être associée à ce faible niveau basal de *p53*, puisque la transcription des gènes *CDC25A* et *CDC25B* peut être réprimée de manière indirecte par *p53* [Dalvai *et al*, 2011 ; Demidova *et al*, 2009]. En outre, la lignée MDA-MB-231 exprime une *p53* mutée [Bartek *et al*, 1990], ce qui pourrait également expliquer la forte expression de *CDC25A* rapportée dans ces cellules.

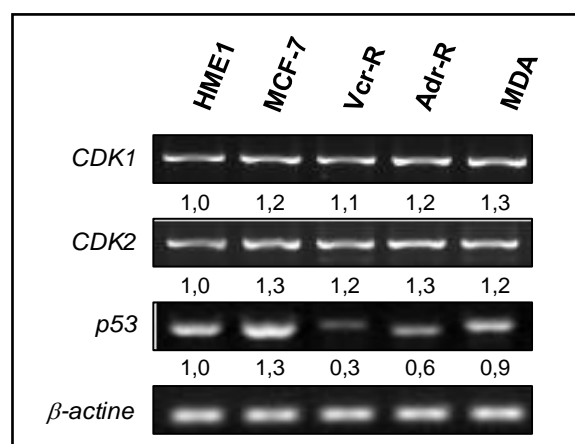


Figure 25. Analyse de l'expression de *CDK1*, *CDK2*, et *p53* par RT-PCR semi-quantitative dans différentes lignées cellulaires mammaires humaines. Le gène *β-actine* a été utilisé comme contrôle interne. Le niveau d'expression relative déterminé par densitométrie est indiqué sous les gels.

II.3. Expression des protéines CDC25

Sachant que les niveaux d'ARNm de *CDC25* ne sont pas systématiquement corrélés aux niveaux protéiques [Boutros *et al*, 2007a], l'expression des protéines CDC25 a été évaluée par immunoblotting. A notre connaissance, il n'existe pas d'anticorps reconnaissant spécifiquement chaque variant d'épissage de CDC25 séparément. Par conséquent, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre la partie C-terminale de chaque isoforme de CDC25, capables de reconnaître tous les variants (excepté CDC25C3 qui est dépourvu de domaine C-terminal). Etant donné que les comparaisons sont effectuées sur des lignées cellulaires différentes, une coloration des membranes de nitrocellulose au rouge Ponceau a été réalisée pour vérifier l'homogénéité des dépôts protéiques.

CDC25A. Une seule bande correspondant à CDC25A1 est détectée (≈ 59 kDa), l'expression de CDC25A2 étant probablement trop faible pour être détectée comme le suggère les moindres niveaux de transcrits observés dans la **figure 21**. Il est également possible que la bande correspondant à CDC25A2 soit confondue avec celle de CDC25A1 en raison de leurs poids moléculaires proches (A2 : ≈ 55 kDa). Les niveaux protéiques de CDC25A sont plutôt similaires entre les différentes lignées cellulaires (**Figure 26**), ce qui ne reflète pas les résultats obtenus précédemment au niveau transcriptionnel.

CDC25B. Une bande d'environ 65 kDa correspondant vraisemblablement à l'isoforme CDC25B3 est à peine détectée dans l'ensemble des lignées testées, excepté dans les cellules Vcr-R dans lesquelles son expression est très élevée (**Figure 26**). Cette observation est en accord avec la surexpression des transcrits *CDC25B* rapportée dans cette lignée. De plus, une bande supplémentaire d'environ 61 kDa est observée exclusivement dans les cellules Vcr-R et pourrait correspondre au variant CDC25B2 comme suggéré par différentes études [Dalvai *et al*, 2011 ; Forrest *et al*, 1999 ; Jullien *et al*, 2011]. Deux bandes autour de 50 kDa ont également été observées dans la plupart des lignées et en particulier dans les cellules Vcr-R et MDA-MB-231 (**Figure 26**). Une étude récente suggère qu'il s'agirait des variants CDC25B6 et B7 dépourvus du domaine N-terminal et jouant un rôle crucial dans le redémarrage du cycle cellulaire après un arrêt en phase G₂ induit par des dommages à l'ADN [Jullien *et al*, 2011]. Les autres isoformes de CDC25B n'ont pu être détectées, probablement à cause de la faible limite de détection de la méthode ou de différences de poids moléculaires limitées.

CDC25C. Deux bandes principales sont observées dans l'ensemble des lignées cellulaires, correspondant probablement aux variants CDC25C1 et CDC25C5 (\approx 53 kDa et 46 kDa respectivement) (**Figure 26**), ces variants étant les plus abondants au niveau transcriptionnel dans l'ensemble des cellules étudiées (**Figure 21**). La spécificité de l'anticorps et la nature de ces deux bandes ont été confortées par l'utilisation d'un autre anticorps (clone 144, résultats non montrés). De plus, de précédents travaux menés au laboratoire ont montré une disparition des deux bandes correspondant à CDC25C1 et C5 dans les cellules MCF-7 traitées par un siRNA spécifique de CDC25C, excluant la possibilité de bandes aspécifiques (thèse d'Elodie Viry). L'expression des protéines CDC25C2 et C4, quant à elle, se situe vraisemblablement au-dessous du niveau de détection. Les résultats obtenus démontrent une absence de corrélation entre les niveaux d'ARNm et de protéines CDC25C. En effet, alors que l'expression globale des transcrits CDC25C est constant dans les différentes lignées, le niveau protéique est plus faible dans toutes les lignées cancéreuses par rapport à la lignée hTERT-HME1 (**Figure 26**).

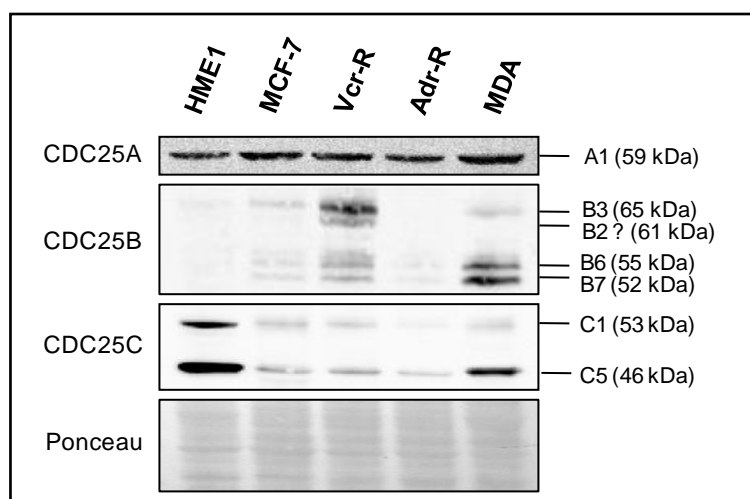


Figure 26. Evaluation des niveaux de protéines CDC25 par immunoblotting dans différentes lignées cellulaires mammaires. Les membranes ont été colorées au rouge Ponceau après transfert pour contrôler la qualité des dépôts protéiques.

Nous avons donc montré que les niveaux protéiques de CDC25 ne reflétaient pas systématiquement les niveaux d'ARNm, particulièrement pour CDC25C. Cette absence de corrélation pourrait être due à des processus de régulation post-transcriptionnels et/ou post-traductionnels influençant l'abondance protéique différemment selon le variant ou la lignée cellulaire considérée.

II.4. Niveau de phosphorylation des CDK

Nous avons recherché une éventuelle relation entre l'expression des CDC25 dans les différentes lignées et leur activité phosphatase. Une surexpression des CDC25, à condition que celle-ci soit associée à une augmentation de l'activité phosphatase, devrait conduire à une diminution du degré de phosphorylation de ses principaux substrats CDK1 et CDK2. L'activité CDC25 a alors été déterminée de manière indirecte en déterminant les niveaux protéiques de CDK1, CDK2 et de leur forme phosphorylée respective par immunoblotting (**Figure 27A**), puis en calculant le rapport CDK phosphorylées/CDK non phosphorylées dans les différentes lignées cellulaires (**Figure 27B**). Les résultats obtenus indiquent que le degré de phosphorylation des CDK n'est pas corrélé à l'expression des CDC25 dans ces lignées. Par exemple, les cellules Vcr-R expriment fortement CDC25B, mais le degré de phosphorylation des CDK n'est pas inférieur à celui des autres lignées cellulaires (**Figure 27A et B**).

Cette absence de corrélation entre l'expression des CDC25 et les niveaux de phosphorylation des CDK dans les différentes lignées cellulaires laisse à penser que la surexpression des CDC25 n'est pas nécessairement associée à une augmentation de l'activité phosphatase et/ou que l'activité des kinases WEE1 et MYT1, responsables de la phosphorylation des CDK, diverge entre les lignées cellulaires.

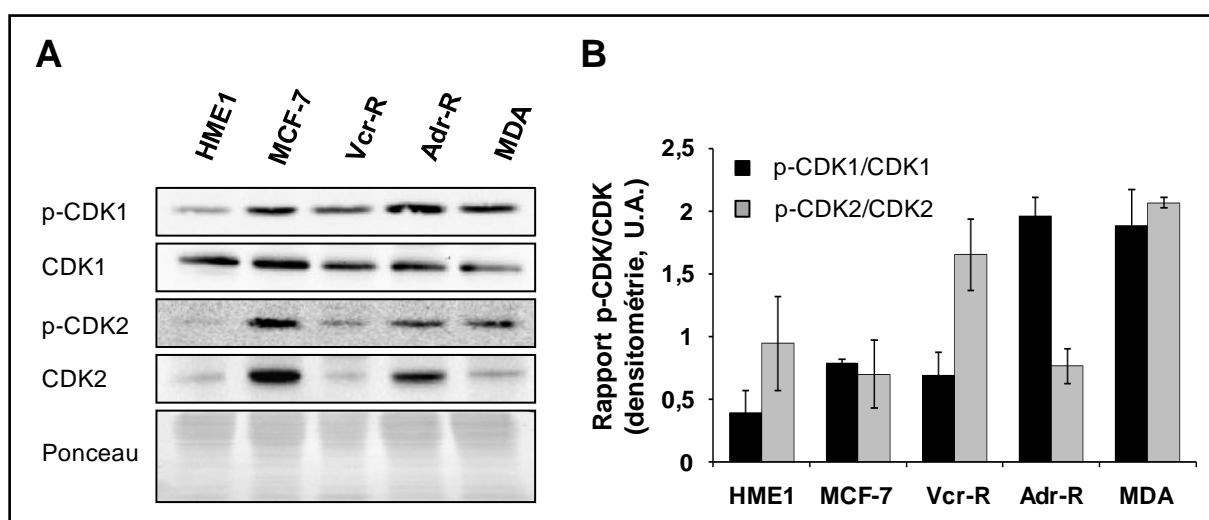


Figure 27. Analyse du niveau de phosphorylation de CDK1 et CDK2 dans différentes lignées cellulaires mammaires. (A) Evaluation du niveau d'expression des protéines CDK1 et CDK2 non phosphorylées et phosphorylées sur Thr14/Tyr15 (p-CDK1 et p-CDK2) par immunoblotting. Les membranes ont été colorées au rouge Ponceau après transfert pour contrôler la qualité des dépôts protéiques. (B) Quantification de deux immunoblots indépendants par densitométrie. Les valeurs indiquent la moyenne \pm écart-type des rapports entre les formes phosphorylées et non-phosphorylées de CDK1 et CDK2.

II.5. Conclusions de la caractérisation des lignées cellulaires

Cette étude menée sur diverses lignées cellulaires sensibles et résistantes à certains agents anticancéreux, en comparaison à la lignée non cancéreuse hTERT-HME1, a permis de confirmer l'importance de la considération de l'épissage alternatif de *CDC25* en vue d'améliorer leur intérêt clinique, puisque nous avons observé que les transcrits alternatifs de *CDC25* étaient exprimés de manière différentielle dans ces lignées cellulaires. En particulier, nos résultats suggèrent que les variants *CDC25A2* et *B2* ainsi qu'une augmentation du rapport *CDC25C5/C1* pourraient être associés au développement de la résistance multiple aux médicaments dans les cellules cancéreuses. Cependant, l'utilisation de ces variants comme biomarqueurs pronostique et prédictif pourrait être contrariée par l'absence de corrélation entre l'expression transcriptionnelle de *CDC25*, leur niveau protéique (notamment de *CDC25C*) et le degré de phosphorylation de leurs substrats CDK.

Un point essentiel nécessitant d'être discuté concerne la pertinence du choix des cellules hTERT-HME1 comme modèle de cellules non cancéreuses dans notre étude. En effet, nous avons observé des niveaux d'expression de *CDC25* très similaires entre ces cellules et les cellules MCF-7 (**Figures 21 à 24**), remettant en question l'intérêt de ce contrôle. Il est important de noter que la lignée hTERT-HME1 a été transformée et possède une activité proliférative intense qui s'apparente à celle de la lignée cancéreuse MCF-7 (temps de doublement de 24 à 25 h pour hTERT-HME1 contre 29 h pour MCF-7). De surcroît, il a été montré que les lignées épithéliales mammaires immortalisées présentaient de nombreuses similitudes avec les formes précoces de croissance aberrante observées dans le cancer du sein, essentiellement en ce qui concerne les gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire [Li *et al*, 2007]. Ces observations suggèrent donc que la lignée hTERT-HME1 n'est probablement pas le contrôle le plus adapté dans le cadre d'une étude sur la régulation du cycle cellulaire de cellules cancéreuses. Il aurait été plus judicieux d'utiliser des lignées primaires non cancéreuses comme modèle de référence, mais l'utilisation de ce type de cellules est compliquée à la fois par leur difficulté d'obtention et par leur nombre de division limité en culture.

Afin de confirmer l'implication préférentielle de certains variants d'épissage de *CDC25* dans le cancer du sein, une autre approche a été envisagée pour la suite de notre étude, consistant en la comparaison de l'expression de ces variants entre le tissu tumoral et le tissu "normal" environnant, obtenus après exérèse chez des patientes atteintes d'un cancer du sein.

III. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES VARIANTS D'ÉPISSAGE DE CDC25 DANS DES TUMEURS PRIMAIRES DE SEIN

III.1. Physiopathologie du cancer du sein

Avant de présenter et de discuter les résultats obtenus sur les échantillons tissulaires issus de patientes atteintes d'un cancer du sein, il nous a paru nécessaire de rappeler brièvement les principes de bases de l'anatomie mammaire et de la classification des tumeurs du sein, afin d'explicitier le vocabulaire médical essentiel à la bonne compréhension de notre étude.

III.1.1. Rappel d'anatomie du tissu mammaire

Le sein est un organe pair en forme de cône arrondi à base thoracique, dont le sommet est constitué du mamelon entouré de l'aréole (**Figure 28**). Les seins reposent sur le muscle pectoral et sont soutenus par un système constitué par la peau et par les ligaments de Cooper.

Le tissu glandulaire, responsable de la production exocrine de lait, est constitué de 15 à 20 lobes composés de nombreux lobules et acini qui sont drainés par les canaux galactophores transportant le lait jusqu'au mamelon. La glande mammaire est entourée de tissu conjonctif et d'un abondant tissu adipeux.

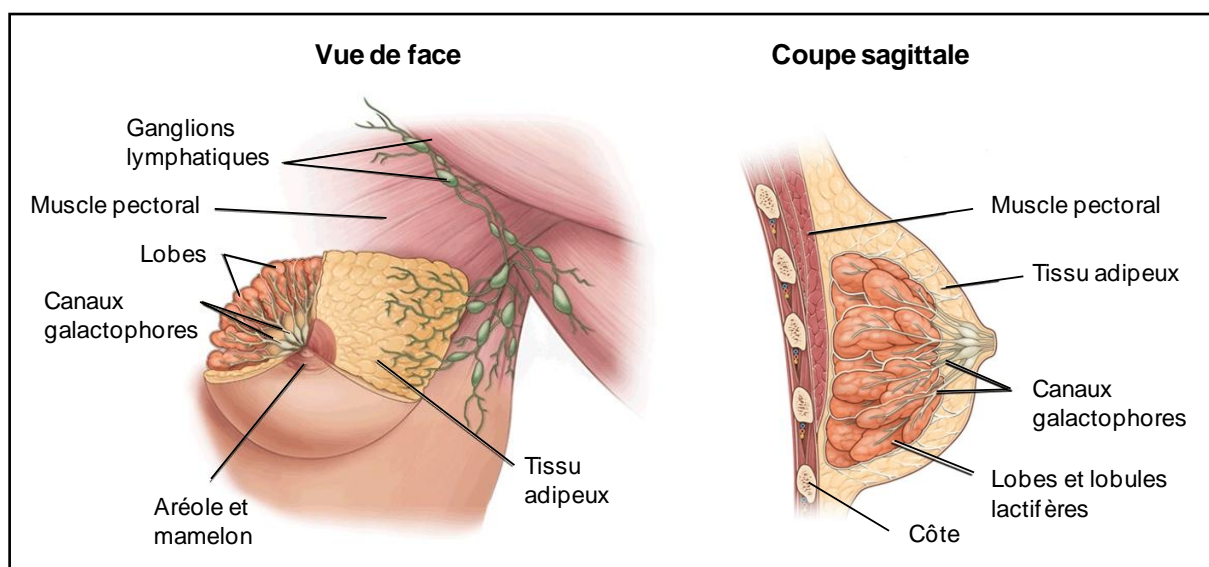


Figure 28. Anatomie du sein et système lymphatique mammaire.
[<http://www1.uabhealth.org/Cancer/P071110>]

Le sein est richement vascularisé. La moitié interne du sein est vascularisée par les branches perforantes de l'artère thoracique (ou mammaire) interne, ainsi que par les petites branches des artères intercostales antérieures. La moitié externe du sein est drainée par les branches thoraco-acromiale et thoracique latérale de l'artère axillaire. Le drainage veineux du sein est principalement dirigé vers la veine axillaire, mais aussi partiellement vers les veines mammaires internes.

En parallèle, le sein est drainé par le système lymphatique. Les cadrans externes du sein sont drainés vers le creux axillaire (ganglion de Sorgius) pour finir dans le ganglion sus-claviculaire. Les cadrans internes sont drainés principalement sous le sternum par les ganglions de la chaîne mammaire interne, puis par le relais sus-claviculaire.

III.1.2. Le diagnostic du cancer du sein

En cas de suspicion de cancer du sein suite à une palpation mammaire, une mammographie est réalisée. Si les lésions mammaires ne sont pas suffisamment suspectes sur le plan clinique et radiologique pour imposer d'emblée une intervention chirurgicale, un prélèvement (biopsie) par ponction à l'aiguille échoguidée ou radioguidée est préconisé et constitue une alternative moins contraignante psychologiquement et économiquement que l'acte chirurgical. Dans tous les cas, un examen anatomopathologique de la biopsie et/ou de la pièce opératoire est indispensable pour confirmer avec certitude le diagnostic.

III.1.3. Les différents types histologiques de carcinomes mammaires

Il existe différents types histologiques de cancer du sein. Les sarcomes du sein sont rares et ne représentent que 1% des tumeurs malignes. Nous nous intéresserons donc uniquement aux carcinomes qui représentent la quasi-totalité des cancers du sein. La très grande majorité des adénocarcinomes mammaires se développent aux dépens de l'épithélium des canaux galactophores ou des lobules glandulaires, on parle respectivement de carcinome canalaire ou lobulaire.

Deux grands types de carcinomes peuvent être distingués selon leur degré d'invasion : le carcinome *in situ* et le carcinome infiltrant (**Tableau 2**). Dans le cas d'un carcinome *in situ*, la prolifération tumorale maligne reste cantonnée à l'intérieur des canaux (intracanaire) ou des lobules (intra-lobulaire), sans franchir la membrane basale. Le carcinome canalaire *in situ* est le plus répandu. Ces tumeurs *in situ* sont curables dans 98% des cas, mais peuvent évoluer

vers un carcinome infiltrant en l'absence de traitement. A noter que le carcinome lobulaire n'est pas réellement considéré comme une lésion maligne, mais davantage comme un facteur de risque de cancer du sein. A l'inverse, dans le cas d'un carcinome infiltrant, les cellules tumorales envahissent le tissu mammaire environnant et peuvent éventuellement se disséminer vers les ganglions lymphatiques (adénopathies) ou vers d'autres organes (métastases). Les carcinomes canaux et lobulaires représentent à eux deux la quasi-totalité des carcinomes mammaires infiltrants (environ 90%). Cependant, d'autres formes histologiques particulières et rares peuvent être observées telles que les carcinomes mucineux, médullaire, papillaire, tubuleux... Certaines de ces formes sont de meilleur pronostic que le carcinome canalaire infiltrant [Yerushalmi *et al*, 2009].

Tableau 2. Classification histologique des carcinomes mammaires [classification OMS, 2003].

Carcinomes non infiltrants
Carcinome canalaire <i>in situ</i> : quatre principaux types architecturaux (massif, en comédons, papillaire, cribriforme)
Carcinome lobulaire <i>in situ</i>
Carcinomes infiltrants
Carcinome canalaire infiltrant sans autre indication : très fréquent (environ 80% des carcinomes infiltrants), groupe hétérogène de morphologie très variable
Carcinome canalaire infiltrant avec composante intracanaulaire prédominante : la proportion de carcinome intracanaulaire est au moins 4 fois plus importante que celle de la composante infiltrante
Carcinome lobulaire infiltrant : relativement fréquent (5 à 15%), cellules de petite taille, peu cohésives, avec peu de mitoses, dispersées ou arrangées en file indienne au sein d'un stroma fibreux
Carcinome mucineux (ou colloïde) : peu fréquent (2%), riche en mucus épithélial extra-cellulaire, bon pronostic
Carcinome médullaire : peu fréquent (1 à 6%), plages syncytiales de grandes cellules pléomorphes, à noyau vésiculeux et à nucléole proéminent, contours bien limités
Carcinome papillaire : rare, pronostic favorable
Carcinome tubuleux : très bien différencié et entouré d'un abondant stroma fibreux, pronostic favorable
Carcinome adénoïde kystique : rare, croissance lente
Carcinome sécrétant juvénile : rare, chez les jeunes patients, nodule ferme souvent rétroaréolaire, bien limité, pronostic favorable
Carcinome apocrine : présence de cellules tumorales à cytoplasme abondant éosinophile
Carcinome métaplastique : peu fréquent (1 à 5%), de type épidermoïde, à cellules fusiformes, chondroïde, osseux ou mixte
Autres (carcinome riche en lipides, carcinome à petites cellules, carcinome à cellules en bague à chaton, etc...)
Maladie de Paget du mamelon
Infiltration épidermique mamelonnaire par des cellules carcinomateuses, sans infiltration du derme sous-jacent. Cette lésion est en général associée à un carcinome mammaire intracanaulaire ou canalaire infiltrant sous-jacent.

III.1.4. Extension du cancer du sein

La **multifocalité** du cancer du sein, c'est-à-dire la présence de multiples foyers néoplasiques dans une même zone du sein, est un phénomène fréquent avec une prévalence de 13 à 75% [Bendifallah *et al*, 2010]. Elle est très souvent associée à une forte composante intracanalair et dépend de la taille de la tumeur. La multifocalité représente généralement un obstacle à la chirurgie conservatrice.

L'**envahissement ganglionnaire** est fréquent, puisqu'il est observé dans près de la moitié des cas de cancers du sein [van Nes *et al*, 2010]. C'est un facteur de mauvais pronostic, important dans la prise de décision thérapeutique. L'examen clinique n'est pas fiable pour apprécier un envahissement ganglionnaire et doit être complété par un curage axillaire (exérèse des ganglions axillaires) associé à une analyse histopathologique des ganglions prélevés. Cette opération engendre de nombreux effets secondaires indésirables et notamment l'apparition d'un lymphœdème. Afin de limiter les risques de séquelles, il est de plus en plus courant de limiter le curage axillaire aux 10 à 20 premiers ganglions de la chaîne, situés au bas de l'aisselle. Pour les tumeurs de petite taille (≤ 2 cm), un procédé moins invasif et traumatisant a été décrit au début des années 1990 et est aujourd'hui employé de manière quotidienne : la technique du ganglion sentinelle. Cette technique consiste à identifier le premier ganglion recevant le drainage lymphatique de la tumeur grâce à l'injection d'un colorant et/ou d'un colloïde radioactif, puis à prélever et à analyser ce ganglion. Un curage axillaire n'est réalisé que si le ganglion sentinelle est atteint. Ce procédé a donc l'avantage d'éviter des curages axillaires inutiles dans 70% des cas, le risque d'envahissement ganglionnaire n'étant que de 30% dans les petites tumeurs.

L'**envahissement métastatique**. Bien que l'atteinte métastatique soit plus fréquente en cas d'envahissement ganglionnaire, les deux modes de dissémination lymphatique et hématologique sont indépendants. En effet, les cellules métastatiques ne passent pas nécessairement par un relais ganglionnaire pour aboutir dans la circulation sanguine. Environ 25 à 40% des patientes développent des métastases à distance au cours de l'évolution de leur maladie, bien que moins de 5% d'entre elles présentent des métastases au moment du diagnostic initial [Guarneri et Conte, 2004]. Le cancer du sein métastase essentiellement dans les os, les poumons, le foie et le cerveau, mais aussi à moindre mesure dans la plèvre, la peau ou les ovaires. La plupart des recommandations proposent actuellement un bilan d'extension comportant une prise de sang, une radiographie pulmonaire, une échographie hépatique et une

scintigraphie osseuse. Pour les tumeurs de petite taille, ce bilan peut être facultatif. En revanche, pour les tumeurs de stade avancé (tumeurs inflammatoires, multifocales, avec un envahissement ganglionnaire important), le risque métastatique est élevé et peut justifier un bilan plus poussé. La survie médiane des patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique est seulement de 2 à 4 ans (variable selon la nature et le nombre des organes infectés) et cette maladie est aujourd'hui encore considérée comme incurable [Guarneri et Conte, 2004].

III.1.5. Notions de classification des tumeurs de sein et facteurs pronostiques

La mise en place d'un axe thérapeutique optimal et personnalisé nécessite de connaître les paramètres cliniques et anatomopathologiques associés à la tumeur, ainsi que les niveaux d'expression de certains biomarqueurs. Afin d'uniformiser les procédés thérapeutiques, des recommandations internationales ont été établies.

a) Le système TNM

La classification TNM est basée sur l'estimation de la taille (T) de la tumeur primitive dans sa plus grande longueur, sur l'état d'envahissement des ganglions lymphatiques (N : *Node*) et sur la présence de métastases (M) à distance (**Tableau 3**). Chacun de ces trois termes est assorti de chiffres ou de lettres permettant de décrire plus précisément la maladie cancéreuse. Cette classification est établie avant tout geste thérapeutique et ne doit pas être modifiée par les données nouvelles apportées suite au traitement ou à l'évolution de la maladie. La classification TNM est basée dans un premier temps sur une évaluation purement clinique, mais doit être précisée par un examen anatomopathologique après chirurgie (classification pTNM) [Sobin *et al*, 2009].

La classification TNM permet finalement de déterminer le stade du cancer du sein au moment du diagnostic en établissant une gradation de I à IV proportionnelle à la sévérité du pronostic (**Tableau 4**). Elle est également devenue indispensable pour dicter les choix de thérapie adjuvante.

Tableau 3. Classification TNM du cancer du sein [d'après Sobin *et al*, 2009].

T- Tumeur primitive	
Tx	Détermination de la tumeur primitive impossible
T0	Pas de signe de tumeur primitive
Tis	Carcinome <i>in situ</i> (ou maladie de Paget du mamelon)
T1	Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande longueur
T1mi	microinvasion ≤ 0,1 cm
T1a	tumeur ≤ 0,5 cm
T1b	tumeur ≤ 1 cm
T1c	tumeur ≤ 2 cm
T2	Tumeur > 2 cm et ≤ 5 cm dans sa plus grande longueur
T3	Tumeur > 5 cm dans sa plus grande longueur
T4	Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau
T4a	Extension à la paroi thoracique
T4b	Œdème ou ulcération cutanée ou nodules de perméation cutanés
T4c	A la fois T4a et T4b
T4d	Carcinome inflammatoire
N- Adénopathies régionales	
Nx	Appréciation de l'atteinte ganglionnaire impossible
N0	Absence d'adénopathie perceptible cliniquement
N1	
pN1mi	micrométastases > 0,2 mm et ≤ 2 mm
pN1a	Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires
pN1b	Envahissement de la chaîne mammaire interne détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
pN1c	A la fois pN1a et pN1b
N2	
pN2a	Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires
pN2b	Envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire
N3	
pN3a	Envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou des ganglions sous-claviculaires
pN3b	Envahissement des ganglions mammaires internes homolatéraux suspects avec envahissement ganglionnaire axillaire ou envahissement de plus de 3 ganglions axillaires et envahissement des ganglions de la chaîne mammaire interne détecté sur ganglion sentinelle sans signe clinique
pN3c	Envahissement des ganglions sus-claviculaires homolatéraux
M- Métastases à distance	
Mx	Détermination de l'extension métastatique impossible
M0	Absence de métastases à distance
M1	Présence de métastases à distance

Tableau 4. Les stades TNM du cancer du sein [d'après Sobin *et al*, 2009].

Stade	T	N	M
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade IA	T1	N0	M0
Stade IB	T0, T1	N1mi	M0
Stade IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stade IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stade IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stade IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stade IIIC	Tout T	N3	M0
Stade IV	Tout T	Tout N	M1

b) Le grade SBR

Le grade SBR (ou grade de Scarff, Bloom et Richardson) est le système le plus utilisé actuellement pour déterminer le grade histopronostique et apprécier indirectement l'activité proliférative de la tumeur. Le grade SBR est étudié sur tous les types histologiques de cancer infiltrant, excepté le carcinome médullaire. Il est basé sur l'évaluation de trois critères histologiques : la différenciation architecturale (formation de tubules), le degré d'anisocaryose (irrégularité des noyaux) et la fréquence des mitoses. Un score allant de 1 à 3 est attribué à chacun de ces critères. Le grade histologique résulte de l'addition de ces scores :

- Le grade I, de bon pronostic, correspondant à un score total entre 3 et 5
- Le grade II, de pronostic intermédiaire, score entre 6 et 7
- Le grade III, de mauvais pronostic, score entre 8 et 9

L'inconvénient de cette classification est son manque de reproductibilité, car son évaluation est très dépendante de l'interprétation anatomopathologique. Pour cette raison la modification d'Elston et Ellis est actuellement recommandée. Elle reprend les trois critères du grade SBR en les précisant afin d'améliorer la reproductibilité de la gradation et sa valeur pronostique [Elston et Ellis, 1991].

c) Evaluation des biomarqueurs

Comme évoqué précédemment dans le chapitre « Introduction » (cf. paragraphe I.3.1.), différents biomarqueurs sont évalués en routine dans la pratique clinique afin d'informer sur le pronostic d'une part et d'orienter les stratégies thérapeutiques d'autre part. Le statut des récepteurs hormonaux RE et RP est déterminé par immunohistochimie et est jugé positif sans objection au-delà de 10% de cellules marquées [Moriya *et al*, 2010]. Un statut positif permet d'envisager une hormonothérapie. De plus, la surexpression et l'amplification du récepteur HER2 est recherchée par immunohistochimie et/ou FISH. La tumeur est considérée comme HER2-positif lorsque plus de 30% des cellules cancéreuses présentent un marquage membranaire intense [Moriya *et al*, 2010]. Dans ce cas, une thérapie ciblée à base d'Herceptine est recommandée. Enfin, le marqueur de prolifération Ki-67 apporte une information pronostique importante et commence à être intégré à la pratique clinique, bien qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus international concernant la technique à utiliser et définissant la valeur seuil [Goldhirsh *et al*, 2009].

d) Signatures moléculaires

Aujourd'hui les signatures multigéniques de type luminal A, luminal B, HER2-enrichi et triple négatif, décrites dans le chapitre « Introduction » (cf. paragraphe I.3.3.), tendent à supplanter l'utilisation des paramètres clinicopathologiques classiques en tant que facteurs pronostiques ainsi que dans la prise de décision thérapeutique [Prat et Perou, 2011].

III.2. Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des tumeurs mammaires étudiées

Le groupe de patientes étudié est composé de 75 patientes (nous avons exclu tout prélèvement d'origine masculine) atteintes d'un cancer du sein primitif, sans autre pathologie connue, et n'ayant subi aucun traitement chimio- ou radio-thérapeutique avant exérèse de leur tumeur. Le diagnostic ainsi que le traitement chirurgical ont été effectués à l'Hôpital São Francisco Xavier de Lisbonne (Portugal). Les données cliniques concernant les patientes ainsi que les caractéristiques histopathologiques des tumeurs nous ont été transmises par le Service d'Anatomie Pathologique de façon anonymée et sont regroupées dans le **tableau 5**.

Tableau 5. Données cliniques des patientes et caractéristiques histologiques des tumeurs.

Paramètre	n	(%)	Paramètre	n	(%)
Âge			Stade pTNM		
≤ 40 ans	4	5,3	I	18	24,0
41-50 ans	7	9,3	II	14	18,7
51-60 ans	17	22,7	III	0	0,0
61-70 ans	19	25,3	IV	11	14,7
> 70 ans	17	22,7	N.I.	32	42,6
N.I.	11	14,7			
Type histologique			HER2		
Adénocarcinome canalaire	63	84,0	Négatif	52	69,3
Adénocarcinome lobulaire	6	8,0	Positif	19	25,3
Autres	4	5,3	N.D.	4	5,4
N.I.	2	2,7			
Taille de la tumeur			Récepteurs aux œstrogènes		
≤ 1,5 cm	26	34,7	Négatif	10	13,3
≤ 2,5 cm	30	40,0	Positif	65	86,7
> 2,5 cm	17	22,7			
N.I.	2	2,6			
Métastases			Récepteurs à la progestérone		
Négatif	47	62,7	Négatif	22	29,3
Positif	12	16,0	Positif	53	70,7
N.D.	16	21,3			
Grade histologique (SBR)			Classification moléculaire		
I	10	13,3	Luminal A	49	65,3
II	37	49,3	Luminal B	16	21,3
III	21	28,0	HER2-enrichi	3	4,0
N.I.	7	9,4	Triple négatif	7	9,4

N.I. : non indiqué sur la fiche fournie par le service d'anatomopathologie ; N.D. : non déterminé.

L'âge médian de notre population est de 62 ans, l'étendue des valeurs allant de 30 à 85 ans. Cette observation est en adéquation avec l'âge médian au moment du diagnostic relevé dans la population générale qui est de 61 ans. La grande majorité des tumeurs sont de type canalaire infiltrant (84%) conformément à la littérature, les autres étant de type lobulaire (8%) ou de type plus rare (trois carcinomes mucineux et un carcinome apocrine). Parmi les tumeurs analysées, 87% et 71% possèdent des récepteurs à l'œstradiol et à la progestérone respectivement. De plus, l'oncoprotéine HER2 est exprimée dans 25% des tumeurs, ce qui correspond à la proportion habituellement observée. De même, les proportions des différentes signatures moléculaires (luminal A, luminal B, HER2-enrichi et triple négatif) sont relativement conformes aux proportions habituellement relevées dans les tumeurs de sein (cf. « Introduction », paragraphe I.3.3.). En somme, le groupe d'échantillons étudié peut être

considéré comme représentatif de la population générale des femmes atteintes d'un cancer du sein.

III.3. Mesure de l'expression des transcrits alternatifs de *CDC25* dans les tumeurs de sein

Nous avons évalué l'expression des transcrits alternatifs de *CDC25* dans les tissus tumoraux et péri-tumoraux appariés grâce à la méthode de RT-PCR quantitative décrite précédemment (**Figure 18**). Il est important à ce stade de discuter du choix du tissu de référence. Lors de la mise en place du protocole avec les cliniciens, la question du tissu de référence s'est imposée. L'éventualité d'utiliser des tissus mammaires non cancéreux obtenus lors de réductions mammaires ou d'exérèses d'adénofibromes, de mastopathies bénignes, etc. a été envisagée. Néanmoins, le choix de ce type de tissu comme référence présente l'inconvénient majeur de ne pas tenir compte de la variabilité interindividuelle. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser le tissu péri-tumoral, directement adjacent à la tumeur, comme référence pour chaque patiente. Même s'il n'est pas exclu que certaines propriétés du tissu péri-tumoral puissent être distinctes de celles du tissu sain, essentiellement en réponse à certains facteurs paracrines ou endocrines sécrétés par les cellules cancéreuses, nous estimons que celui-ci reste la référence la plus proche du tissu sain. Par précaution, nous avons cependant préféré ne jamais parler de tissu "sain" et conserver le qualificatif "péri-tumoral".

Les résultats d'expression ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) des différents transcrits de *CDC25* obtenus par RT-PCR quantitative sur les 75 paires de tissus de cancer du sein sont présentés en « Annexes » (**Figures 54, 55 et 56**). Une surexpression des transcrits a été considérée pour une valeur de rapport d'expression relative $2^{-\Delta\Delta C_T} \geq 2$. A l'inverse, l'expression des transcrits a été considérée comme constante entre le tissu tumoral et péri-tumoral apparié pour $2^{-\Delta\Delta C_T} < 2$ et $> 0,5$ et régulée négativement pour $2^{-\Delta\Delta C_T} \leq 0,5$ (**Tableau 6**).

CDC25A. Une surexpression de *CDC25A* globale a été observée dans 64% des tumeurs de sein étudiées et est étroitement liée à la surexpression du variant *CDC25A1* (69%) (**Tableau 6**). A noter que l'expression du variant d'épissage *CDC25A2* n'a pas pu être évaluée dans ces tissus en raison d'un trop faible niveau d'expression ne permettant pas d'obtenir des résultats suffisamment répétables et fiables. La valeur médiane du rapport d'expression relative dans les tumeurs surexprimant *CDC25A* et *CDC25A1* est de 9 et 12

respectivement (**Tableau 6**), ce qui signifie plus trivialement que l'expression de ces transcrits est augmentée d'un facteur 10 environ entre le tissu tumoral et le tissu péri-tumoral apparié. Nos résultats sont en accord avec la surexpression de *CDC25A* précédemment rapportée dans 34 à 70% des tumeurs de sein selon les études [Cangi *et al*, 2000 ; Ito *et al*, 2004 ; Königsberg *et al*, 2008 ; Mehdipour *et al*, 2009].

Tableau 6. Bilan de l'expression des transcrits de *CDC25* dans les tumeurs de sein.

CDC25	A globale	A1	B globale	B1	B2	C globale	C1	C5
Surexpression	48/75 64,0%	52/75 69,3%	41/75 54,7%	35/75 46,7%	16/75 21,3%	55/73 75,3%	31/73 42,5%	57/66 86,4%
<i>Médiane</i> $2^{-\Delta\Delta C_T}$	9,0	11,5	7,8	6,5	8,9	38,5	6,5	90,6
$[2^{-\Delta\Delta C_T} \text{ minimum}]$	[2,0]	[2,2]	[2,0]	[2,1]	[2,8]	[2,0]	[2,0]	[2,2]
$[2^{-\Delta\Delta C_T} \text{ maximum}]$	[13170,3]	[5019,5]	[28625,2]	[1152,1]	[1888,9]	[9345,1]	[922,9]	[5269,1]
Expression constante	17/75 22,7%	13/75 17,3%	26/75 34,7%	24/75 32,0%	35/75 46,7%	4/73 5,5%	25/73 34,3%	3/66 4,6%
Sous-expression	10/75 13,3%	10/75 13,3%	8/75 10,7%	16/75 21,3%	24/75 32,0%	14/73 19,2%	17/73 23,3%	6/66 9,1%

Surexpression ($2^{-\Delta\Delta C_T} \geq 2$), expression constante ($2^{-\Delta\Delta C_T} < 2$ et $> 0,5$), sous-expression ($2^{-\Delta\Delta C_T} \leq 0,5$).

CDC25B. L'expression globale de *CDC25B* est augmentée dans 55% des tumeurs analysées. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par Ito *et al* [2004] (57%) et à moindre mesure par Galaktionov *et al* [1995] (32%). Concernant l'expression des variants d'épissage, *CDC25B1* est surexprimé dans 47% des tumeurs et apparaît donc fortement lié à l'expression globale de *CDC25B*, alors que le variant *CDC25B2* est surexprimé dans seulement 21% des tumeurs (**Tableau 6**). Ces résultats sont en contradiction avec l'augmentation d'expression de *CDC25B2* observée dans le cancer colorectal (dans 79% des tumeurs) et le lymphome non-hodgkinien (39%) [Hernández *et al*, 2000, 2001], ce qui laisse à penser que ce variant d'épissage jouerait un rôle moindre dans le développement du cancer du sein. Dans notre étude, nous n'avons pas pu évaluer l'implication du variant *CDC25B3* pour les raisons techniques énoncées précédemment (cf. « Résultats », paragraphe II.2.). Toutefois, une surexpression du transcrit *CDC25B3* a été rapportée dans le cancer du pancréas [Guo *et al*, 2004] et il n'est pas exclu que ce variant pourrait également contribuer à l'augmentation d'expression globale de *CDC25B* observée dans les tumeurs mammaires.

CDC25C. L'expression de *CDC25C* est globalement plus faible que celle des isoformes *CDC25A* et *CDC25B*, se traduisant par des valeurs de C_T plus tardives lors de la réaction de

PCRq (résultats non montrés). Aucune expression n'a d'ailleurs pu être détectée dans le tissu tumoral pour deux des patientes (absence d'amplification lors de la PCRq). En outre, la valeur de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de *CDC25C* est sous-estimée dans 16 tumeurs en raison d'une absence d'expression détectable dans le tissu péri-tumoral (**Figure 56**). Cependant, une surexpression de *CDC25C* globale a été observée dans 75% des tumeurs avec un rapport d'expression relative médian de 39 (**Tableau 6**), bien supérieur aux valeurs médianes obtenues pour *CDC25A* et *CDC25B* (9 et 8 respectivement). Ces résultats font apparaître clairement un rôle prépondérant de *CDC25C* dans le cancer du sein, n'ayant jamais été envisagé jusqu'à présent. En effet, les précédentes études s'intéressant à l'expression des CDC25 dans le cancer du sein se sont focalisées sur les isoformes *CDC25A* et *CDC25B*, négligeant totalement *CDC25C* [Bonin *et al*, 2006 ; Cangi *et al*, 2000 ; Ito *et al*, 2004 ; Königsberg *et al*, 2008 ; Mehdipour *et al*, 2009], à l'exception de l'équipe de Galaktionov [Galaktionov *et al*, 1995]. Néanmoins, ils n'ont pu détecter d'expression de *CDC25C* ni dans les tissus normaux, ni dans les tissus tumoraux, probablement en raison de l'utilisation d'une technique trop peu sensible (hybridation *in situ* avec des ribosondes antisens). Une surexpression de *CDC25C* a cependant été rapportée dans quelques autres types de cancer comme les carcinomes du colon (dans 26% des tumeurs) et de la vulve (63%) [Hernández *et al*, 2001 ; Wang *et al*, 2010].

Nous avons démontré au cours de l'étude précédente menée sur différentes lignées de cancer du sein, que la considération des variants d'épissage de *CDC25C* était indispensable, les profils d'épissage variant considérablement d'une lignée à l'autre (**Figure 24**). Nous avons donc évalué l'expression des transcrits principaux *CDC25C1* et *CDC25C5* dans les tumeurs de sein. Le variant *CDC25C5* est surexprimé dans de nombreuses tumeurs (86%) alors que *CDC25C1* n'est surexprimé que dans la moitié d'entre elles (43%). De plus, le niveau d'induction médian est largement supérieur pour *CDC25C5* par rapport à *CDC25C1* (la médiane de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ étant de 91 vs 7 respectivement) (**Tableau 6**). Ces résultats suggèrent l'implication préférentielle du transcrit court *CDC25C5* dans le cancer du sein, comme précédemment rapporté dans le cancer de la prostate [Ozen *et al*, 2005].

III.4. Recherche de relations entre l'expression des différents transcrits de *CDC25*

Nous avons tenté de mettre en évidence des liens entre l'expression des différents transcrits de *CDC25* les uns avec les autres. Le but de cette démarche étant de savoir si la

surexpression des *CDC25* est isoforme- ou variant-spécifique dans le cancer du sein ou au contraire si les expressions de plusieurs transcrits sont liées entre elles.

A cet effet, nous avons utilisé un test non paramétrique de dépendance, le test de coefficient de corrélation des rangs de Spearman, qui permet la mise en évidence d'une éventuelle relation monotone entre deux séries de données. Plus précisément, si la valeur du coefficient de Spearman (r_s) s'éloigne significativement de 0, l'hypothèse nulle selon laquelle les variables considérées sont indépendantes est rejetée.

Les résultats de ce test, présentés dans le **tableau 7**, indiquent que les expressions des différents transcrits de *CDC25* analysés sont toutes significativement associées entre elles, suggérant que la dérégulation d'expression des trois gènes de *CDC25* pourrait faire intervenir des mécanismes communs.

Tableau 7. Corrélations entre l'expression des différents transcrits de *CDC25*.

	A1	B globale	B1	B2	C globale	C1	C5
A globale	0,904 (75) <0,0001	0,754 (75) <0,0001	0,547 (75) <0,0001	0,528 (75) <0,0001	0,539 (73) <0,0001	0,420 (73) 0,0002	0,412 (66) 0,0006
A1		0,761 (75) <0,0001	0,523 (75) <0,0001	0,505 (75) <0,0001	0,576 (73) <0,0001	0,338 (73) 0,0034	0,395 (66) 0,0010
B globale			0,644 (75) <0,0001	0,560 (75) <0,0001	0,487 (73) <0,0001	0,279 (73) 0,0167	0,257 (66) 0,0376
B1				0,598 (75) <0,0001	0,393 (73) 0,0006	0,597 (73) <0,0001	0,357 (66) 0,0032
B2					0,425 (73) 0,0002	0,472 (73) <0,0001	0,249 (66) 0,0441
C globale						0,439 (73) <0,0001	0,385 (66) 0,0014
C1							0,511 (66) <0,0001

Les résultats présentés dans le tableau correspondent à la valeur du coefficient de corrélation des rangs de Spearman (r_s), au nombre d'échantillons analysés (entre parenthèses) et à la valeur p . Les corrélations significatives ($p < 0,05$) sont en caractères gras.

Les voies de régulation responsables de la surexpression des *CDC25* au cours de la transformation néoplasique ne sont pas totalement élucidées à ce jour, mais semblent diverger

selon le type de cancer. Par exemple, l'incidence de la surexpression des transcrits *CDC25A* apparaît indépendante de celle des transcrits *CDC25B* dans le cancer du poumon, puisque seules 30% des tumeurs surexpriment ces deux isoformes simultanément, contre 45% des tumeurs surexprimant l'une ou l'autre, laissant à penser que la surexpression de ces gènes pourrait être causée par des voies distinctes [Wu *et al*, 1998]. A l'inverse, Xing *et al* ont trouvé une corrélation significative entre l'expression de *CDC25A* et *CDC25B* dans le cancer gastrique, ainsi qu'entre l'expression de ces deux isoformes et celle du facteur de transcription *MYC* [Xing *et al*, 2008]. Ces résultats indiquent que la surexpression de *CDC25A* et *CDC25B* pourrait être liée à l'activation transcriptionnelle médiée par *MYC* dans ce type de cancer [Galaktionov *et al*, 1996]. Les résultats de notre étude suggèrent qu'une partie des tumeurs de sein feraient intervenir des mécanismes capables de réguler l'expression des trois gènes de *CDC25* simultanément. Dans ce contexte, le gène suppresseur de tumeur *p53*, muté dans plus de 30% des tumeurs mammaires [Børresen-Dale, 2003] pourrait être incriminé, en raison de sa capacité à réprimer la transcription des trois isoformes de *CDC25* [Dalvai *et al*, 2011 ; Demidova *et al*, 2009 ; Manni *et al*, 2001 ; Zwicker *et al*, 1995]. Cette hypothèse est confortée par une étude ayant montré que les tumeurs de sein exprimant un gène *p53* muté présentaient des niveaux d'expression de *CDC25B* et *CDC25C* plus élevés que les tumeurs exprimant la version sauvage de *p53* [Troester *et al*, 2006]. Afin d'éclaircir cette question, il serait intéressant d'analyser l'expression ainsi que les mutations de *p53* dans notre groupe de patientes. L'intervention d'autres mécanismes encore inconnus n'est cependant pas exclue.

III.5. Recherche de corrélations entre l'expression des transcrits *CDC25* et les paramètres cliniques et anatomopathologiques des tumeurs

Nous avons ensuite recherché une éventuelle relation entre l'expression des transcrits *CDC25* et certains paramètres cliniques et histopathologiques des tumeurs connus pour leur valeur pronostique. Le choix des tests statistiques appropriés a été fait sur les conseils du Professeur Armand Maul, biostatisticien à l'Université Paul Verlaine-Metz.

D'un point de vue purement statistique, les données cliniques et histopathologiques peuvent être considérées soit comme des variables qualitatives (grade, type histologique, classification moléculaire), voire binaires (négatif/positif), soit comme des variables continues (âge des patientes, taille des tumeurs). Différents test statistiques ont été utilisés selon le type de variables.

III.5.1. Variables qualitatives

Nous avons élaboré différents sous-groupes de l'échantillon de 75 patientes en fonction d'une variable spécifique qualitative. L'expression de chaque transcrite de *CDC25* a alors été appréciée en fonction du sous-groupe considéré. Des tests non paramétriques d'homogénéité ont été utilisés pour mesurer la différence existant entre deux sous-groupes (test de Mann-Whitney-Wilcoxon) ou plus de deux sous-groupes (test de Kruskal-Wallis). L'ensemble des résultats des tests d'homogénéité sont rassemblés en « Annexes » (**Tableau 11**). Nous ne présenterons ici que quelques exemples de résultats significatifs.

Aucun lien n'a pu être établi entre l'expression des transcrits *CDC25* et certains paramètres clinicopathologiques comme le type histologique de la tumeur, la présence de métastases ou l'expression du récepteur HER2. De manière contradictoire, plusieurs études ont précédemment montré une association entre l'expression des *CDC25* et la présence de métastases dans divers types de cancers. Par exemple, une corrélation a été rapportée entre la présence de métastases et l'expression de *CDC25A* dans les cancers du sein et de l'œsophage [Bonin *et al*, 2006 ; Nishioka *et al*, 2001] ; de *CDC25B* dans les cancers du pancréas, de l'estomac, de l'œsophage et du colon [Guo *et al*, 2004 ; Kudo *et al*, 1997 ; Nishioka *et al*, 2001 ; Takahashi *et al*, 2007 ; Takemasa *et al*, 2000] ; et de *CDC25C* dans le carcinome de la vulve [Wang *et al*, 2010]. Cette divergence pourrait être due au faible nombre de patientes atteintes de métastases dans notre groupe d'étude (n = 12), restreignant la précision de l'analyse statistique.

Grade histologique (SBR). Le grade histologique constitue un facteur pronostique bien établi dans le cancer du sein, généralement associé à un faible taux de survie [Soerjomataram *et al*, 2008]. De manière intéressante, nous avons pu établir une corrélation positive entre l'expression des différents transcrits de *CDC25A* (*CDC25A* globale et *A1*, « Annexes », **Tableau 11**) et de *CDC25B* (*CDC25B* globale, *B1* et *B2*, **Figure 29**) et le grade histologique des tumeurs, l'expression relative de ces transcrits étant significativement supérieure dans les tumeurs de grade III par rapport aux tumeurs de grade I ou II. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature montrant une association entre le grade histologique ou un faible degré de différenciation et la surexpression de *CDC25A* dans les carcinomes gastrique, hépatocellulaire et pulmonaire [Xing *et al*, 2008 ; Xu *et al*, 2003 ; Wu *et al*, 1998] ou de *CDC25B* dans de nombreux types de cancers, notamment dans le carcinome mammaire [Galaktionov *et al*, 1995]. Concernant les variants d'épissage, l'augmentation d'expression du

transcrit *CDC25B2* a précédemment été rapportée comme étant corrélée au stade de différenciation dans le cancer colorectal [Hernández *et al*, 2001] et à l'agressivité tumorale dans le lymphome non-hodgkinien [Hernández *et al*, 2000]. De manière surprenante, les transcrits *CDC25C* ne montrent aucun lien avec le grade histologique, alors que de précédentes études ont révélé un lien avec des facteurs de mauvais pronostic comme un faible degré de différenciation dans le cancer de la vulve [Wang *et al*, 2010] et la récurrence de l'antigène prostate-spécifique dans le cancer de la prostate [Ozen *et al*, 2005].

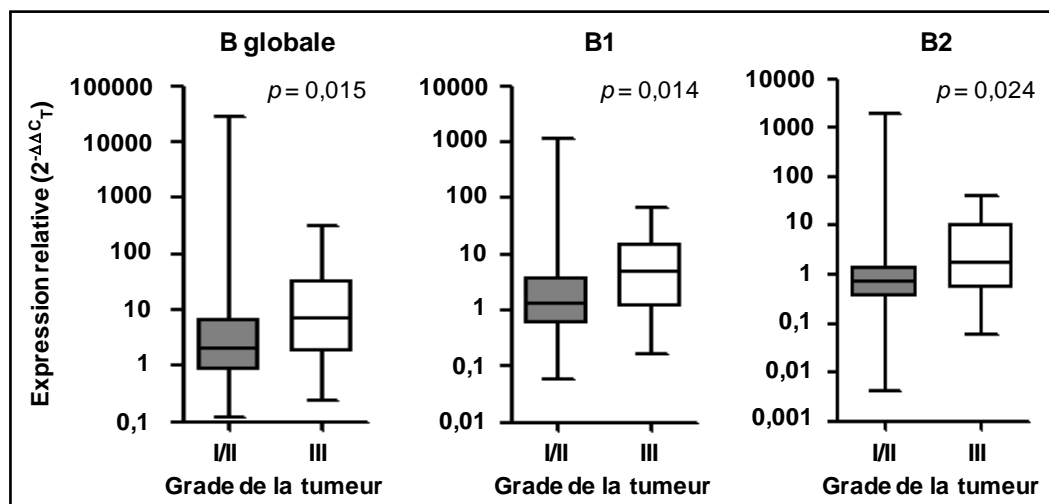


Figure 29. Corrélation entre l'expression des transcrits de *CDC25B* et le grade histologique des tumeurs. Les résultats sont présentés à l'aide d'une représentation graphique de boîte à moustaches avec les valeurs minimale et maximale. La boîte est délimitée par le premier quartile (25% des observations) et le troisième quartile (75% des observations) et est coupée par la médiane (50% des observations). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Statut des récepteurs aux œstrogènes. Notre étude a également permis de trouver une corrélation négative entre l'expression des transcrits *CDC25A1* et l'expression des récepteurs aux œstrogènes (« Annexes », **Tableau 11**). Avec un risque d'erreur plus élevé (7%), nous pouvons aussi considérer de probables liens entre l'expression globale de *CDC25A* et le statut RE. De même, la surexpression de *CDC25B* globale ainsi que celle du variant *CDC25B1* sont significativement associées à une absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes (**Figure 30**). De manière intéressante, le statut RE-négatif est associé à mauvais pronostic [Chacón et Costanzo, 2010 ; Shamliyan *et al*, 2010]. Ce type de lien a déjà été observé avec d'autres gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, comme la cycline E dont l'expression est corrélée au statut RE-négatif des tumeurs de sein [Potemski *et al*, 2006]. Aucun lien n'a cependant pu être trouvé entre l'expression des transcrits *CDC25C* et ce paramètre anatomopathologique (« Annexes », **Tableau 11**).

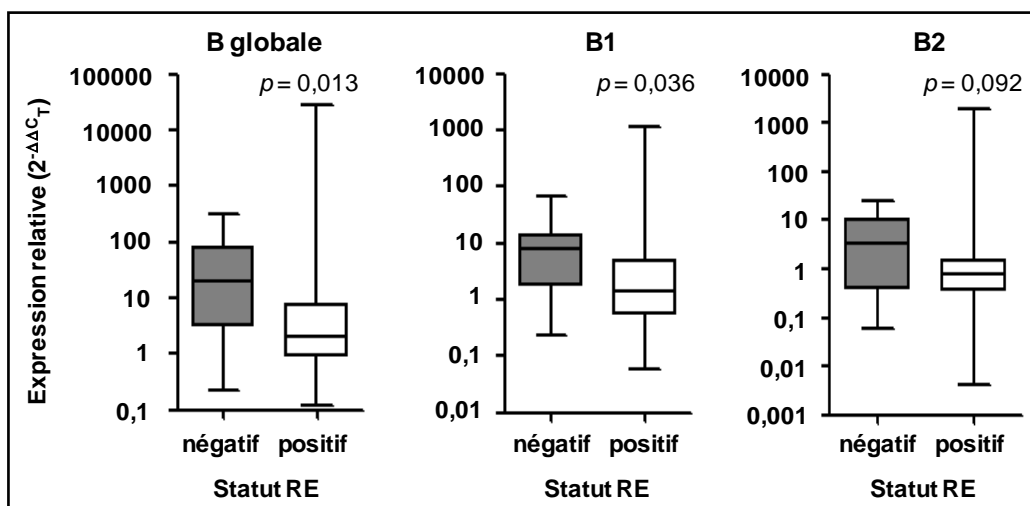


Figure 30. Corrélation entre l'expression des transcrits de *CDC25B* et le statut des récepteurs aux œstrogènes (RE) des tumeurs. Les résultats sont présentés à l'aide d'une représentation graphique de boîte à moustaches avec les valeurs minimale et maximale. La boîte est délimitée par le premier quartile (25% des observations) et le troisième quartile (75% des observations) et est coupée par la médiane (50% des observations). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Mann-Whitney-Wilcoxon.

De façon plutôt surprenante, le récepteur RE α est connu pour induire l'expression des facteurs de transcription *MYC* et *E2F* et consécutivement celle de *CDC25A* dans les cellules MCF-7 [Foster *et al*, 2001 ; Ström *et al*, 2004]. Ces données suggèrent que la surexpression de *CDC25A* observée dans les tumeurs mammaires serait indépendante des voies de régulation faisant intervenir *MYC* ou *E2F*.

Statut des récepteurs à la progestérone. Tout comme pour le récepteurs aux œstrogènes, l'expression de l'ensemble des transcrits *CDC25* analysés a tendance à être supérieure dans les tumeurs RP-négatives (« Annexes », **Tableau 11**). Néanmoins, une corrélation significative n'a pu être mise en évidence que pour les variants *CDC25B1* ($p = 0,039$) et *CDC25C1* ($p = 0,032$). L'absence d'expression des récepteurs à la progestérone, de même que celle des récepteurs aux œstrogènes, est généralement associée une maladie plus agressive [Shamliyan *et al*, 2010].

Signatures moléculaires. Comme précédemment évoqué, les signatures moléculaires tiennent une place privilégiée dans la pratique clinique actuelle et sont considérées comme plus pertinentes que les paramètres anatomopathologiques pris de manière isolée. Nous avons donc recherché une éventuelle relation entre l'expression des différents transcrits *CDC25* et le sous-type moléculaire de la tumeur (luminal A, luminal B, HER2-enrichi, triple négatif). Aucune corrélation statistiquement significative n'a malheureusement pu être établie,

probablement en raison d'un nombre d'échantillons trop restreint pour les sous-types HER2-enrichi et triple négatif (3 et 7 patientes respectivement, « Annexes », **Tableau 11**). Cependant, nous avons pu observer certaines tendances. Ainsi, les médianes de l'expression relative de *CDC25A* globale et du variant *CDC25A1* (**Figure 31**), ainsi que de celle de *CDC25B* globale et des variants *CDC25B1* et *B2* (« Annexes », **Tableau 11**), apparaissent augmentées dans les tumeurs de type HER2-enrichi et triple négatif connues pour leur agressivité naturelle plus marquée que celle des tumeurs de type luminal [Gruver *et al*, 2011]. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec la surexpression des transcrits de *CDC25A* observée dans la lignée MDA-MB-231 de type triple négatif, mais pas dans la lignée MCF-7 de type luminal A (**Figure 22**). Le profil triple négatif est en outre celui ayant le plus besoin de nouveaux biomarqueurs à la fois en raison de son très mauvais pronostic et de l'absence de thérapie ciblée. Dans ce contexte, les transcrits de *CDC25A* et *CDC25B* pourraient éventuellement représenter des biomarqueurs d'intérêt pour cette catégorie de tumeurs, si cette tendance était confirmée statistiquement sur un échantillon de population plus important.

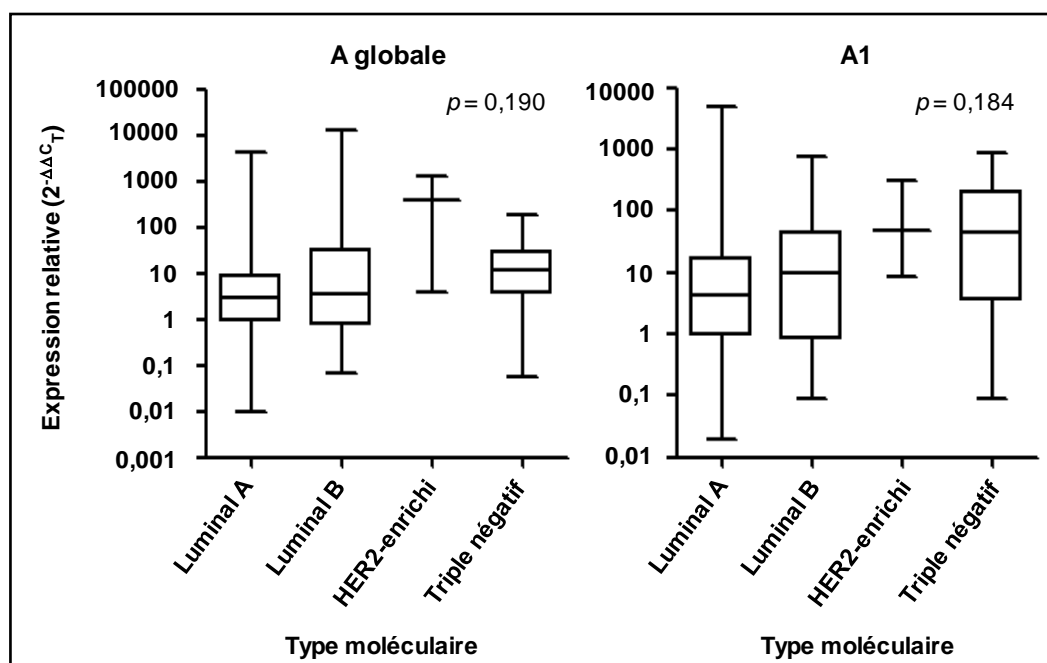


Figure 31. Corrélation entre l'expression des transcrits de *CDC25A* et le type moléculaire des tumeurs. Les résultats sont présentés à l'aide d'une représentation graphique de boîte à moustaches avec les valeurs minimale et maximale. La boîte est délimitée par le premier quartile (25% des observations) et le troisième quartile (75% des observations) et est coupée par la médiane (50% des observations). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test de Kruskal-Wallis.

III.5.2. Variables continues

Nous avons ensuite utilisé le test du coefficient de corrélation des rangs de Spearman (cf. III.4.), afin de rechercher une éventuelle relation monotone entre l'expression des différents transcrits de *CDC25* et des variables continues comme l'âge de la patiente et la taille de la tumeur. Les résultats de ce test de dépendance sont regroupés en « Annexes » (**Tableau 12**).

Âge des patientes. Une corrélation positive a pu être établie entre l'âge des patientes et l'expression globale de *CDC25C* dans notre groupe d'étude (**Figure 32**). Or, de nombreuses études ont montré que les patientes jeunes présentaient généralement des tumeurs plus agressives, avec un risque accru de récurrence loco-régionale et à distance, par rapport aux patientes plus âgées [Beadle *et al*, 2011]. De ce fait, l'implication réelle de *CDC25C* dans la progression tumorale reste encore obscure.

Taille de la tumeur (plus grand axe). La taille de la tumeur fait partie des facteurs pronostiques les plus pertinents pour la survie à long-terme [Shamliyan *et al*, 2010]. L'augmentation d'expression des transcrits *CDC25A* globale, *CDC25B2* et *CDC25C* globale est statistiquement associée aux tumeurs de plus grande taille (« Annexes », **Tableau 12 ; Figure 32**). Ces résultats concordent avec ceux de précédentes études ayant rapporté un lien entre la taille de la tumeur et l'expression de *CDC25A* dans le cancer de l'œsophage [Nishioka *et al*, 2001], de *CDC25B* dans le cancer colorectal [Takemasa *et al*, 2000] et de *CDC25C* dans le carcinome de la vulve [Wang *et al*, 2010].

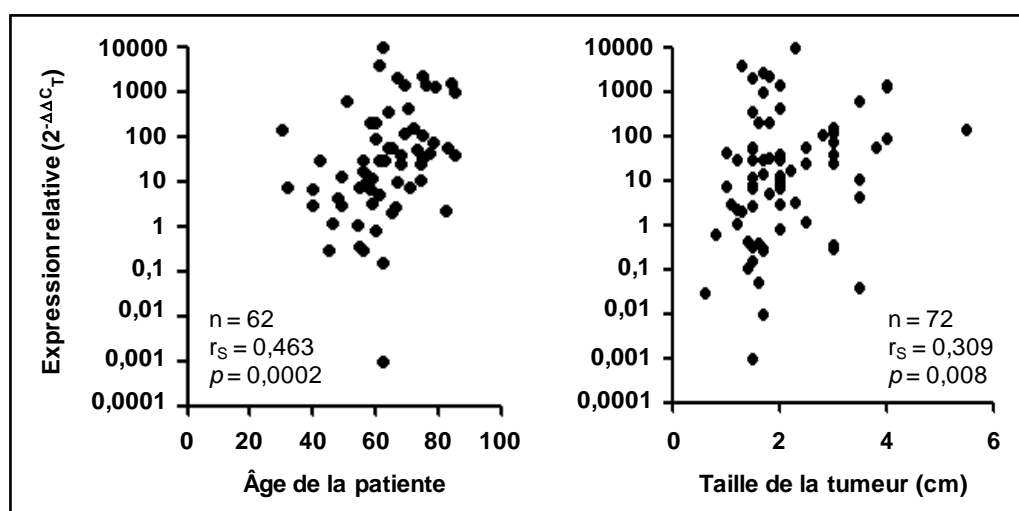


Figure 32. Corrélation entre l'expression globale de *CDC25C* et l'âge des patientes ainsi que la taille des tumeurs. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test du coefficient de corrélation des rangs de Spearman. n : nombre d'échantillons analysés ; r_s : coefficient de corrélation des rangs de Spearman ; p : valeur de la probabilité critique.

III.6. Conclusions de l'étude de l'expression des transcrits *CDC25* dans les tumeurs de sein

Cette étude se proposait d'étudier l'expression globale des trois isoformes de *CDC25* ainsi que celle de certains variants d'épissage par RT-PCR quantitative dans des tumeurs de sein cliniquement identifiées par comparaison au tissu péri-tumoral apparié et de déterminer la possibilité d'une interdépendance entre l'expression de ces transcrits et certaines caractéristiques clinicopathologiques reconnues pour leur valeur pronostique.

Nos résultats ont clairement mis en évidence une surexpression des différentes isoformes et variants d'épissage de *CDC25* dans le cancer du sein, bien que les proportions varient d'un variant à l'autre. Par exemple, le variant d'épissage *CDC25B2* est surexprimé dans un nombre relativement limité de tumeurs (21%), suggérant une implication plus restreinte dans le cancer du sein par rapport à d'autres néoplasies [Hernández *et al*, 2000, 2001]. De manière très intéressante, nous avons observé une surexpression du variant d'épissage *CDC25C5* nettement plus marquée que celle du variant *CDC25C1* dans les tumeurs de sein, ce qui peut être rapproché des résultats obtenus dans les lignées cellulaires où nous avons mis en évidence une augmentation du rapport *CDC25C5/C1* dans les cellules résistantes (cf. II.2), ainsi que de la surexpression du transcrit *CDC25C5* retrouvée dans le cancer de la prostate [Ozen *et al*, 2005]. Cette augmentation préférentielle de l'expression de *CDC25C5* pourrait être liée à l'altération globale du processus d'épissage dans de nombreux cancers (cf. « Introduction », paragraphe V.2.1.), comme cela a été rapporté pour d'autres gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. C'est le cas du gène de la cycline D1, dont la modification d'épissage dans le cancer du sein conduit à l'expression préférentielle du variant *cycline D1b* [David et Manley, 2010], connu pour son potentiel oncogénique plus élevé que *D1a* et associé à un mauvais pronostic ainsi qu'à une réponse altérée aux traitements anticancéreux [Millar *et al*, 2009 ; Wang *et al*, 2008a].

Nous avons également identifié une relation significative entre l'expression des différents transcrits de *CDC25*, suggérant l'intervention de voies de régulation communes, qui restent à déterminer précisément.

Enfin, nous avons pu établir des corrélations entre l'expression des transcrits *CDC25* et certaines caractéristiques anatomopathologiques de mauvais pronostic. Par exemple, l'expression de *CDC25A* et *CDC25B* est associée au grade histologique de la tumeur ainsi

qu'à l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes, tandis que l'expression globale de *CDC25C* est corrélée à la taille de la tumeur. La surexpression des CDC25 pourrait contribuer au contournement des points de contrôle, augmentant ainsi l'instabilité génomique dans les tumeurs de sein, ce qui pourrait potentiellement permettre aux cellules cancéreuses d'acquérir de nouvelles propriétés rendant la tumeur plus agressive.

Certaines relations n'ont pu être incriminées de manière significative, malgré l'observation d'une tendance. Nous avons certainement pu passer à côté de certaines corrélations et ce pour plusieurs raisons. D'abord, les rapports d'expression relative des transcrits de *CDC25* entre différentes patientes présentent un degré de dispersion élevé, les facteurs d'induction étant supérieurs à 10 000 dans certaines tumeurs (**Figures 54, 55 et 56**), ce qui limite la précision de l'analyse statistique. De plus, il serait intéressant à l'avenir de poursuivre cette étude sur un nombre plus élevé d'échantillons afin de diminuer les risques d'erreurs des tests statistiques. En outre, le manque de corrélation entre les niveaux d'ARNm et de protéines CDC25 mis en évidence dans les lignées cellulaires pourrait encore compliquer l'interprétation des résultats et il apparaît crucial pour la suite de cette étude de déterminer l'expression protéique des CDC25 dans les tumeurs mammaires.

Finalement, nous n'avons malheureusement pas pu étudier l'association entre l'expression des CDC25 et des paramètres essentiels comme la survie globale des patientes ou la réponse aux traitements, en raison d'un manque de recul par rapport au début de la mise en place des protocoles de prélèvement des tissus. A l'avenir, l'inclusion de ces paramètres pourrait permettre de mieux appréhender le potentiel pronostique et prédictif des phosphatases CDC25 dans le cancer du sein.

En parallèle de l'étude menée sur les tissus mammaires cancéreux, nous avons ambitionné une approche plus fondamentale du fonctionnement et de la régulation du processus d'épissage alternatif des *CDC25 in cellulo* en conditions de stress cellulaire.

2^{ème} partie : Modulation de l'épissage de CDC25 en conditions de stress génotoxique

De nombreuses études ont mis en lumière l'importance de la régulation du processus d'épissage alternatif en conditions de stress cellulaire et en particulier en réponse à un stress génotoxique (cf. « Introduction », paragraphe V.3.) [Busà et Sette, 2010]. Ainsi, les irradiations de même que les agents causant des dommages à l'ADN sont capables d'altérer l'épissage de gènes impliqués dans des processus cellulaires essentiels comme l'apoptose (*caspase-2*, *Bcl-x*) [Shkreta *et al*, 2010 ; Solier *et al*, 2004] ou le contrôle du cycle cellulaire (*cycline D1*, *MDM2*, *MDM4*) [Chandler *et al*, 2006 ; Lents *et al*, 2008 ; Wang *et al*, 2008a].

Alors que les régulations transcriptionnelle et post-traductionnelle des phosphatases CDC25 en réponse à un endommagement de l'ADN ont été largement décrites (cf. « Introduction », paragraphe II.2.), l'impact d'un stress génotoxique sur l'épissage alternatif des CDC25 n'a jamais été rapporté à ce jour. Afin de tester l'hypothèse selon laquelle un stress génotoxique pourrait modifier l'épissage alternatif de CDC25, nous avons dans un premier temps choisi d'évaluer l'effet de la doxorubicine, un agent bien connu pour engendrer des dommages à l'ADN. Dans un second temps, nous avons étendu cette étude à d'autres agents génotoxiques.

I. IMPACT D'UN TRAITEMENT PAR LA DOXORUBICINE SUR L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DES CDC25

I.1. Propriétés de la doxorubicine

La doxorubicine (Dox, également connue sous le nom d'adriamycine) est une anthracycline largement utilisée en chimiothérapie anticancéreuse et particulièrement dans le traitement du cancer du sein [Kaklamani et Gradishar, 2005]. Elle est formée d'une structure tétracyclique reliée à un sucre (daunosamine) (**Figure 33**).

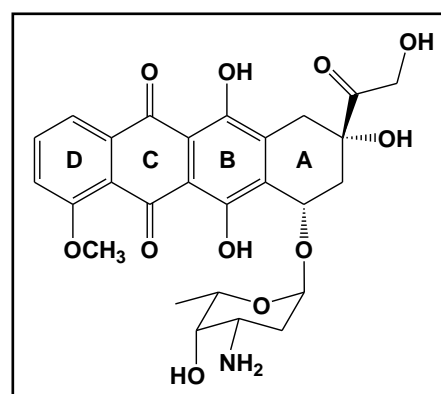


Figure 33. Structure de la doxorubicine.

Les mécanismes d'action de la doxorubicine sont multiples et diversifiés, mais nous ne présenterons ici que les mécanismes les plus importants et les mieux décrits.

Interaction de la doxorubicine avec l'ADN et la topoisomérase de type II. La Dox possède une grande affinité pour l'ADN, c'est pourquoi elle est localisée quasi-exclusivement dans le noyau des cellules. Dans les cellules MCF-7, qui nous serviront de modèle d'étude, la Dox s'accumule rapidement au niveau nucléaire (dès 1 h de traitement) (**Figure 34**).

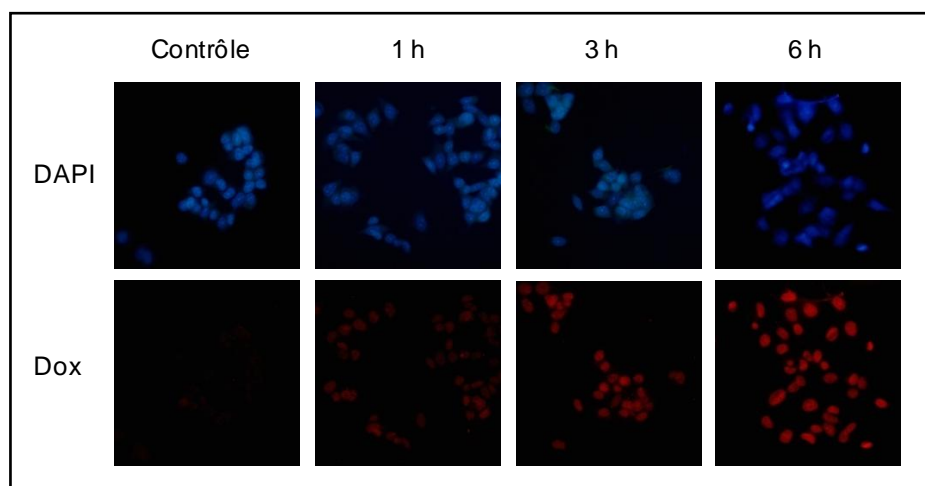


Figure 34. Accumulation nucléaire de la doxorubicine au cours du temps. Les cellules MCF-7 sont traitées par la Dox pendant différents temps, puis la fluorescence intrinsèque de la Dox (rouge) est visualisée par microscopie à fluorescence. Les noyaux sont également marqués au DAPI (bleu).

La Dox est un agent intercalant de l'ADN capable d'inhiber les processus de réplication et de transcription. En outre, la Dox est un poison de la topoisomérase II. Elle stabilise les complexes ADN-topoisomérase II empêchant ainsi la religation des brins clivés. La formation de cassures double brins qui s'ensuit induit l'activation des points de contrôle et peut conduire soit à un arrêt du cycle cellulaire, soit à l'apoptose [Minotti *et al*, 2004].

Génération de radicaux libres par la doxorubicine. La Dox subit un cycle d'oxydo-réduction conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Figure 35A**). La forme quinone du cycle C de la Dox peut être réduite en forme semi-quinone par le gain d'un électron grâce à l'action d'enzymes comme la NADP-cytochrome P-450 réductase et la NADH deshydrogénase. La semi-quinone va alors être rapidement oxydée pour régénérer la forme quinonique. Cette étape s'accompagne d'une réduction de l'oxygène (O_2) en anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), qui pourra ensuite être pris en charge par la superoxyde dismutase pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). A ce stade, H_2O_2 peut entraîner la formation du radical hydroxyle (HO^{\bullet}), l'un des radicaux libres le plus réactif et délétère, mais peut aussi

être éliminé par la catalase et les glutathion peroxydases. La production de radicaux libres va engendrer divers dommages cellulaires tels que l'altération de l'ADN, la peroxydation lipidique et l'oxydation des groupement thiols des protéines. Ces dommages peuvent finalement conduire à la mort de la cellule [Minotti *et al*, 2004].

Ce rôle pro-oxydant de la Dox a été confirmé dans les cellules MCF-7, puisqu'elle induit un doublement de la quantité de peroxydes après 12 h de traitement (**Figure 35B**).

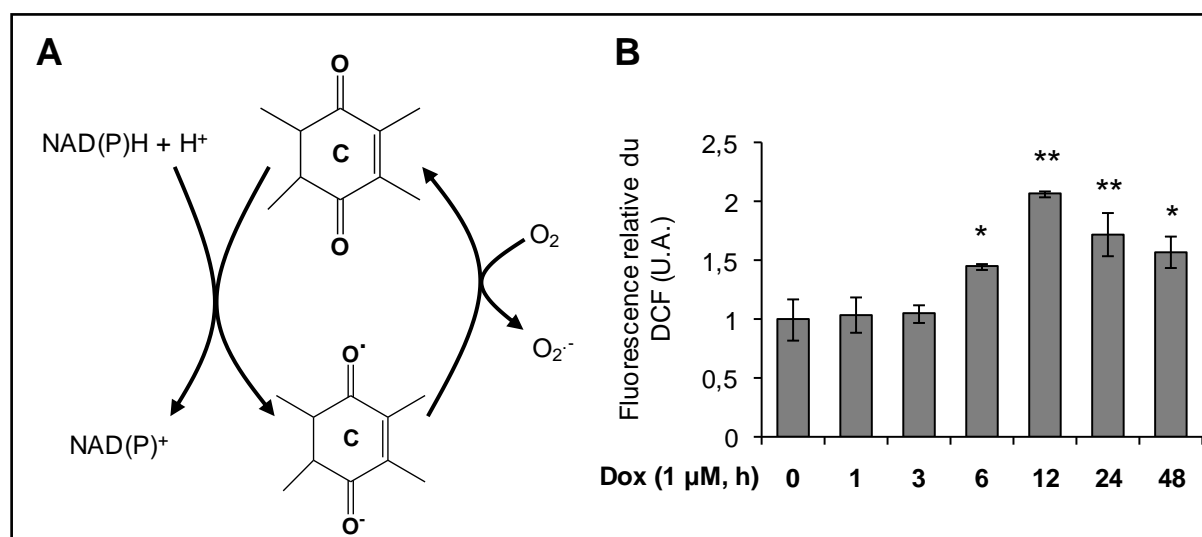


Figure 35. Génération d'espèces réactives de l'oxygène par la doxorubicine. (A) Cycle d'oxydo-réduction de la doxorubicine conduisant à la formation de ERO [d'après Minotti *et al*, 2004]. (B) Les niveaux intracellulaires de ERO ont été évalués par cytométrie en flux grâce à la sonde H₂DCFDA après traitement des cellules MCF-7 pendant différents temps en présence de 1 μM de doxorubicine. * et ** indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test t de Student).

I.2. Modulation de l'épissage de CDC25C par la doxorubicine

Les cellules d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7 ont été traitées par 1 μM de doxorubicine, cette concentration correspondant à la CI₅₀ après 24 h de traitement (**Figure 36**). A noter que cette dose est proche de la gamme de concentrations plasmatiques observées chez les patients traités par chimiothérapie anticancéreuse [Minotti *et al*, 2004].

Les niveaux des transcrits alternatifs de *CDC25* ont alors été analysés par RT-PCR semi-quantitative en utilisant les mêmes amorces que dans l'étude précédente (**Figure 18**). Les profils d'épissage de *CDC25A* et *CDC25B* ne sont pas significativement modifiés suite à un traitement par la Dox (**Figure 37A**). En revanche, le niveau global de transcription de *CDC25A* diminue, ce qui est en accord avec la répression transcriptionnelle de *CDC25A* en réponse à des dommages à l'ADN précédemment rapportée [Demidova *et al*, 2009].

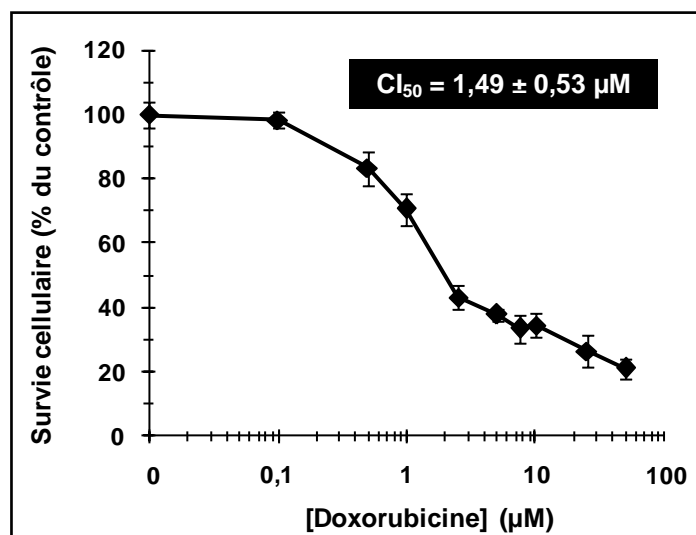


Figure 36. Effet de la doxorubicine sur la croissance des cellules MCF-7. Les cellules ont été incubées en présence de concentrations croissantes de Dox pendant 24 h, puis la viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du test MTT. La figure est représentative de trois expériences indépendantes. La valeur de CI_{50} a été déterminée grâce au logiciel GraphPad Prism 5.

De manière intéressante, la Dox induit une modification du profil d'épissage de *CDC25C* caractérisée par une augmentation du variant *CDC25C5* accompagnée d'une diminution du transcrit long *CDC25C1*, les niveaux de variants *C2* à *C4* étant faibles et constants (**Figure 37A**). Ces résultats ont été confirmés et précisés par des expériences de RT-PCR quantitative utilisant des couples amorces/sonde spécifiques de *CDC25C5* et *C1* (**Figure 18**). Nous avons ainsi pu observer une augmentation significative du rapport *CDC25C5/C1* à partir de 12 h de traitement, atteignant une valeur d'induction maximale de 17 fois après 24 h (**Figure 37B**).

En accord avec les résultats obtenus au niveau des ARNm, le rapport *CDC25C5/C1* est également modifié au niveau protéique, avec une diminution des niveaux d'expression de l'isoforme *CDC25C1* et une stabilisation voire une légère augmentation de l'isoforme *CDC25C5* (**Figure 37C**). De manière surprenante, les niveaux protéiques de *CDC25A* restent constants à la suite du traitement des cellules MCF-7 par la Dox. Ces résultats sont en contradiction avec les nombreuses données de la littérature rapportant une dégradation de la protéine *CDC25A* par le protéasome en réponse à des dommages à l'ADN (Mailand *et al*, 2000 ; cf. « Introduction », paragraphe II.2.). Par exemple, Xiao *et al* ont observé une dégradation de *CDC25A* dans des cellules de carcinome pulmonaire H1299 traitées par 0,5 µM de Dox pendant 24 h [Xiao *et al*, 2003]. Nous avons alors supposé que les voies de régulation induites en réponse aux dommages à l'ADN pouvaient différer d'une lignée à l'autre. Néanmoins, Löffler *et al* ont montré que *CDC25A* était dégradée dans la lignée MCF-7 soumises à des rayons γ [Löffler *et al*, 2003]. En outre, un éventuel problème d'ordre

méthodologique semble à priori improbable, car nous avons obtenu des résultats similaires malgré l'utilisation de deux anticorps anti-CDC25A différents (clone F6 de Santa Cruz, **Figure 37C** ; clone 144 de Santa Cruz, résultats non montrés). Les raisons de cette stabilité apparente de CDC25A dans notre modèle d'étude restent donc à élucider. Concernant la protéine CDC25B, son niveau d'expression diminue après 24 h de traitement par la Dox (**Figure 37C**). Ces résultats peuvent être expliqués par une étude récente montrant que la traduction de CDC25B est réprimée via la phosphorylation du facteur EIF2A en réponse aux rayons UV [Lemaire *et al*, 2010].

Finalement, le même type de modification dans le profil d'épissage de CDC25C a été observé dans la lignée Vcr-R résistante à divers agents anticancéreux, aussi bien au niveau des ARNm (**Figure 37D**) qu'au niveau protéique (résultats non montrés).

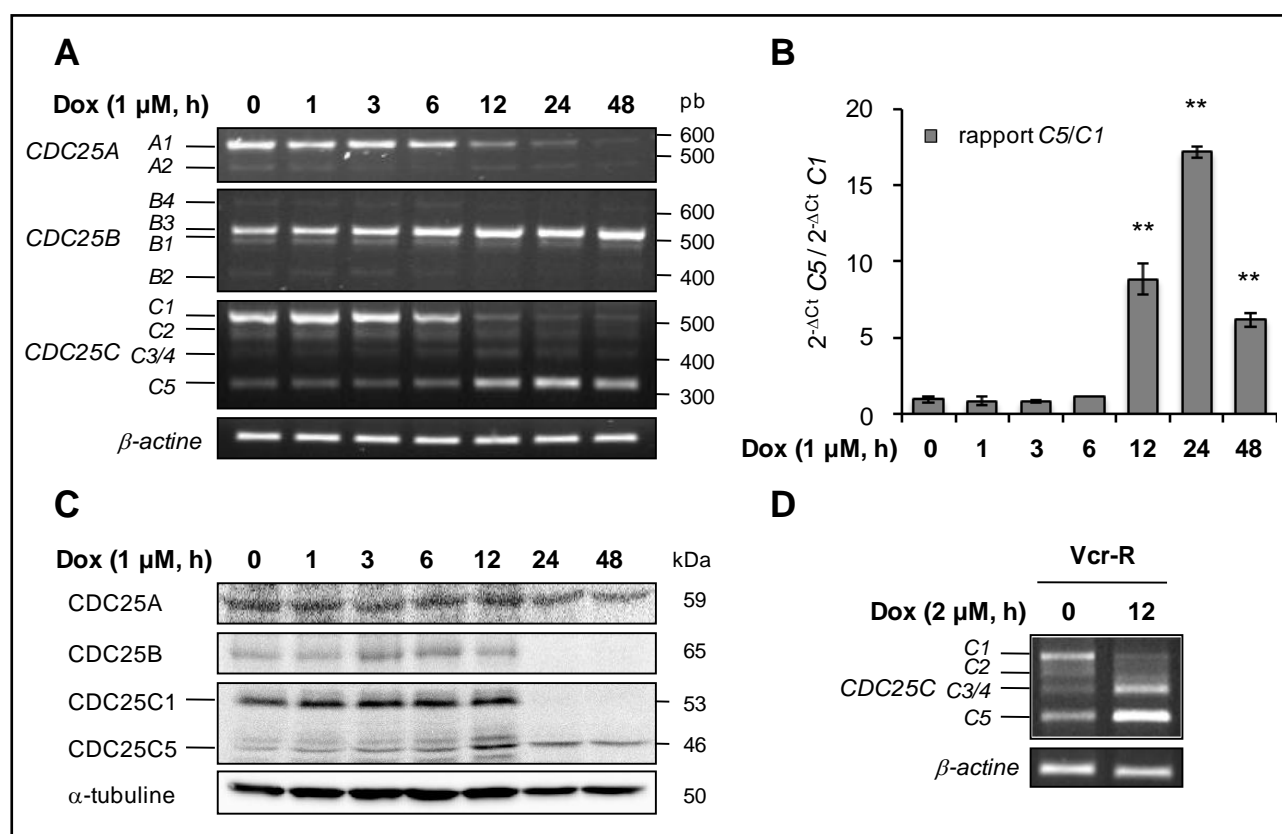


Figure 37. Modulation de l'épissage de CDC25C par la doxorubicine dans des lignées humaines de cancer du sein. Les cellules MCF-7 ont été traitées par 1 μM de Dox pendant différents temps. **(A)** Analyse des variants d'épissage de *CDC25A*, *CDC25B* et *CDC25C* par RT-PCR semi-quantitative. Le gène β-actine a été utilisé comme contrôle interne. **(B)** Evaluation du rapport entre les variants *CDC25C5* et *C1* par RT-PCR en temps réel. ** indique une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,01$ (test t de Student). **(C)** Analyse des niveaux d'expression des protéines *CDC25A*, *CDC25B* et *CDC25C* par immunoblotting. La protéine α-tubuline a été utilisée pour contrôler la qualité des dépôts protéiques. Les poids moléculaires de chaque protéine sont indiqués à droite de la figure. **(D)** Les cellules résistantes Vcr-R (dérivées de MCF-7) ont été traitées par 2 μM de Dox pendant 12 h. L'épissage de *CDC25C* a alors été analysé par RT-PCR semi-quantitative.

I.3. Implication de la modulation d'épissage de CDC25C dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN

Afin de préciser le lien entre la modulation de l'épissage de CDC25C induite par la doxorubicine et les voies de réponse aux dommages à l'ADN, nous avons choisi de comparer l'effet d'une concentration sub-létale de Dox (1 μ M) à une concentration plus élevée (5 μ M). Comme l'indique la **figure 38**, la modulation de l'épissage de CDC25C est nettement moins prononcée, aussi bien au niveau des ARNm que des protéines, en présence de la plus forte concentration en Dox. Nous avons supposé que ces résultats pourraient être liés à des différences dans la sévérité des lésions de l'ADN induites par les deux concentrations distinctes de Dox.

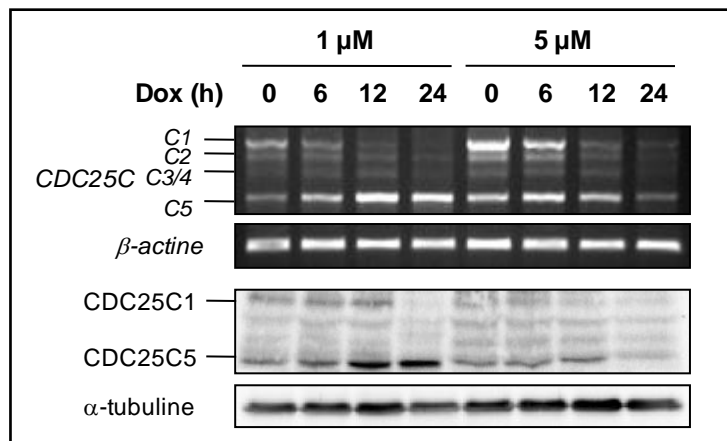


Figure 38. Modulation dose-dépendante de l'épissage de CDC25C par la doxorubicine. Les cellules MCF-7 ont été traitées par 1 μ M et 5 μ M de Dox pendant différents temps. L'expression des variants d'épissage de CDC25C a alors été évaluée par RT-PCR (*images du haut*) et par immunoblotting (*images du bas*).

Dans l'optique de tester cette hypothèse, nous avons évalué la phosphorylation de l'histone H2AX (γ -H2AX), un marqueur sensible et spécifique des dommages à l'ADN, en particulier des cassures double brins de l'ADN [Mah *et al*, 2010]. En effet, au cours de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, les kinases ATM, ATR et DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*) catalysent la phosphorylation de l'histone H2AX sur la Ser139, ce qui conduit à la formation de foyers γ -H2AX au niveau des sites de cassures doubles brins. La présence de ces foyers est essentielle pour l'assemblage de la machinerie de réparation de l'ADN ainsi que pour la transduction des signaux de dommage à l'ADN [Mah *et al*, 2010]. Comme le montre l'immunoblot sur la **figure 39**, γ -H2AX est induit à partir de 12 h de traitement par 5 μ M de Dox. L'absence de signal γ -H2AX suite à un traitement par 1 μ M

de Dox pourrait être due à la présence de dommages minimes dans l'ADN qui ne pourraient pas être détectés par immunoblotting.

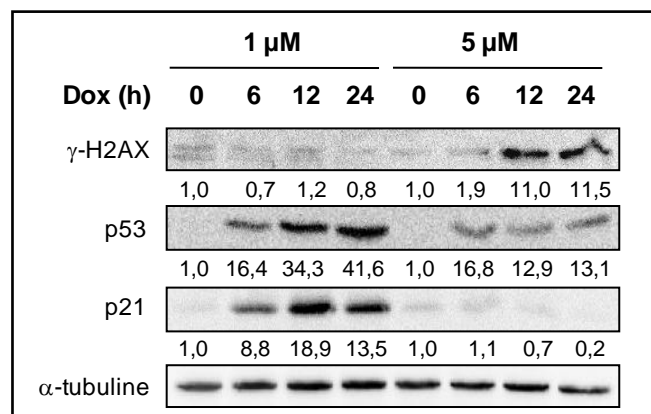


Figure 39. Induction des protéines impliquées dans les voies de réponse aux dommages à l'ADN par la doxorubicine. Les cellules MCF-7 ont été traitées par 1 μM et 5 μM de Dox pendant différents temps. Les niveaux protéiques de γ-H2AX, p53 et p21 ont été évalués par immunoblotting. L'expression relative des protéines a été déterminée par densitométrie et est indiquée sous les blots.

Pour contourner ce problème, nous avons étudié l'induction de γ-H2AX par immunofluorescence, une méthode plus sensible que l'immunoblotting. Dans ce contexte, la fluorescence intrinsèque de la Dox doit être prise en considération (**Figure 34**). En effet, même en absence d'incubation avec l'anticorps anti-γ-H2AX, les cellules traitées par la Dox apparaissent oranges-brunes en microscopie, du fait du débordement de la fluorescence rouge de la Dox dans le canal vert utilisé pour la détection du FITC (résultats non montrés). Cependant, ce chevauchement de fluorescence ne pose pas de réels problèmes pour l'interprétation des résultats, car la fluorescence intrinsèque de la Dox (orange-brune) peut être clairement distinguée de celle du marquage γ-H2AX (verte). Les images de microscopie de la **figure 40A** indiquent la présence de foyers γ-H2AX dans le noyau des cellules MCF-7 traitées par la Dox pendant 12 h, l'intensité de fluorescence de ces foyers ainsi que le nombre de cellules marquées augmentant avec la concentration en Dox (29,6% et 73,1% de cellules marquées en présence de 1 μM et 5 μM de Dox respectivement) (**Figure 40B**). Après 24 h de traitement, la protéine γ-H2AX s'accumule, ce qui conduit à une diminution de la proportion de cellules présentant des foyers γ-H2AX ponctiformes au profit de cellules présentant un marquage plus intense et diffus (**Figure 40A et B**). L'ensemble de ces observations indique que la formation des cassures double brins dépend à la fois du temps de traitement et de la concentration en Dox.

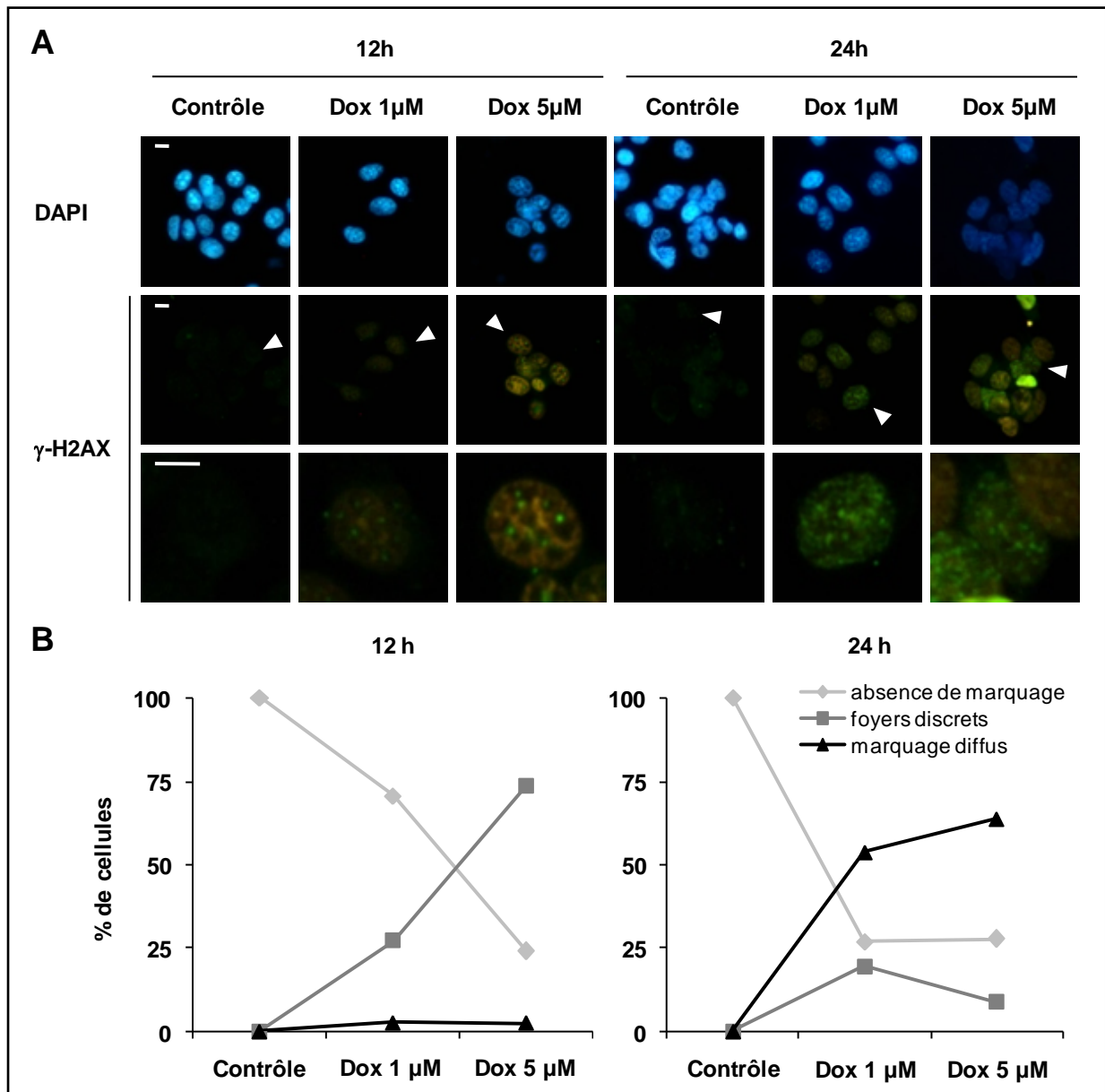


Figure 40. Mise en évidence de la formation de foyers nucléaires γ -H2AX induite par la doxorubicine par immunofluorescence. Les cellules MCF-7 sont traitées par 1 μ M ou 5 μ M de Dox pendant 12 h ou 24 h, puis incubées en présence d'un anticorps anti- γ -H2AX (FITC, vert) selon le protocole décrit en « Matériel et Méthodes ». **(A)** Le marquage γ -H2AX est visualisé par microscopie à fluorescence. Les images du bas correspondent au grossissement des cellules marquées d'une flèche dans les images du milieu. Les noyaux ont également été marqués au DAPI (bleu). Barres d'échelle, 10 μ m. **(B)** Graphiques représentant l'augmentation dose-dépendante du marquage γ -H2AX. Au moins 50 cellules ont été comptées et classées en cellules γ -H2AX-négatives (absence de marquage), en cellules présentant des foyers γ -H2AX discrets (foyers discrets, au moins trois foyers par cellule) et en cellules présentant un marquage γ -H2AX diffus (marquage diffus).

Selon la nature et l'intensité du stress génotoxique, l'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN peut conduire soit à un arrêt du cycle cellulaire pour permettre à la cellule de réparer son ADN, soit à l'initiation de l'apoptose si les dommages sont trop importants [Jackson et Bartek, 2009]. Dans les cellules MCF-7 traitées par 1 μ M et 5 μ M de

Dox, les voies de réponse aux dommages à l'ADN sont effectivement activées, comme l'indique l'induction de la protéine p53 (**Figure 39**). Cependant, selon la concentration en Dox, la conséquence de cette activation pourrait différer. Nous avons donc étudié l'impact d'un traitement par la Dox (1 μ M et 5 μ M) sur l'arrêt du cycle cellulaire d'une part et sur l'induction de l'apoptose d'autre part.

Arrêt du cycle cellulaire. La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été analysée par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium. En présence de 1 μ M de Dox, les cellules MCF-7 s'accumulent en phase G₂/M à partir de 24 h de traitement (**Figure 41**, 16,2 \pm 2,8% de cellules en phase G₂/M pour le contrôle *versus* 27,9 \pm 0,5% en présence de 1 μ M de Dox), conformément aux données de la littérature [Minotti *et al*, 2004]. Ce blocage du cycle cellulaire est lié à l'activation du point de contrôle G₂/M comme le suggère l'induction de l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 (**Figure 39**). A l'inverse, dans les cellules MCF-7 traitées par 5 μ M de Dox, aucune induction de p21 n'est observée (**Figure 39**), ce qui coïncide avec un arrêt du cycle cellulaire plus limité (**Figure 41**, 16,2 \pm 2,8% de cellules en phase G₂/M pour le contrôle *versus* 18,2 \pm 3,4% après 24 h de traitement par 5 μ M de Dox).

Induction de l'apoptose. Nous avons évalué un événement tardif de l'apoptose, à savoir le clivage de la poly-(ADP-ribose) polymérase (PARP), dans les cellules MCF-7 traitées par la doxorubicine. La PARP est une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN et représente l'un des principaux substrats clivés et inactivés par les caspases au cours de l'apoptose. Le clivage de la PARP (112 kDa) génère deux fragments, dont un fragment de 85 kDa détectable par immunoblotting. Seule la plus forte concentration en Dox (5 μ M) induit le déclenchement de l'apoptose, avec un clivage de la PARP visible à partir de 12 h de traitement (**Figure 42**).

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que la modulation de l'épissage de CDC25C intervient au cours de la réponse précoce aux dommages à l'ADN induits par la doxorubicine. En effet, l'augmentation du rapport CDC25C5/C1 a lieu essentiellement en présence d'une concentration sub-létale de Dox (1 μ M) générant des dommages modérés dans l'ADN et conduisant à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M. A l'inverse, cette régulation disparaît en présence d'une concentration plus élevée de Dox (5 μ M) induisant des dommages importants à l'ADN, ne pouvant être réparés et aboutissant à la mise en place du processus apoptotique.

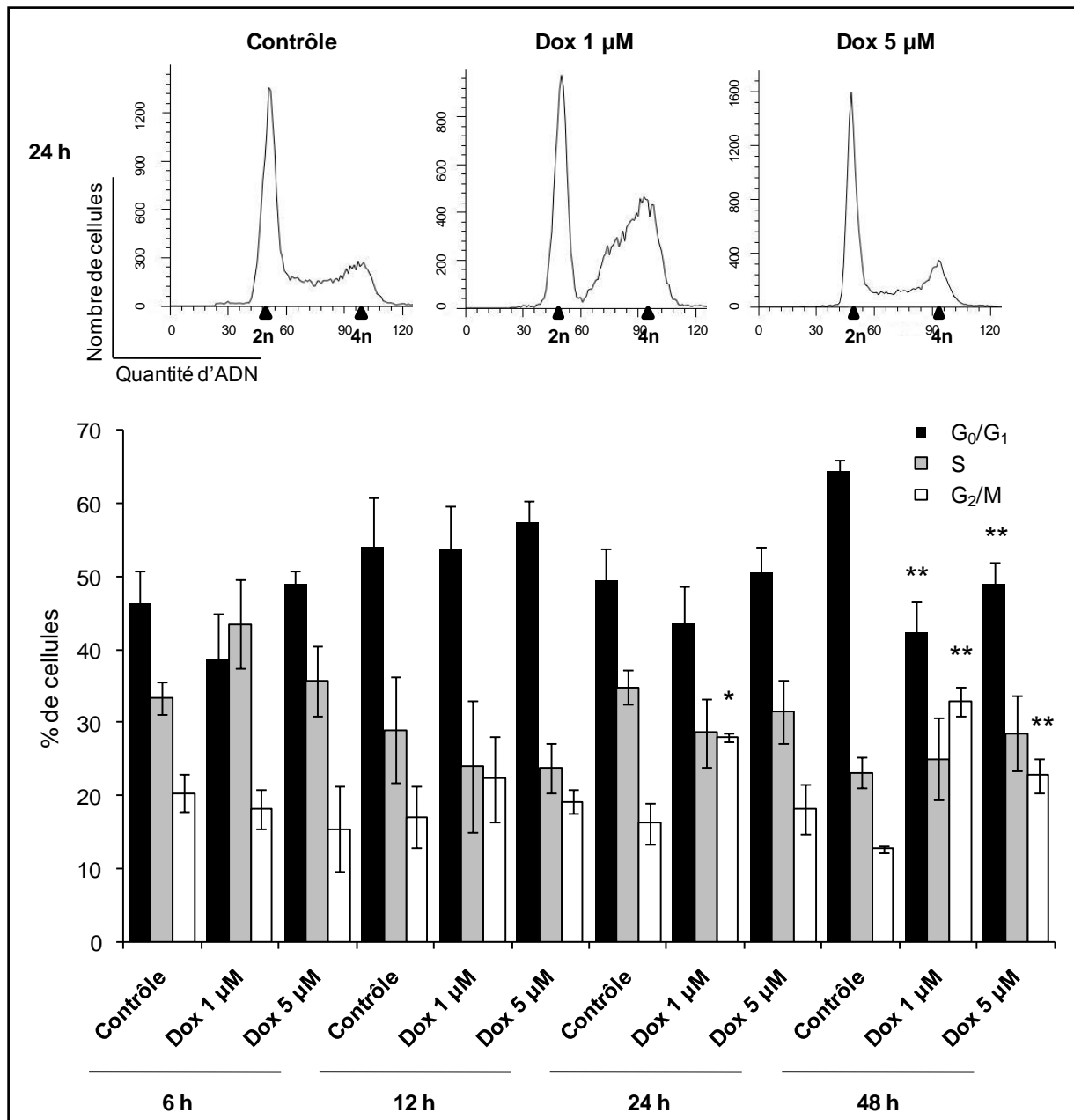


Figure 41. Analyse de la progression dans le cycle cellulaire des cellules MCF-7 traitées par la doxorubicine. La distribution dans les différentes phases du cycle cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux après marquage par l'iodure de propidium. * et ** significativement différent du contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement.

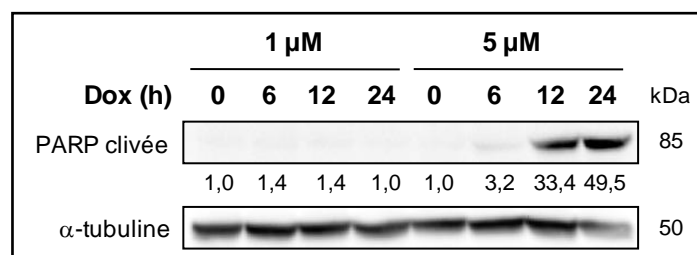


Figure 42. Etude du clivage de la PARP par immunoblotting dans les cellules MCF-7 traitées par la doxorubicine. L'expression relative de la PARP clivée a été déterminée par densitométrie et est indiquée sous le blot.

I.4. Recherche des voies de signalisation impliquées dans la modulation de l'épissage de CDC25C

Implication de la protéine p53. Sachant que la transcription de *CDC25C* est régulée par p53 en réponse aux dommages à l'ADN [St Clair *et al*, 2004] et que la transcription et l'épissage sont deux mécanismes étroitement liés [Chen et Manley, 2009], nous nous sommes demandé si la régulation de l'épissage de *CDC25C* induite par la doxorubicine nécessitait la présence d'une protéine p53 fonctionnelle. Pour répondre à cette question, nous avons traité les cellules MCF-7 (exprimant une protéine p53 sauvage) par un inhibiteur pharmacologique de l'activité transcriptionnelle de p53 : l' α -pifithrine [Komarov *et al*, 1999]. L'inhibition de l'activité p53 a été confirmée par une induction moindre de p21, un des principaux gènes-cibles de p53 (**Figure 43A**). En parallèle, nous avons utilisé la lignée de cancer du sein MDA-MB-231 présentant une mutation de p53 (codon 280, AGA/AAA, Arg/Lys) limitant l'activation des voies apoptotiques [Bartek *et al*, 1990]. Dans ces deux modèles, la diminution d'activité p53 n'empêche pas l'augmentation du rapport CDC25C5/C1 suite à un traitement par la Dox (**Figure 43A et B**). Ces résultats suggèrent que la modulation d'épissage de *CDC25C* induite suite à des dommages dans l'ADN est un mécanisme indépendant de p53.

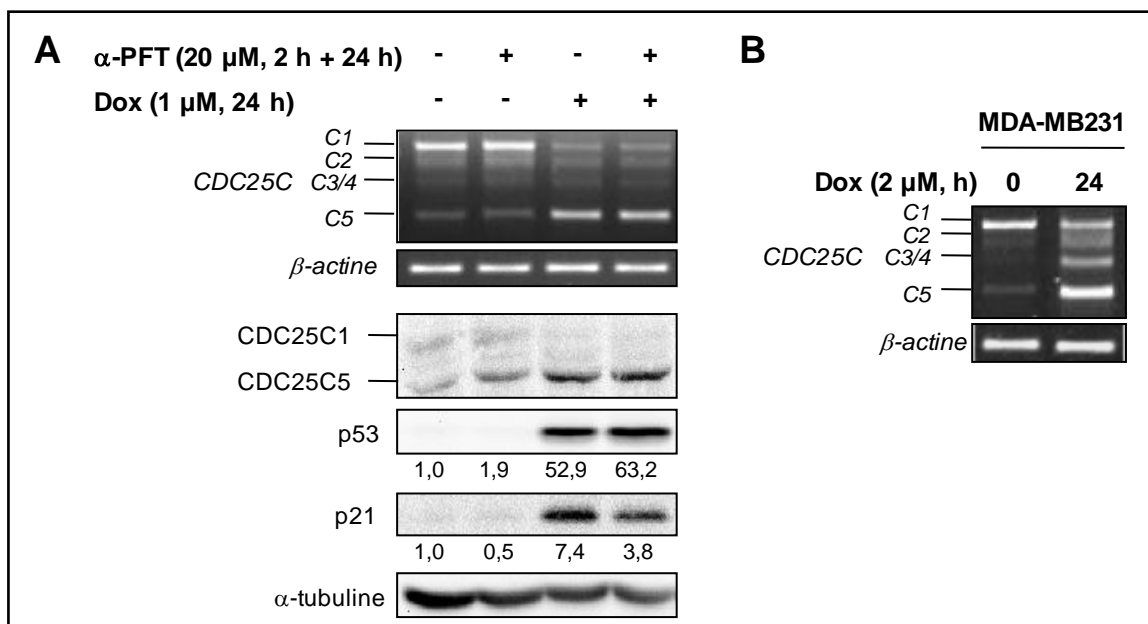


Figure 43. Etude de l'implication de p53 dans la régulation de l'épissage de *CDC25C*. (A) Les cellules MCF-7 ont été pré-traitées par 20 μ M d' α -pifithrine (α -PFT, inhibiteur de p53) pendant 2 h, puis co-incubées en présence de 1 μ M de Dox pendant 24 h. *Haut*, évaluation de l'expression des variants d'épissage de *CDC25C* par RT-PCR semi-quantitative ; *Bas*, analyse des niveaux protéiques de *CDC25C*, p53 et p21 par immunoblotting. (B) Les cellules MDA-MB-231 (avec une p53 mutée) ont été traitées par 2 μ M de Dox pendant 24 h et l'expression des variants d'épissage de *CDC25C* a été évaluée par RT-PCR semi-quantitative.

Implication des kinases ATM et ATR. En amont de p53 dans la cascade de signalisation induite lors d'un stress génotoxique se trouvent les kinases ATM et ATR. Comme précédemment évoqué (cf. « Introduction », paragraphe II.2.), ces kinases jouent un rôle crucial lors des points de contrôle du cycle cellulaire en activant les kinases CHK1 et CHK2, responsables de la dégradation dépendante du protéasome et/ou de la séquestration cytoplasmique des CDC25. Par conséquent, nous avons envisagé la possibilité que les kinases ATM/ATR puissent être aussi impliquées dans la régulation de l'épissage de CDC25C suite à un traitement par la Dox. Les cellules MCF-7 ont donc été pré-traitées en présence de caféine, un inhibiteur bien connu des activités kinases ATM/ATR [Sarkaria *et al*, 1999], puis co-incubées avec 1 μ M de Dox. Afin de s'assurer que la caféine inhibe effectivement les kinases ATM/ATR dans ces conditions, nous avons évalué les niveaux protéiques de p53, l'un des substrats de ATM/ATR. Comme attendu, la stabilisation de p53 induite par la Dox est moindre en présence de caféine (**Figure 44**). Il s'ensuit également une diminution de l'induction de son gène-cible p21 (**Figure 44**). De manière intéressante, la modification du profil d'épissage de CDC25C induite par la Dox est bloquée en présence de caféine, aussi bien au niveau des ARNm que des protéines, indiquant que ce mécanisme de régulation est dépendant de la voie de signalisation ATM/ATR.

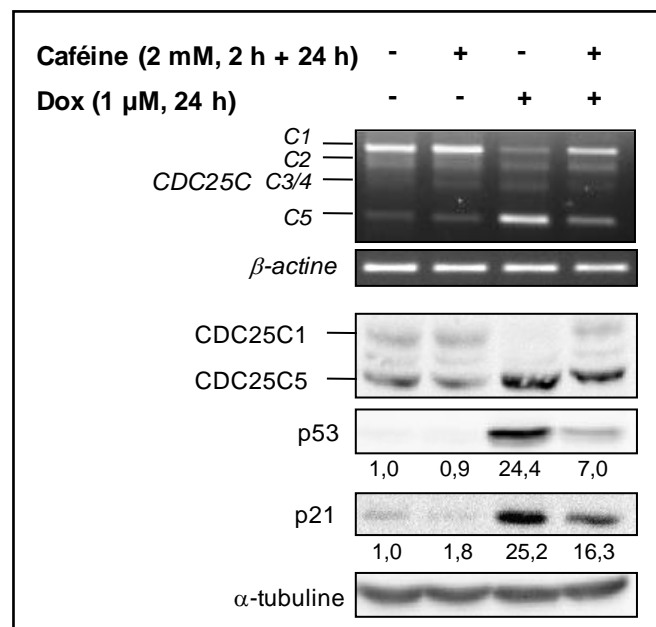


Figure 44. Etude de l'implication de la voie ATM/ATR dans la régulation de l'épissage de CDC25C. Les cellules MCF-7 ont été pré-traitées par 2 mM de caféine (inhibiteur des kinases ATM/ATR) pendant 2 h, puis co-incubées en présence de 1 μ M de Dox pendant 24 h. *Haut*, évaluation de l'expression des variants d'épissage de CDC25C par RT-PCR semi-quantitative ; *Bas*, analyse des niveaux protéiques de CDC25C, p53 et p21 par immunoblotting.

II. IMPACT D'AUTRES AGENTS GÉNOTOXIQUES SUR L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE CDC25C

Afin de confirmer le lien entre la modulation de l'épissage de CDC25C et les voies de réponse aux dommages à l'ADN, nous avons étendu notre étude en recherchant un effet d'autres agents génotoxiques sur ce processus de régulation. Nous nous sommes en particulier intéressés à des molécules utilisées en thérapeutique anticancéreuse, mais également à des molécules génératrices de stress oxydant. Les cellules MCF-7 ont été traitées comme précédemment avec une concentration correspondant à la CI₅₀ après 24 h de traitement des différents composés, déterminée par un test MTT (« Annexes », **Figure 57**).

II.1. Inhibiteurs de topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes impliquées dans la régulation du degré d'enroulement de l'ADN et sont de ce fait indispensables aux processus de réplication et de transcription. Elles sont divisées en deux groupes selon leur mécanisme réactionnel. Les topoisomérases de type I coupent un seul des deux brins d'ADN, tandis que les topoisomérases de type II réalisent une coupure double-brin de l'ADN. Cette coupure transitoire permet la relaxation de l'ADN, puis les brins d'ADN sont reliés [Pommier *et al*, 2010]. Nous avons choisi deux inhibiteurs parmi les plus puissants et les mieux caractérisés : la camptothécine (CPT) et l'étoposide (Eto) spécifiques des topoisomérases I et II respectivement. Tout comme la doxorubicine, l'étoposide stabilise le complexe de clivage ADN-topoisomérase II, générant ainsi des cassures doubles brins de l'ADN. Quant à la camptothécine, elle stimule la formation de cassures simple-brin réversibles qui peuvent ensuite être converties en cassures doubles-brins irréversibles suite à la collision avec les fourches de réplication lors de la phase S [Pommier *et al*, 2010]. Dans les cellules MCF-7, la CPT et l'Eto induisent effectivement la formation de cassures doubles-brins comme l'indique la présence de foyers γ -H2AX, ainsi que l'activation de la voie p53/p21 (**Figure 45A et B**).

De plus, ces deux composés induisent une modification du profil d'épissage de CDC25C similaire à celle observée avec la Dox (**Figure 45A et B**). L'augmentation du rapport *CDC25C5/C1* est cependant plus précoce et transitoire qu'en présence de Dox, la valeur d'induction maximale étant de $6,6 \pm 1,3$ à 12 h de traitement pour la CPT et de $3,4 \pm 0,1$ à 6 h de traitement pour l'Eto (valeurs déterminées par RT-PCR quantitative, résultats non montrés).

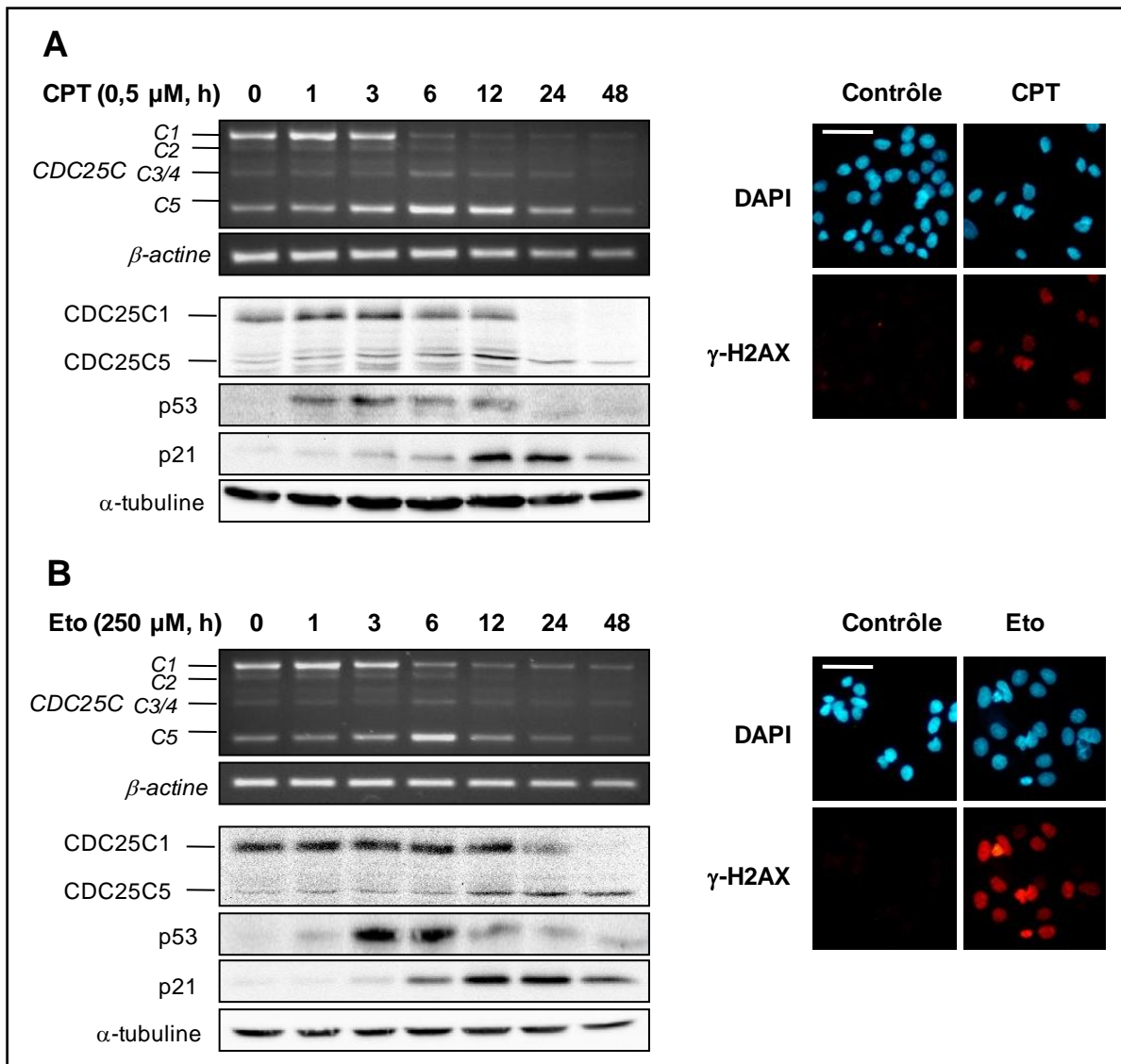


Figure 45. Modulation de l'épissage alternatif de CDC25C par les inhibiteurs de topoisomérases dans les cellules MCF-7. Les cellules ont été traitées par 0,5 µM de camptothécine (CPT), un inhibiteur de la topoisomérase I (A) et par 250 µM d'étoposide (Eto), un inhibiteur de la topoisomérase II (B) pendant différents temps. *Haut*, l'expression des variants d'épissage de CDC25C a été évaluée par RT-PCR semi-quantitative. *Bas*, les niveaux protéiques de CDC25C, p53 et p21 ont été analysés par immunoblotting. *Droite*, les cellules ont été traitées pendant 24 h et marquées par immunofluorescence avec un anticorps anti-γ-H2AX (AlexaFluor 594, rouge). Les noyaux ont également été marqués au DAPI (bleu). Barres d'échelle, 50 µm.

Nous avons alors analysé l'impact d'un traitement par ces deux inhibiteurs de topoisomérases sur la progression dans le cycle des cellules MCF-7. La CPT entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase S dès 6 h de traitement, ce qui est cohérent avec le mécanisme d'action de cette molécule qui est capable de générer des dommages à l'ADN uniquement dans des cellules en phase de réplication (Figure 46A). L'étoposide induit une accumulation de cellules MCF-7 en phase S, mais également en phase G₂/M dans une moindre mesure (Figure 46B).

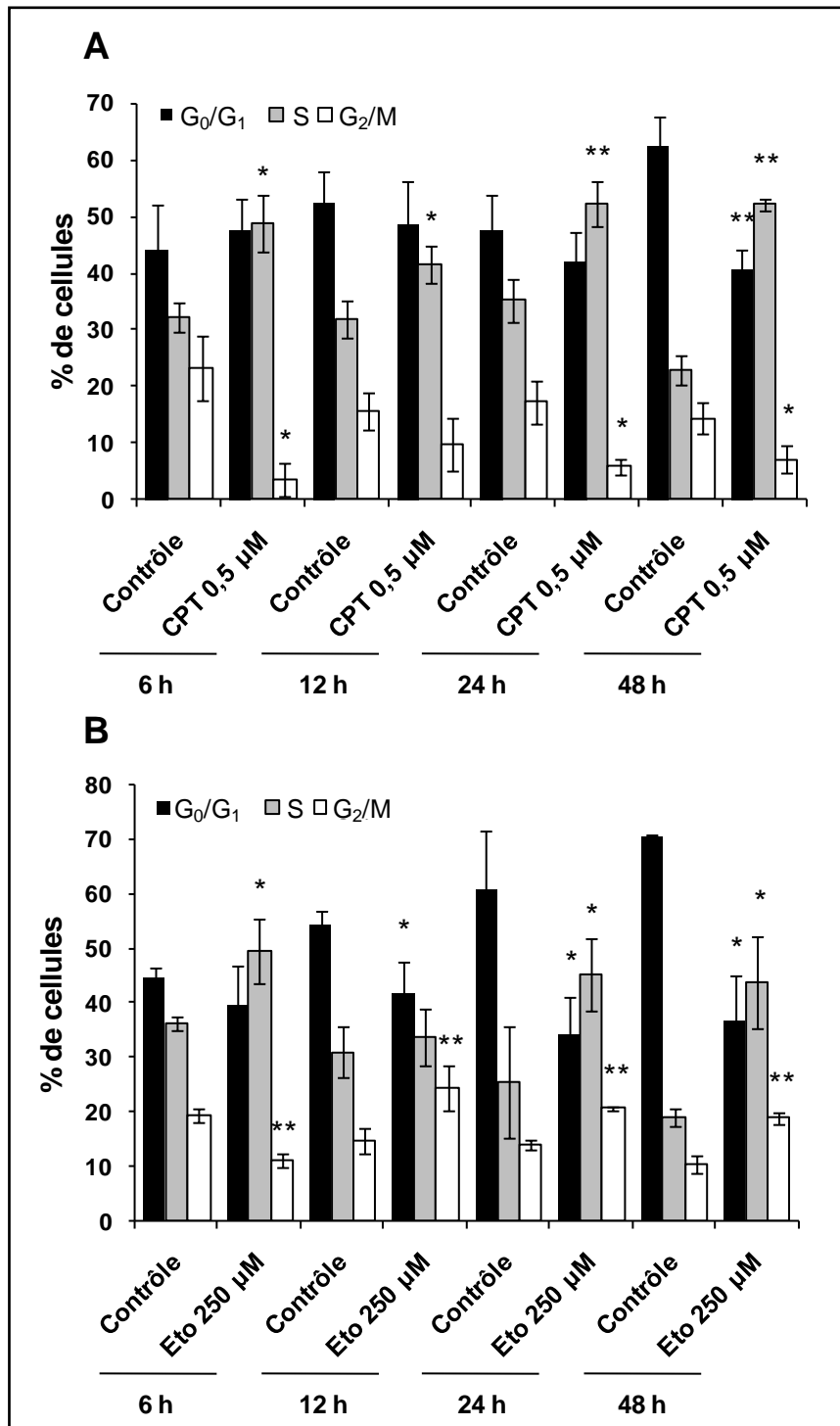


Figure 46. Analyse de la progression dans le cycle cellulaire des cellules MCF-7 traitées par les inhibiteurs de topoisomérases. Les cellules ont été traitées par 0,5 µM de CPT (A) et par 250 µM d'Eto (B) pendant différents temps (6 à 48 h). La distribution dans les différentes phases du cycle cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux après marquage par l'iodure de propidium. * et ** significativement différent du contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement.

II.2. Autres molécules anticancéreuses

Nous avons ensuite étendu notre étude à d'autres agents anticancéreux comme le cisplatine et la vinblastine. Le cisplatine est un agent alkylant qui induit la mort cellulaire principalement par la formation d'adduits à l'ADN, inhibant ainsi la réplication et la transcription. En outre, ce composé est capable d'inhiber les topoisomérases directement ou indirectement par le biais des adduits cisplatine-ADN [Hasinoff *et al*, 2005 ; Malina *et al*, 2009]. La vinblastine est un alcaloïde extrait de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*). C'est un poison du fuseau mitotique qui inhibe la polymérisation de la tubuline, bloquant la division cellulaire et pouvant ainsi aboutir à la mort de la cellule. Ce composé a été choisi comme témoin négatif, sachant qu'il ne devrait à priori pas induire de dommages à l'ADN.

Conformément à notre attente, le cisplatine induit la formation de foyers de réparation γ -H2AX et l'activation de la voie p53/p21, ainsi qu'une augmentation du rapport *CDC25C5/C1* (**Figure 47**). A l'inverse, l'épissage de *CDC25C* n'est pas affecté suite à un traitement des cellules MCF-7 par la vinblastine, qui n'altère pas l'intégrité de l'ADN (**Figure 47**).

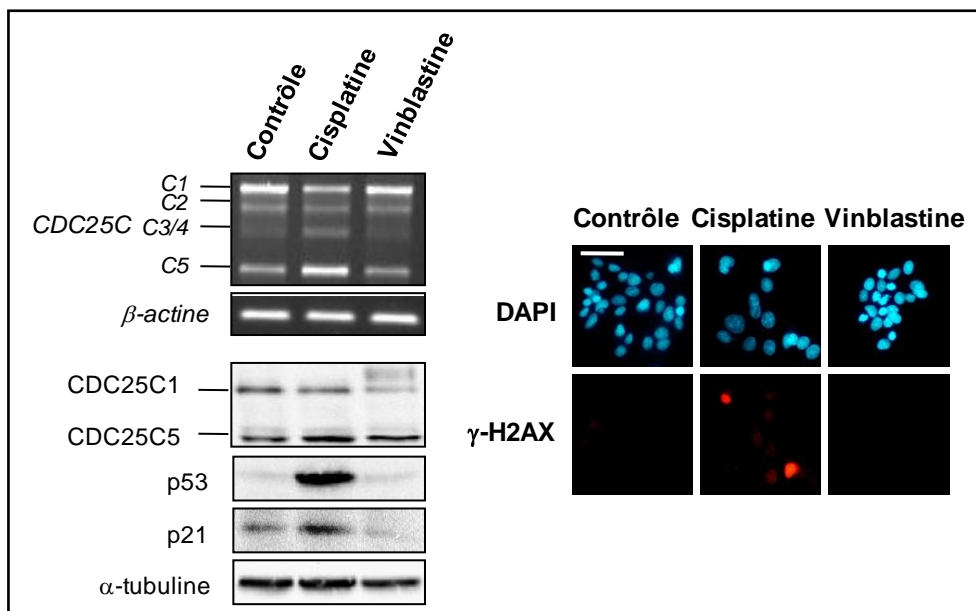


Figure 47. Modulation de l'épissage alternatif de *CDC25C* par les agents anticancéreux dans les cellules MCF-7. Les cellules ont été traitées par 50 μ M de cisplatine et par 1 μ M de vinblastine pendant 12 h. *Haut*, l'expression des variants d'épissage de *CDC25C* a été évaluée par RT-PCR semi-quantitative. *Bas*, les niveaux protéiques de *CDC25C*, p53 et p21 ont été analysés par immunoblotting. *Droite*, les cellules ont été traitées pendant 24 h et marquées par immunofluorescence avec un anticorps anti- γ -H2AX (AlexaFluor 594, rouge). Les noyaux ont également été marqués au DAPI (bleu). Barres d'échelle, 50 μ m.

Nous avons également analysé la progression dans le cycle des cellules MCF-7 traitées par ces deux composés. La vinblastine provoque une accumulation massive des cellules en phase G₂/M, en parfait accord avec son mécanisme d'action (**Figure 48**). A l'inverse, le cisplatine ne modifie pas la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (**Figure 48**). Ces résultats sont plutôt surprenants compte tenu de l'induction de p21 observée en présence de cisplatine. Cependant, l'étude de Wesierska-Gadek *et al* permet d'apporter une explication à ce phénomène. Ils ont en effet remarqué que les cellules MCF-7 traitées par 40 µM de cisplatine s'accumulaient en phase S de manière transitoire à 15 h de traitement, cet effet disparaissant à 24 h de traitement [Wesierska-Gadek *et al*, 2003]. Il serait alors intéressant de recommencer notre expérience sur des temps plus courts pour détecter un éventuel arrêt du cycle induit par le cisplatine.

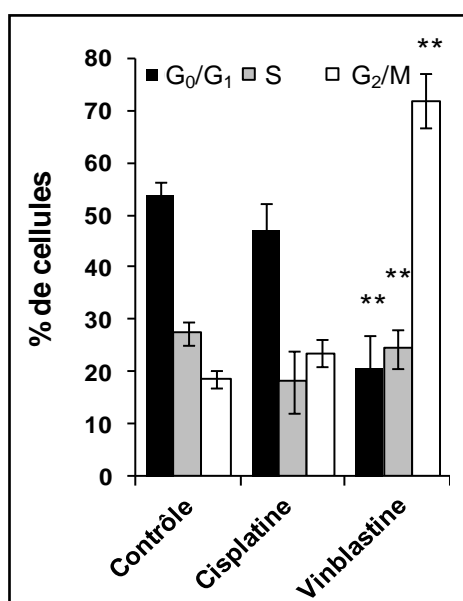


Figure 48. Analyse de la progression dans le cycle cellulaire des cellules MCF-7 traitées par 50 µM de cisplatine et 1 µM de vinblastine pendant 24 h.

II.3. Molécules génératrices d'espèces réactives de l'oxygène

Il est clairement établi qu'un stress oxydant est susceptible de générer des lésions de l'ADN [Barzilai et Yamamoto, 2004]. En particulier, les ERO oxydent les bases de l'ADN et introduisent des cassures simple-brin et mais également double-brins suite à l'interaction avec la machinerie de réplication. Bien que la présence de cassures double-brins soit moins fréquente, ce type de lésion est bien plus délétère pour la cellule [Woodbine *et al*, 2011].

Nous avons choisi de tester deux molécules pro-oxydantes que sont le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le *tert*-butyl hydroperoxyde (*t*-BOOH) en tant que modulateurs

potentiels de l'épissage de CDC25C. La génération de ERO a été confirmée par analyse en cytométrie de flux dans les cellules MCF-7 traitées par ces deux molécules (**Figure 49**). Contrairement à la Dox qui nécessite d'être métabolisée pour exercer son action oxydante, la génération de ERO induite par H₂O₂ et *t*-BOOH est très rapide (quelques minutes) et plus importante. Le pic de génération de ERO se situe autour de 15 min pour les deux molécules (facteur d'induction de $6,5 \pm 1,7$ pour H₂O₂ et de $3,7 \pm 0,7$ pour *t*-BOOH). Cependant, la quantité de ERO formées diminue très rapidement en présence de H₂O₂, revenant à la normale au bout de 1 h seulement (**Figure 49A**). Ces résultats peuvent être expliqués d'une part par l'instabilité et la réduction rapide de H₂O₂ [Driessens *et al*, 2009] et d'autre part par la mise en place des systèmes antioxydants de la cellule. L'action du *t*-BOOH, quant à elle, est légèrement plus prolongée (**Figure 49B**).

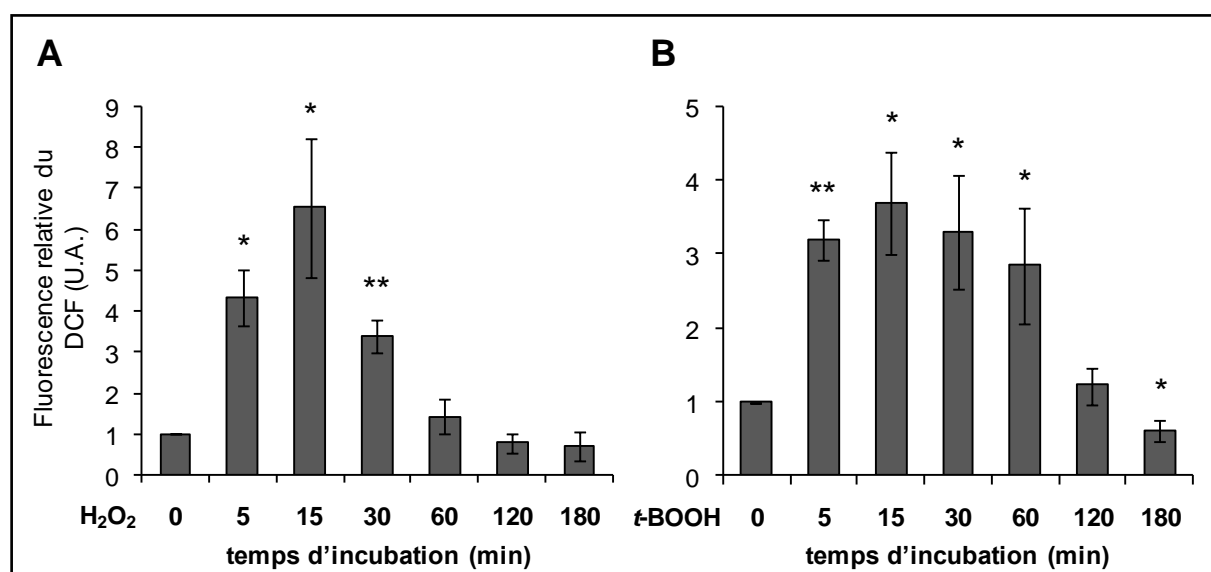


Figure 49. Génération d'espèces réactives de l'oxygène en présence de peroxyde d'hydrogène et de tert-butyl hydroperoxyde. Les niveaux intracellulaires de ERO ont été évalués par cytométrie en flux grâce à la sonde H₂DCFDA après traitement des cellules MCF-7 pendant différents temps en présence de 1 mM de H₂O₂ (A) ou 100 µM de *t*-BOOH (B). * et ** indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test t de Student).

Ces deux molécules induisent des cassures double-brins dans l'ADN comme l'atteste la formation de foyers γ -H2AX (**Figure 50**). Néanmoins, les voies activées en réponse aux dommages à l'ADN semblent quelque peu distinctes de celles activées par les molécules précédentes, puisque l'expression de p53 n'est pas induite (**Figure 50**).

Nous avons alors étudié l'effet de ces deux molécules sur les niveaux des différents transcrits alternatifs et isoformes protéiques de CDC25C. De manière surprenante, *t*-BOOH affecte l'épissage de CDC25C, mais pas H₂O₂ (**Figure 50**). Bien que nous n'ayons pas

exploré plus profondément les raisons de cette divergence, nous pouvons supposer qu'elle tient en partie de la plus grande stabilité du peroxyde organique *t*-BOOH par rapport à H₂O₂ [Woodbine *et al*, 2011].

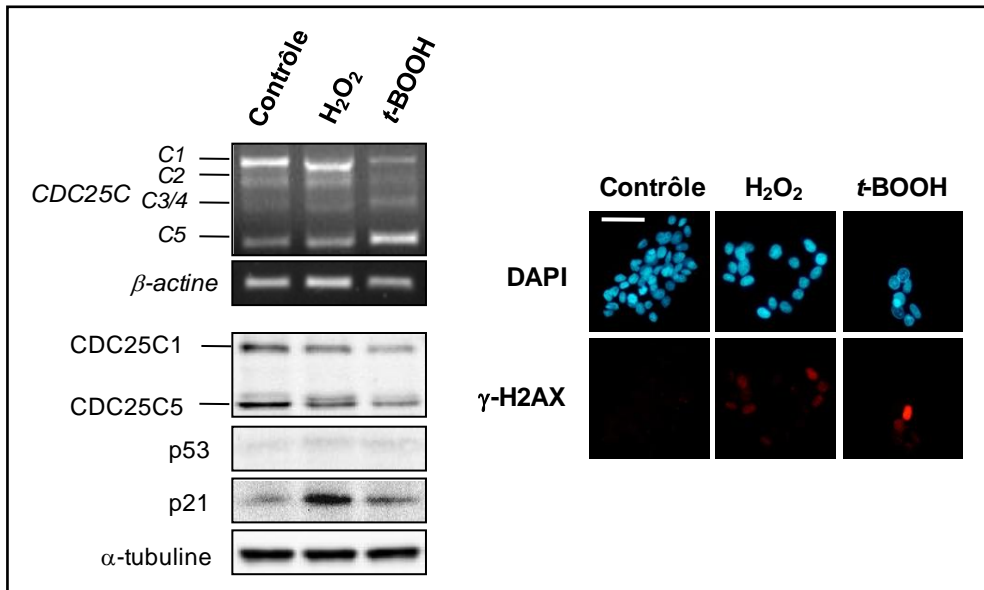


Figure 50. Modulation de l'épissage alternatif de CDC25C par des molécules générant un stress oxydant dans les cellules MCF-7. Les cellules ont été traitées par 1 mM de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et par 100 μM de *tert*-butyl hydroperoxyde (*t*-BOOH) pendant 12 h. *Haut*, l'expression des variants d'épissage de CDC25C a été évaluée par RT-PCR semi-quantitative. *Bas*, les niveaux protéiques de CDC25C, p53 et p21 ont été analysés par immunoblotting. *Droite*, les cellules ont été traitées pendant 24 h et marquées par immunofluorescence avec un anticorps anti-γ-H2AX (AlexaFluor 594, rouge). Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). Barres d'échelle, 50 μm.

Finalement, le traitement des cellules MCF-7 par H₂O₂ et *t*-BOOH provoque un arrêt de cycle cellulaire en phase G₂/M (**Figure 51**), qui s'accompagne d'une induction p53-indépendante de l'inhibiteur de CDK p21 (**Figure 51**).

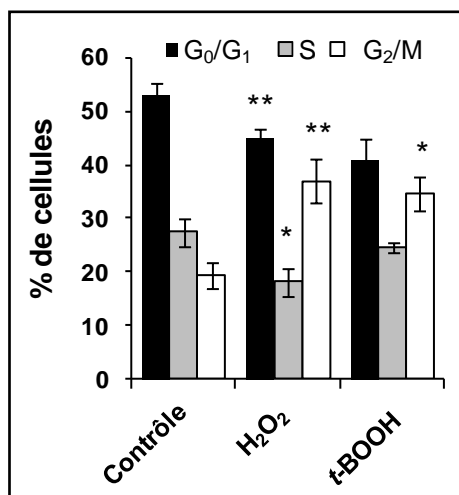


Figure 51. Analyse de la progression dans le cycle cellulaire des cellules MCF-7 traitées par 1 mM de H₂O₂ et 100 μM de *t*-BOOH pendant 24 h.

III. CONCLUSIONS DE LA 2^{ème} PARTIE

Les phosphatases CDC25 sont étroitement régulées en réponse aux dommages à l'ADN. Les mécanismes de cette régulation ont été largement décrits et font intervenir à la fois la répression transcriptionnelle des trois isoformes de CDC25 médiée par p53 [Dalvai *et al*, 2011 ; Demidova *et al*, 2009 ; St Clair *et al*, 2004] et des événements post-traductionnels tels que la dégradation protéasome-dépendante de CDC25A et la séquestration cytoplasmique de CDC25B et CDC25C [Karlsson-Rosenthal et Millar, 2006].

Notre étude a permis de mettre en lumière pour la première fois un degré supérieur de complexité dans la régulation de l'expression du gène *CDC25C* en conditions de stress génotoxique, consistant en une modulation de son épissage alternatif. En effet, nous avons montré que l'expression du variant d'épissage CDC25C5 était augmentée au détriment de celle de CDC25C1, à la fois au niveau des ARNm et des protéines, dans la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 traitées par différents agents génotoxiques tels que les inhibiteurs de topoisomérases doxorubicine, camptothécine et étoposide, l'agent alkylant cisplatine et la molécule génératrice de ERO *tert*-butyl hydroperoxyde. Cette régulation est dépendante de la présence de cassures double-brins dans l'ADN comme l'atteste la formation de foyers γ -H2AX induite par les divers composés affectant l'épissage de *CDC25C*.

A contrario, l'épissage alternatif des gènes *CDC25A* et *CDC25B* n'est pas affecté par l'ensemble de ces agents génotoxiques (**Figure 37** et « Annexes », **Figure 58**), ce qui laisse à penser que la régulation de l'épissage des trois isoformes de *CDC25* fait intervenir des voies distinctes.

De nombreuses études ont montré l'existence d'un lien entre la réponse aux dommages à l'ADN et la modification de l'épissage alternatif de plusieurs gènes impliqués, entre autres, dans le contrôle du cycle cellulaire comme la *cycline D1*, *MDM2* et *MDM4* [Chandler *et al*, 2006 ; Lents *et al*, 2008 ; Markey et Berberich, 2008 ; Wang *et al*, 2008a] et dans l'apoptose comme la *caspase-2*, *Bcl-x* et *FAS* [Filippov *et al*, 2008 ; Shkreta *et al*, 2010 ; Solier *et al*, 2004], suggérant que l'épissage de gènes associés à la prolifération cellulaire et à l'apoptose peut être altéré de manière globale dans les cellules soumises à un stress génotoxique.

Malgré un nombre croissant d'études s'intéressant à la régulation de l'épissage alternatif suite à des dommages à l'ADN, les mécanismes impliqués dans ce processus sont encore mal connus. Nous avons alors amorcé la recherche des mécanismes moléculaires engagés dans la

modulation de l'épissage de CDC25C et montré que cette régulation était indépendante de p53 et dépendante des kinases ATM/ATR. Plusieurs études ont révélé que les cellules cancéreuses étaient capables d'utiliser différents moyens pour modifier l'épissage des pré-ARNm en cas de lésions de l'ADN. Il a notamment été proposé qu'un stress génotoxique pouvait diminuer la vitesse de transcription par le biais de la phosphorylation de l'ARN polymérase II [Muñoz *et al*, 2009] et également altérer la communication entre les machineries de transcription et d'épissage [Dutertre *et al*, 2010], ces deux événements résultant en une exclusion accrue des exons. De plus, de récentes études ont suggéré que les agents causant des dommages à l'ADN pouvaient affecter la structure de la chromatine par acétylation, rendant ainsi certains domaines plus accessibles pour la machinerie d'épissage [Busà et Sette, 2010]. Finalement, l'activation des voies de signalisation en réponse aux diverses conditions de stress peut conduire à la phosphorylation de facteurs d'épissage tels que les hnRNP et les protéines SR, modifiant ainsi leur activité, leur localisation subcellulaire ou leur interaction avec des protéines régulatrices [Biamonti et Cáceres, 2009]. Quelques études ont identifié les facteurs d'épissage capables d'affecter l'épissage alternatif de certains gènes à la suite de dommages à l'ADN. Par exemple, Filippov *et al* ont montré qu'un traitement par l'agent génotoxique mitomycine C induisait l'expression du facteur d'épissage SRp55 en association avec une modification du profil d'épissage des gènes codant le récepteur CD44, la cytokine mda7/IL24 et les kinases KSR1 et ZAK [Filippov *et al*, 2007, 2008]. Dans le cas de la régulation de l'épissage de CDC25C par un stress génotoxique, les facteurs d'épissage potentiellement impliqués restent à découvrir. Cependant, d'après nos résultats, il pourrait s'agir d'effecteurs situés en aval des kinases ATM/ATR dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN. Cette hypothèse est confortée par une étude de criblage protéomique qui a permis d'identifier de nombreux facteurs d'épissage parmi les cibles phosphorylées par ATM/ATR [Matsuoka *et al*, 2007].

A ce stade, la conséquence de l'altération de l'épissage de CDC25C sur la survie cellulaire suite à un traitement par des agents génotoxiques ne peut qu'être spéculée. Dans cette étude, nous avons montré que la modification du profil d'épissage de CDC25C était impliquée dans la réponse précoce aux dommages sub-létaux à l'ADN. En effet, le traitement des cellules MCF-7 par une faible concentration en Dox (1 μ M), induisant des dommages modérés de l'ADN comme l'indique le faible marquage des foyers γ -H2AX, provoque une augmentation du rapport CDC25C5/C1 associée à un arrêt du cycle cellulaire. Cet effet est nettement moins prononcé avec une concentration plus élevée de Dox (5 μ M) conduisant à

des dommages sévères dans l'ADN et à l'induction de l'apoptose, ce qui suggère que la régulation de l'épissage de CDC25C intervient avant la mise en place de l'apoptose.

La principale réponse cellulaire aux agents cytotoxiques consiste en l'activation des voies de mort cellulaire. Cependant, cet effet peut dans certains cas être atténué par l'induction simultanée de mécanismes de protection. Par exemple, la modulation de l'épissage du pré-ARNm *caspase-2* en réponse aux inhibiteurs de topoisomérases conduit à l'augmentation du transcrit court anti-apoptotique de la caspase-2 [Solier *et al*, 2004]. De même, la modification du profil d'épissage du récepteur FAS induite par la mitomycine C résulte en un enrichissement de l'isoforme soluble anti-apoptotique de FAS [Filippov *et al*, 2008]. Ces observations, ainsi que nos résultats, permettent de supposer de manière raisonnable que l'augmentation du rapport CDC25C5/C1 pourrait aider les cellules à résister à l'induction de l'apoptose en présence d'un stress génotoxique modéré. Cette hypothèse est renforcée par l'existence d'une modulation de l'épissage de CDC25C similaire dans les cellules résistantes Vcr-R traitées par la Dox. De plus, nous avons montré dans la première partie de cette étude que le rapport des transcrits *CDC25C5/C1* est plus élevé dans les lignées résistantes Vcr-R et Adr-R par comparaison à la lignée sensible MCF-7 dans des conditions normales. En outre, une surexpression du variant *CDC25C5* a été rapportée dans le cancer de la prostate en corrélation avec une récurrence de l'antigène prostate-spécifique [Ozen *et al*, 2005] et ce variant est également capable d'altérer la dépendance entre l'achèvement correct de la phase S et l'entrée en mitose de façon plus prononcée de CDC25C1 dans la levure *S. pombe* [Bureik *et al*, 2000]. Cette hypothèse semble néanmoins fragilisée par une étude de Varmeh et Manfredi montrant que la surexpression de CDC25C par transfection d'un vecteur viral sensibilise les cellules U2OS à l'apoptose induite par la doxorubicine [Varmeh et Manfredi, 2008]. Toutefois, il est fort probable que cette étude ait été réalisée avec la séquence de l'isoforme CDC25C1. Il serait donc judicieux d'évaluer de la même manière l'effet de la surexpression de l'isoforme CDC25C5, étant donné que les variants CDC25C1 et CDC25C5 pourraient avoir des fonctions distinctes, voire antagonistes.

Conclusions et Perspectives

Les phosphatases CDC25 sont des enzymes clés impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire à la fois en conditions normales et en réponse à des dommages à l'ADN. Une surexpression des isoformes CDC25A et CDC25B a été rapportée dans divers types de cancers, notamment dans le cancer du sein, souvent en association avec une maladie plus agressive et un mauvais pronostic, bien que certaines études aient fourni des résultats contradictoires. Le rôle de CDC25C reste quant à lui mal compris, en particulier dans le cancer du sein. Les incohérences observées entre les différentes études cliniques pourraient provenir en partie du manque de considération de l'épissage alternatif des CDC25. En effet, les trois gènes codant les différentes isoformes de CDC25 sont soumis à un mécanisme d'épissage alternatif générant deux variants pour CDC25A, sept pour CDC25B et cinq pour CDC25C. En raison de l'altération récurrente du processus d'épissage alternatif observée dans les cancers, les variants d'épissage ont récemment émergé comme de potentiels biomarqueurs.

L'objectif principal de ce travail était donc d'évaluer l'implication des différents variants d'épissage de CDC25 dans le cancer du sein, afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs pronostique et/ou prédictif. Nous avons pour cela utilisé deux approches distinctes. La première a consisté en l'évaluation de l'expression de différents variants d'épissage de CDC25 dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein, ainsi que dans des tumeurs mammaires obtenues après exérèse chirurgicale et visait à appréhender le rôle spécifique de ces variants lors de la progression tumorale. Une seconde approche s'est intéressée à un aspect plus mécanistique du processus d'épissage alternatif des CDC25, à savoir sa régulation en conditions de stress génotoxique, dans l'optique de rechercher une éventuelle implication de certains variants dans l'acquisition du phénotype de résistance par les cellules cancéreuses.

Le premier volet de notre travail a dans un premier temps nécessité la mise au point d'une méthode originale de RT-PCR quantitative permettant d'évaluer l'expression globale des trois isoformes de *CDC25*, ainsi que l'expression spécifique des différents transcrits alternatifs d'intérêt (*CDC25A1, A2, B1, B2, C1* et *C5*).

Grâce à cette technique, nous avons caractérisé diverses lignées d'adénocarcinome mammaire humain sensibles (MCF-7 et MDA-MB-231) et résistantes à certains agents anticancéreux (Vcr-R et Adr-R), par comparaison à la lignée non cancéreuse hTERT-HME1, immortalisée par la télomérase. Cette étude nous a permis de confirmer l'hypothèse selon

laquelle la considération de l'épissage alternatif des *CDC25* était indispensable pour pouvoir évaluer correctement leur potentiel pronostique, puisque nous avons observé une expression différentielle des transcrits alternatifs de *CDC25* dans les différentes lignées cellulaires étudiées. En particulier, une surexpression des variants *CDC25A2* et *CDC25B2* de même qu'une augmentation du rapport *CDC25C5/C1* ont été rapportées dans les lignées résistantes et pourraient donc être associées aux modifications qui accompagnent l'acquisition du phénotype résistant dans les cellules cancéreuses mammaires. De manière intéressante, les variants *CDC25A2*, *CDC25B2* et *CDC25C5* possèdent une caractéristique commune, à savoir l'absence dans leur séquence protéique d'un motif de dégradation ubiquitine-protéasome-dépendante, qui pourrait augmenter la stabilité de ces protéines et ainsi leur pouvoir oncogénique. Cependant, le manque de corrélation entre l'expression transcriptionnelle des *CDC25*, leur expression protéique (en particulier pour *CDC25C*) et l'état de phosphorylation de leurs substrats *CDK1* et *CDK2*, pourrait restreindre leur utilisation en clinique.

Toutefois, il est important de souligner que le modèle de cellules non cancéreuses utilisé dans cette étude n'est pas des plus appropriés, les cellules hTERT-HME1 présentant des dérégulations du cycle cellulaire proches de celles observées dans les stades précoces de cancer. Pour la suite de cette étude cellulaire, nous prévoyons d'utiliser des cultures primaires mammaires en tant que modèle de cellules non cancéreuses, qui seront établies grâce à une collaboration se mettant actuellement en place avec l'Hôpital de Coimbra (Portugal).

Nous avons ensuite poursuivi l'exploration de l'expression des variants d'épissage de *CDC25* dans des modèles tissulaires de cancer du sein. Pour cela, une équipe de travail regroupant les compétences de cliniciens, d'anatomopathologistes et de statisticiens a été constituée autour de notre laboratoire. Nous avons analysé un échantillon de population de 75 patientes, atteintes d'un cancer du sein primitif non traité. Pour chaque patiente, nous avons comparé le tissu tumoral au tissu non tumoral périphérique (tissu péri-tumoral).

Les résultats de RT-PCR quantitative ont montré sans ambiguïté que l'ensemble des transcrits de *CDC25* analysés étaient surexprimés dans les tumeurs, mais dans des proportions variables. Ainsi, 64% des tumeurs présentent une expression accrue de *CDC25A*, celle-ci étant principalement imputable au variant *CDC25A1*. L'expression globale de *CDC25B* est augmentée dans 55% des tumeurs et dépend de l'expression du variant *CDC25B1* (surexprimé dans 47% des tumeurs) et à moindre mesure du variant *CDC25B2* (21%). Cette faible implication de *CDC25B2* est quelque peu surprenante au regard de sa surexpression dans plusieurs des lignées cancéreuses étudiées et surtout des résultats de la littérature rapportant

une surexpression consécutive de ce variant dans le cancer colorectal et le lymphome non-hodgkinien. Il est en outre fort probable que le variant *CDC25B3*, dont nous n'avons malheureusement pas pu évaluer l'expression, soit également impliqué dans l'augmentation d'expression globale de *CDC25B*. Finalement, cette étude a permis de montrer pour la première fois une surexpression de l'isoforme *CDC25C* dans le cancer du sein, qui est retrouvée dans 75% des tumeurs de notre population. Cette augmentation d'expression globale de *CDC25C* est principalement liée à la forte surexpression du transcrite *CDC25C5* dans de nombreuses tumeurs (86%), alors que la surexpression de *CDC25C1* est plus limitée à la fois en terme de facteur d'induction et de nombre de tumeurs concernées (43%). Ces résultats sont en adéquation avec l'augmentation du rapport *CDC25C5/C1* précédemment observée dans les lignées résistantes et confirment l'implication essentielle du variant *CDC25C5* dans le cancer du sein.

Nous avons alors montré que les niveaux d'expression des différents transcrits de *CDC25* étudiés étaient significativement corrélés entre eux. Ces résultats vont à l'encontre de précédentes données de la littérature et suggèrent que l'expression des trois isoformes de *CDC25* pourrait être dérégulée de manière globale dans le cancer du sein, par l'intervention de facteurs de transcription communs qui restent à identifier.

Enfin, l'appui précieux des outils statistiques nous a permis d'établir clairement certaines corrélations entre l'expression des transcrits *CDC25* et certaines caractéristiques histopathologiques des tumeurs associées à un mauvais pronostic. Par exemple, nous avons pu montrer une association entre l'expression des différents transcrits de *CDC25A* et *CDC25B* et le grade histologique de la tumeur ou l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes. De même, une forte expression de *CDC25C* est corrélée à une taille plus élevée de la tumeur. Cependant, certaines associations n'ont pu donner de résultats statistiquement significatifs, probablement en raison d'un nombre restreint d'échantillons dans certains sous-groupes. Nous envisageons donc de poursuivre cette étude sur une plus large population afin de permettre une analyse statistique plus précise.

Cette étude tissulaire sera poursuivie dans trois directions principales. Premièrement, il serait intéressant d'évaluer plus précisément l'expression d'autres variants d'épissage tels que *CDC25B4* pour lequel nous avons détecté une expression plutôt importante par RT-PCR semi-quantitative dans les lignées de cancer du sein par rapport aux études précédentes menées sur d'autres types de cancer, ainsi que le variant *CDC25C4* dont l'expression semble augmentée dans les deux lignées résistantes Vcr-R et Adr-R. De plus, l'étude de l'expression

et des mutations du gène codant p53 pourrait également nous éclairer sur les mécanismes sous-jacents à la dérégulation d'expression des *CDC25* dans les cancers.

Un point important à considérer concerne le manque de corrélation observée entre les niveaux transcriptionnels et protéiques de *CDC25*. Il apparaît donc essentiel à l'avenir d'analyser en parallèle l'expression protéique des *CDC25* dans les tumeurs. Néanmoins, cette analyse nécessitera une quantité importante de tissu, qui pourrait s'avérer difficile à obtenir.

La troisième direction que nous souhaitons adopter vise à acquérir des informations complémentaires sur les patientes, en particulier en relevant leur taux de rémission et de survie, ainsi que leur taux de réponse aux traitements anticancéreux. Ces informations devraient nous permettre de clarifier le potentiel pronostique et prédictif, respectivement, des différents variants d'épissage de *CDC25*.

La deuxième partie de notre travail visait à étudier la régulation du processus d'épissage alternatif des *CDC25* en réponse à des dommages à l'ADN dans des lignées cellulaires de cancer du sein. Cette étude a permis de mettre en évidence pour la première fois une modulation de l'épissage de *CDC25C* (mais pas de *CDC25A* et *CDC25B*) suite à un traitement des cellules MCF-7 par divers agents génotoxiques, tels que la doxorubicine, la camptothécine, l'étoposide, le cisplatine et le *tert*-butyl hydroperoxyde. Là encore, le variant *CDC25C5* semble jouer un rôle très important, puisqu'une nette augmentation du rapport *CDC25C5/C1* a été observée dans ces conditions, à la fois au niveau des ARNm et des protéines. Nous avons par ailleurs démontré que cette modulation d'épissage intervenait au cours de la réponse à des dommages modérés à l'ADN associés à un arrêt du cycle cellulaire, pour ensuite disparaître en cas de dommages plus importants conduisant à la mise en place du processus apoptotique. En outre, une partie des mécanismes impliqués dans la régulation de l'épissage de *CDC25C* a été élucidée. Nous avons ainsi montré que cette régulation était dépendante des kinases ATM/ATR et indépendante de p53.

Pour la suite de ce projet, il serait intéressant de tester l'impact d'autres agents chimiothérapeutiques génotoxiques, ainsi que des rayons ionisants, sur la modulation d'épissage de *CDC25C* afin de mieux appréhender la réponse cellulaire à la chimiothérapie d'une part et à la radiothérapie d'autre part.

De plus, nous envisageons de poursuivre la recherche des mécanismes moléculaires engagés dans la modulation de l'épissage de *CDC25C*. Nous focaliserons notre attention sur

les effecteurs situés en aval des kinases ATM/ATR et en particulier sur certains facteurs d'épissage connus pour être phosphorylés par ces kinases.

A ce stade, la conséquence de l'altération de l'épissage alternatif de CDC25C sur la survie des cellules en réponse à un stress génotoxique ne peut être déterminée avec certitude, même si la surexpression du variant *CDC25C5* observée dans les lignées cellulaires résistantes pourrait faire pencher vers l'implication de ce variant dans les processus de résistance cellulaire aux agents anticancéreux. Afin de confirmer cette hypothèse, il apparaît essentiel de transfecter les cellules MCF-7 avec un vecteur d'expression du variant *CDC25C5* (en comparaison à *CDC25C1*), puis d'étudier alors la sensibilité des cellules à la doxorubicine et à d'autres agents génotoxiques.

Si la surexpression de *CDC25A* et *CDC25B* a clairement été rapportée dans de nombreux cancers, corroborant leur potentiel oncogénique, l'implication de *CDC25C* dans la progression tumorale est restée jusqu'à présent énigmatique. En effet, aucun pouvoir oncogénique n'a été observé pour *CDC25C* [Galaktionov *et al*, 1995] et très peu d'études ont mis en évidence une surexpression de cette isoforme dans les cancers. En démontrant l'importance de *CDC25C* dans le cancer du sein et la réponse aux traitements génotoxiques, notre étude a permis d'apporter un regain d'intérêt pour cette isoforme. Nos résultats suggèrent, en outre, que l'ambiguïté des précédentes études pourrait en grande partie être liée à la non considération de l'épissage alternatif de *CDC25C*. Nous avons en effet mis en lumière le rôle primordial du variant *CDC25C5* par rapport à *CDC25C1* à la fois dans la progression tumorale et dans la réponse aux dommages à l'ADN. Ces observations pourraient remettre en question l'absence de pouvoir oncogénique rapporté pour *CDC25C* [Galaktionov *et al*, 1995]. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer séparément, à l'avenir, le rôle de chaque variant d'épissage de *CDC25C* dans la tumorigenèse.

Finalement, si l'intérêt des variants d'épissage de *CDC25* était confirmé par des études prospectives à grande échelle, il serait intéressant à l'avenir de pouvoir inclure l'étude de leur expression dans des signatures multigéniques pronostiques de type MammaPrint® ou Oncotype DX®. De plus, cela pourrait ouvrir la voie à de nouvelles options de thérapie personnalisée basées sur l'inhibition sélective des variants d'épissage de *CDC25* préférentiellement impliqués dans le développement tumoral.

*Patientes, Matériel
et Méthodes*

I. PATIENTES ET PRÉLÈVEMENTS TISSULAIRES

Un total de 75 patientes portugaises atteintes d'un carcinome mammaire primitif, diagnostiqué entre 2008 et 2011, ont été incluses dans cette étude. Elles ont subi une tumorectomie ou une mastectomie au Service de Gynécologie-Obstétrique de l'Hôpital São Francisco Xavier de Lisbonne, sans avoir reçu de traitement de chimiothérapie ou de radiothérapie pré-opératoire. Après récupération du matériel nécessaire à l'examen anatomopathologique, les fragments de tissus tumoraux et péritumoraux appariés excédentaires ont été transférés le plus rapidement possible dans du RNAlater® (Ambion), une solution de stabilisation des ARN. Les échantillons ont d'abord été mis à 4°C pendant 1 à 3 jours pour que le RNAlater® pénètre bien à l'intérieur du fragment de tissu, puis ont été stockés à -20°C pour une conservation longue durée. Les informations cliniques concernant les patientes ainsi que les caractéristiques histopathologiques des tumeurs nous ont été fournies par le Service d'Anatomie Pathologique dans le respect le plus strict de l'anonymat.

II. CULTURE CELLULAIRE

II.1. Lignées cellulaires

Quatre lignées cellulaires issues d'adénocarcinomes mammaires humains ont été étudiées. Les lignées MCF-7 (ECACC, 86012803, Soule *et al*, 1973) et MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26, Cailleau *et al*, 1974) sont issues d'une effusion pleurale de deux patientes différentes diagnostiquées avec un cancer du sein. Ces deux lignées sont considérées comme sensibles vis-à-vis de différents agents anticancéreux. Par ailleurs, deux lignées résistantes dérivant de la lignée MCF-7 ont été utilisées : la lignée Vcr-R (Whelan *et al*, 1992) et la lignée Adr-R (Batist *et al*, 1986) sélectionnées respectivement pour leur résistance à la vincristine et à l'adriamycine (ou doxorubicine), mais présentant aussi toutes deux une résistance croisée à une variété de traitements anticancéreux.

En parallèle, la lignée épithéliale mammaire hTERT-HME1 (ATCC, CRL-4010), immortalisée avec la transcriptase inverse de la télomérase humaine (hTERT), a été utilisée comme modèle de cellules non cancéreuses.

II.2. Conditions de culture

Tous les réactifs et milieux de culture sont fournis par la société Eurobio, tandis que le matériel de culture cellulaire (flacons, boîtes de Pétri, tubes...) provient de BD Falcon. Toutes les manipulations de culture cellulaire sont réalisées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire verticale (Jouan). Les cellules MCF-7, Vcr-R et MDA-MB-231 sont cultivées en monocouche en flacons de Roux de 75 cm² dans du milieu RPMI 1640 dit « complet » une fois additionné de 1,25 mM de pyruvate de sodium, 0,5 X d'acides aminés essentiels, 0,5 X d'acides aminés non essentiels, 2 mM de L-glutamine, 0,4 X de vitamines, 0,01 mg/mL de L-sérine, 0,02 mg/mL de L-asparagine, 100 U/ml d'antibiotique/antifongique et 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂. Les cellules Adr-R sont cultivées dans les mêmes conditions, mais en présence de 10 µM de doxorubicine afin de maintenir leur phénotype résistant. Enfin, la lignée hTERT-HME1 est maintenue dans 90% de milieu RPMI 1640 « complet » (sans antibiotique/antifongique) et 10% de milieu MEGM [milieu MEBM (Cambrex) supplémenté avec 0,52 µg/mL d'extrait pituitaire bovin ; 10 ng/mL de facteur de croissance épidermique humain ; 0,5 µg/mL d'hydrocortisone et 5 mg/mL d'insuline].

Lorsque les cellules atteignent un niveau de sub-confluence, le milieu est éliminé par aspiration et remplacé par une solution de trypsine-EDTA 1X permettant aux cellules de se détacher du support et de se dissocier les unes des autres. Après 5 min, l'action de la trypsine est inhibée par ajout d'un volume équivalent de milieu de culture. Les cellules sont alors centrifugées à 500 x g pendant 5 min, puis remises en suspension dans du milieu de culture frais. Un comptage de cette suspension est réalisé grâce à une cellule de Malassez après coloration au bleu de trypan (0,4% (v/v)). Enfin, les cellules sont réensemencées en flacons de 75 cm² ou en boîtes de Pétri (63,6 cm²) à une densité précisée pour chaque méthode. Les cultures cellulaires sont arrêtées à partir de 10 passages et relancées par décongélation d'un nouveau stock de cellules.

II.3. Congélation et décongélation des cellules

L'établissement des stocks cellulaires se fait par mise en suspension des cellules en culture dans du milieu de congélation froid [milieu de culture complet supplémenté de 10% (v/v) de SVF et de 10% (v/v) de diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich)] à raison de

3.10^6 cellules/cryotube. Les cellules subissent ensuite des paliers de congélation : 20 min à -20°C , puis 2 h à -80°C , avant d'être finalement conservées dans l'azote liquide.

Lors de la remise en culture, la suspension cellulaire est rapidement décongelée à 37°C . Le milieu de congélation est éliminé et les cellules sontensemencées en flacons de Roux dans du milieu complet frais.

II.4. Traitement des cellules en culture

Sauf indications contraires, les traitements sont effectués en boîtes de Pétriensemencées à raison de 1.10^6 cellules. Après adhésion des cellules pendant 24 h, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais contenant la molécule à tester à la concentration appropriée. Les cellules sont alors incubées à 37°C pendant la durée désirée pour chaque expérience. Les molécules utilisées lors des différents traitements proviennent de la société Sigma-Aldrich, sauf le peroxyde d'hydrogène et le *tert*-butyl hydroperoxyde qui ont été fournis par la firme Acros. En parallèle de chaque traitement, un contrôle contenant un pourcentage de solvant équivalent est réalisé (entre 0,1 et 0,5% de solvant). A l'issue du traitement, les cellules sont récupérées de manière distincte selon les différentes méthodes employées. Le protocole de récupération est de ce fait décrit dans les paragraphes correspondants.

III. TEST DE CYTOTOXICITÉ AU MTT

Ce test est basé sur la réduction du bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium (MTT) par la succinate deshydrogénase mitochondriale en cristaux de formazan insolubles dans l'eau et de couleur bleue foncée (Mosmann, 1983) (**Figure 52**). La quantité de cristaux formés est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et permet donc d'évaluer la cytotoxicité de composés.

Les tests de cytotoxicité sont réalisés en microplaques de 96 puits (surface individuelle de $0,36\text{ cm}^2$). Chaque puits estensemencé à raison de 10 000 cellules dans 100 μL de milieu de culture et les cellules sont incubées à 37°C pendant 24 h. Après adhésion des cellules, le milieu initial est remplacé par 100 μL de milieu de culture frais contenant différentes concentrations en composé à tester ou le solvant seul (0,5% (v/v) de solvant maximum).

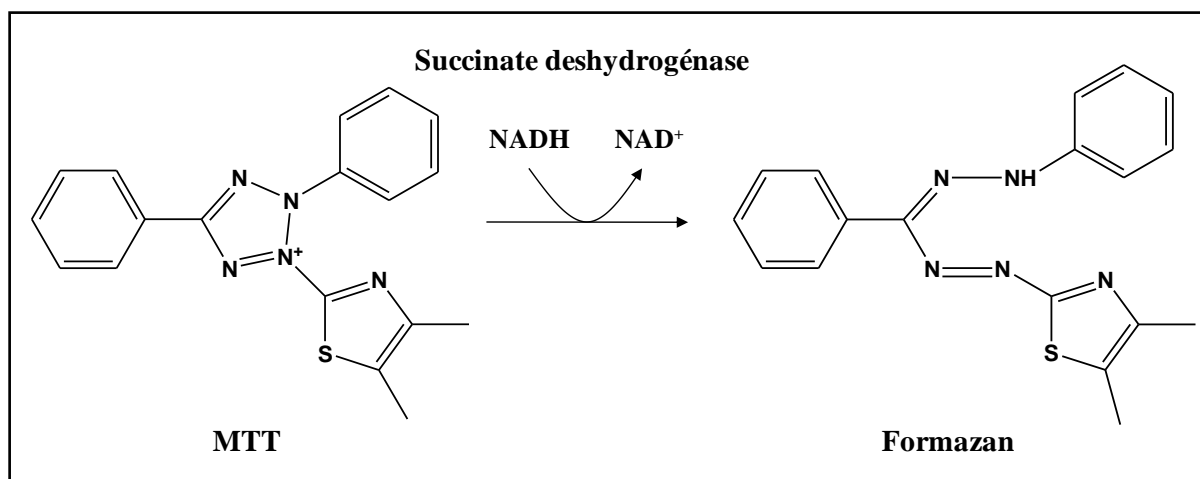


Figure 52. Principe du test de viabilité cellulaire au MTT.

Après 24 h de traitement, les solutions sont aspirées et les puits sont rincés à l'aide de tampon PBS 1X [0,2 g/L KH₂PO₄ ; 1,15 g/L Na₂HPO₄ ; 0,2 g/L KCl ; 8 g/L NaCl, Eurobio]. Les cellules sont alors mises en contact avec une solution de MTT à 0,5 mg/mL dans du milieu RPMI et incubées pendant 3 h à 37°C. Dès lors, la solution de MTT est substituée par 100 µL de DMSO afin de dissoudre les cristaux de formazan et l'intensité de coloration est mesurée par spectrophotométrie à 550 nm grâce à un lecteur de plaques (Dynatech MR5000). Les valeurs de CI₅₀ (concentration en composé nécessaire pour inhiber la croissance des cellules de 50% par rapport aux cellules non traitées) sont estimées à l'aide du programme informatique GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

IV. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES GÈNES

L'expression d'un gène à un temps donné est généralement fonction de l'abondance de ses ARNm. Pour évaluer les niveaux d'ARNm, les ARN totaux des cellules sont d'abord extraits, puis convertis en ADN complémentaire (ADNc) lors de l'étape de rétrotranscription (RT). Ces ADNc sont ensuite amplifiés au cours de l'étape de réaction en chaîne par la Taq-polymérase (PCR). Dans cette étude, deux méthodes distinctes et complémentaires seront utilisées : la RT-PCR semi-quantitative (analyse en point final) et la RT-PCR quantitative (analyse en temps réel).

A noter que la manipulation d'acides nucléiques nécessite des précautions particulières, notamment en raison du risque élevé de dégradation des ARN par des RNases. Le matériel utilisé doit donc être stérile et dépourvu de RNases et DNases.

IV.1. RT-PCR semi-quantitative

IV.1.1. Extraction des ARN totaux cellulaires

Les cellules sont lysées par ajout d'1 mL de TRI Reagent® (Ambion) directement dans la boîte de Pétri selon le protocole décrit par Chomczynski et Sacchi (1987). Après 5 min d'incubation à température ambiante, les complexes nucléoprotéiques sont dissociés. 200 µL de 1-bromo-3-chloropropane sont ajoutés, les échantillons sont agités vigoureusement par retournement pendant 15 sec et incubés pendant 5 min avant centrifugation à 12 000 x g pendant 15 min à 4°C. Les ARN sont alors récupérés avec précaution à partir de la phase aqueuse supérieure incolore. Ils sont ensuite précipités par incubation pendant 10 min dans 500 µL d'isopropanol et centrifugation à 12 000 x g pendant 10 min à 4°C. Le culot d'ARN est lavé dans 75% d'éthanol et centrifugé à 8 000 x g pendant 5 min à 4°C. Après évaporation de l'éthanol à l'air, le culot d'ARN est solubilisé dans de l'eau ultrapure certifiée sans RNases ni DNases (*Nuclease-free water* ou NFW).

La concentration en ARN est finalement déterminée par spectrophotométrie UV à 260 nm (1 UA₂₆₀ correspond à 40 µg d'ARN/mL). La pureté des ARN est estimée grâce au calcul du rapport A₂₆₀/A₂₈₀ qui doit être supérieur à 1,8 en absence de contamination par de l'ADN ou des protéines. Par ailleurs, 2 µg de la solution d'ARN sont déposés sur un gel d'agarose à 2% afin de vérifier l'absence d'ADN génomique ou d'ARN dégradés (rapport ARNr 28S/18S ≈ 2).

IV.1.2. Rétrotranscription des ARNm

L'enzyme utilisée pour la réaction de rétrotranscription est une ADN polymérase ARN-dépendante, la MMLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*). Les ARNm polyadénylés sont rétrotranscrits de manière sélective grâce à l'utilisation d'amorces oligodT. D'abord, 2 µg d'ARN totaux sont dénaturés 10 min à 70°C pour permettre l'hybridation des oligodT (10 µM, Eurobio). La réaction de RT se déroule ensuite pendant 1 h à 42°C en présence de 400 U de MMLV-RT (Promega) dans 1 X de tampon RT, 1,2 U/µL d'inhibiteur de RNases (RNaseOUT™, Invitrogen) et 0,5 mM de dNTP (Eurobio).

IV.1.3. Amplification des ADNc par PCR

L'étape de PCR permet d'amplifier les séquences d'ADNc d'intérêt grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques et de la Taq ADN polymérase, une enzyme thermostable purifiée à partir de la bactérie *Thermus aquaticus*.

Les séquences des amorces ont été choisies en respectant les règles classiques à savoir l'absence d'hybridation intra- ou intermoléculaire entre les deux amorces, une température de fusion et un pourcentage en GC équivalent. De plus, les amorces sens et antisens s'hybrident au niveau d'exons différents afin d'éviter l'amplification de séquences d'ADN génomique. Ensuite, les conditions de température d'hybridation et de nombre de cycles d'amplification ont été optimisées pour chaque couple d'amorces afin de se placer dans la phase exponentielle d'amplification, pré-requis indispensable pour permettre une analyse semi-quantitative fiable (**Tableau 8**).

La réaction de PCR s'effectue à partir de 100 ng d'ADNc préparés lors de l'étape de RT en présence de 1,5 mM de MgCl₂, 1 X de tampon PCR, 0,25 mM de dNTP, 0,1 U/μL de Taq ADN polymérase (Eurobio) et d'amorces cibles sens et antisens à la concentration indiquée dans le **tableau 8**. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur PTC-100™ (MJ Research) selon les conditions suivantes :

- Dénaturation à 95°C pendant 45 sec
 - Hybridation à une température spécifique pour chaque couple d'amorces pendant 45 sec
 - Elongation à 72°C pendant 1 min 30 sec
 - Elongation finale à 72°C pendant 5 min
- } n nombre de cycles d'amplification
(se référer au **tableau 8**)

Les fragments amplifiés, additionnés de tampon de charge (Sigma-Aldrich), sont alors déposés sur un gel à 2% d'agarose contenant 0,5 μg/mL de bromure d'éthidium, puis séparés par migration électrophorétique à 100 V dans du tampon Tris-borate EDTA. Une échelle de 100 pb (Euromedex) est également déposée afin de déduire la taille des amplicons. Finalement, les produits de PCR sont visualisés et quantifiés sous UV à l'aide du système Molecular Imager ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

Tableau 8. Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes d'intérêt par RT-PCR semi-quantitative.

Gene d'intérêt	Séquences nucléotidiques (5' → 3')	Taille de l'amplicon (pb)	[Amorces] (µM)	Conditions de PCR
<i>CDC25A global</i>	S : TGG AGA GAA TCT GAA GAA TG AS : TTG CCA TTC AAA ACA GAT GC	447	0,4	T hybridation = 60°C, nombre de cycles = 32
<i>CDC25B global</i>	S : GAC GCA CCT ATC CCT GTC TC AS : GGC ATA GAC TGG AAG CGT CT	204	0,25	T hybridation = 60°C, nombre de cycles = 28
<i>CDC25C global</i>	S : ATG CCA GAG AAC TTG AAC AGG CCA AS : ATC TTG GTG TTT CCC TGA CAC GGT	255	0,25	T hybridation = 60°C, nombre de cycles = 28
<i>CDC25A variants</i> (Wegener et al., 2000)	S : GGG GGA CTG TCG CCT GTC ACC AAC CT AS : GGG GTC TCC TCC TCA TTC TTC AGA TTC	A1=593, A2=473	0,4	T hybridation = 63°C, nombre de cycles = 32
<i>CDC25B variants</i> (Baldin et al., 1997)	S : GCT TCC TCG CCG GTC ACC AC AS : CCT GCG GCT GGC CCA CTC	B4=627, B3=522, B1=480, B2=399	0,25	T hybridation = 63°C, nombre de cycles = 32
<i>CDC25C variants</i> (Wegener et al., 2000)	S : CTC CTG GAG AGA GAC ACT TCC TTT AC AS : CCA CTT CTG CTC ACC TTT GCT TCT TG	C1=535, C2=445, C3=411, C4=406, C5=316	0,25	T hybridation = 63°C, nombre de cycles = 35
<i>CDK1</i>	S : GGA GTT GTG TAT AAG GGT AG AS : GAG TGT TAC TAC CTC ATG TG	456	0,25	T hybridation = 60°C, nombre de cycles = 30
<i>CDK2</i>	S : ATC AAG AGC TAT CTG TTC CA AS : ATC AGG CAT AGA AGT AAC TC	396	0,25	T hybridation = 60°C, nombre de cycles = 30
<i>p53</i>	S : ATT CTG GGA CAG CCA AGT CT AS : GGA GTC TTC CAG TGT GAT GA	437	0,25	T hybridation = 60°C, nombre de cycles = 27
<i>β-actine</i>	S : GGA CGA CAT GGA GAA AAT CTG G AS : TGG ATA GCA ACG TAC ATG GCT G	174	0,08	T hybridation = 60°C, nombre de cycles = 24

IV.2. RT-PCR quantitative

IV.2.1. Extraction des ARN totaux cellulaires et traitement à la DNase I

Les ARN totaux des lignées cellulaires sont extraits de la même manière que pour la RT-PCR semi-quantitative en utilisant le réactif TRI Reagent® (cf. IV.1.1). Cependant, la distinction entre chaque variant d'épissage de *CDC25* nécessaire à notre étude n'a pas toujours permis de choisir des amorces s'hybridant à la jonction exon-exon comme cela est recommandé pour la PCR en temps réel. Pour parer à cette contrainte, les ARN ont été incubés 10 min à température ambiante avec de la DNase I (Qiagen) afin d'éliminer les traces résiduelles d'ADN génomique, susceptibles de fausser les résultats. La DNase a ensuite été éliminée des échantillons par une nouvelle extraction avec le TRI Reagent®.

IV.2.2. Extraction des ARN totaux tissulaires

Les ARN totaux provenant des tissus tumoraux et péri-tumoraux ont été obtenus grâce au kit d'extraction sur colonnes SV Total RNA System (Promega), incluant également une étape d'élimination de l'ADN génomique.

Il est indispensable d'utiliser la même quantité d'ARN pour tous les échantillons afin de pouvoir comparer les résultats obtenus au cours de la PCRq. La mesure de l'absorbance à 260 nm et 280 nm sur un spectrophotomètre classique n'est cependant pas envisageable dans notre projet, car elle nécessiterait une quantité trop importante d'ARN. Cette quantification a donc été réalisée à l'aide d'un NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific) qui requiert seulement 1 µL d'échantillon. Par ailleurs, des ARN de bonne qualité sont indispensables pour pouvoir justifier la significativité des résultats obtenus en PCRq. La migration des ARN totaux sur gel d'agarose pour déterminer le rapport ARNr 28S/18S étant impossible du fait de la consommation excessive d'ARN. Les ARN ont donc été analysés sur l'appareil Bioanalyzer 2100 (Agilent) pour lequel, là encore, 1 µL d'ARN suffit. Cet appareil présente en plus l'intérêt de chiffrer le degré de qualité de l'ARN grâce au calcul du RIN (*RNA Integrity Number*, **Figure 54**), celui-ci devant être supérieur à 8 pour que les ARN soient exploitables.

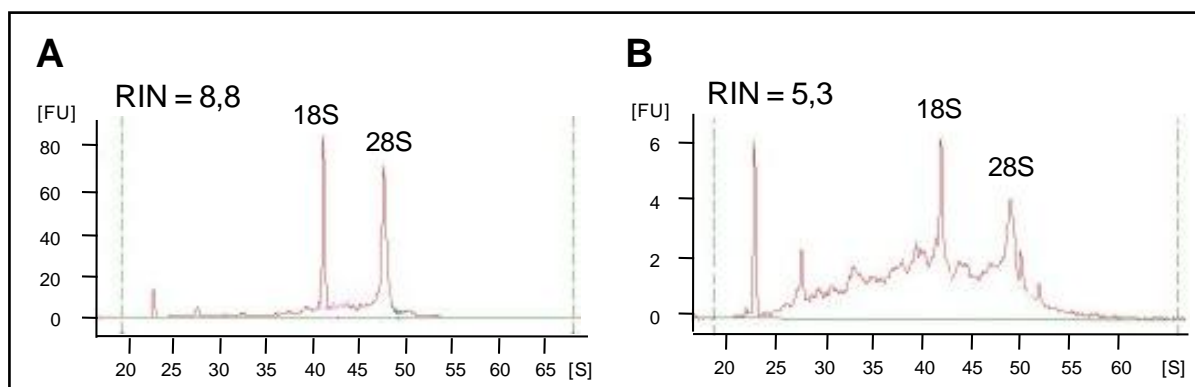


Figure 53. Analyse de l'intégrité des ARN sur l'appareil Bioanalyzer 2100 d'Agilent. (A) ARN de bonne qualité. (B) ARN partiellement dégradés. RIN : RNA Integrity Number.

IV.2.3. Rétrotranscription des ARNm

La synthèse des ADNc a été réalisée à l'aide du kit TaqMan Reverse Transcription Reagent (Applied Biosystems). Les ARN ont été rétrotranscrits en utilisant des amorces hexamériques aléatoires, afin de récupérer les ARNm mais aussi l'ARNr 18S qui servira de gène de référence lors de la PCRq. Pour cela, une quantité d'ARN totaux $\leq 2 \mu\text{g}$ a été incubée en présence de 1 X de tampon de RT, 5,5 mM de MgCl_2 , 0,5 mM de dNTP, 2,5 μM d'amorces hexamériques aléatoires, 0,4 U/ μL d'inhibiteur de RNases et 46,9 U/ μL de Multiscribe Reverse Transcriptase. Les conditions de RT sont les suivantes : 25°C pendant 10 min, 48°C pendant 30 min et enfin 95°C pendant 5 min.

IV.2.4. Amplification des ADNc par PCRq

La réaction de PCR quantitative est réalisée en plaques de 96 puits à partir d'une quantité $\leq 53 \text{ ng}$ d'ADNc préparés lors de l'étape de RT, mis en présence de 1 X du kit iTaq Supermix with ROX (Bio-Rad), 1 X d'un kit de détection de l'ARNr 18S (Eucaryotic 18S rRNA Endogenous Control VIC/MGB Probe, Applied Biosystems), 0,4 μM d'amorce sens, 0,4 μM d'amorce antisens et 0,3 μM de sonde TaqMan® 5'FAM-TAMRA3'. Les séquences des amorces et des sondes TaqMan® choisies pour la reconnaissance spécifique des différents transcrits alternatifs de *CDC25* sont présentées dans le **tableau 9**.

L'amplification des ADNc et la détection de la fluorescence libérée au cours de chaque cycle est réalisée à l'aide des équipements de PCR en temps réel 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) et StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), en suivant les conditions suivantes :

- Activation de l'iTaq polymérase à 95°C pendant 3 min
 - Dénaturation à 95°C pendant 15 sec
 - Hybridation à 60°C pendant 1 min
- } 45 cycles d'amplification

Le niveau d'expression des différents variants d'épissage dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus péri-tumoraux est alors déterminé par quantification relative comme expliqué dans le chapitre « Résultats ».

Tableau 9. Séquences des amorces et sondes TaqMan® utilisées pour l'amplification des transcrits d'intérêt par RT-PCR quantitative.

Séquence cible	Séquences nucléotidiques (5' → 3')	Taille de l'amplicon (pb)
<i>CDC25A totale</i>	S : GAA AGA GAT AGC AGT GAA CCA GGG AS : TCC ACG AAG CCA TCA TCC TCA TCA P : AGT CAC CTG TGA CAG CCA CTT TGT CTG	98
<i>CDC25A1</i>	S : AGT AAG ACC TGT ATC TCG TGG CTG AS : CAG AGT TCT GCC TCT GTG TGA AGA P : TCT CAT GGA CTC CAG GAG GGT AAA GAT CT	83
<i>CDC25A2</i>	S : AGG AGC CAT TCT GAT TCT CTT G AS : TCA CAG GTG ACT GGG GTG TA P : AGA TGA GAA CAA GGA AAA TCT TTC CTC A	122
<i>CDC25B totale</i>	S : TCC TGA CCG GAA GAT GGA AG AS : AGG ATG TCC ACA AAT CCA TCA P : CCC CTG GCC CTA GGT CGC TTC	111
<i>CDC25B1</i>	S : CCG GTC ACC ACC CTC ACC CA AS : GGA TAG GTG CGT CAG GCG GC P : ACC TCG CCG GGC TCG GCA GCC GCA	75
<i>CDC25B2</i>	S : TCG AAA CGA GCA GTT TGC CAT CA AS : TGT GGG CTT CCA TGG CAT CTT GA P : ACG CTT CCA GTC TAT GCC GGA TGG ATT TGT C	79
<i>CDC25C totale</i>	S : GGA GGA AGA TTC TAA CCA GG AS : GAT CTT GGT GTT TCC CTG AC P : TTT CCA AGG TAT GTG CGC TGC CAA	86
<i>CDC25C1</i>	S : TGG GGA GAT AAC TGC CAC TCA AS : AGA AGC TGT GCT GGG CTA CAT T P : ATT CTT CAG GAC TTC AGG AAG TGC ATT	144
<i>CDC25C5</i>	S : AGC ATT TTG TCT GGG TCA CCT G AS : GTT TCC ATT GTC ATC CCA GCT A P : ATT CTT CAG GAC TTC AGG AAG TGC ATT	72

S : amorce sens ; AS : amorce antisens ; P : sonde TaqMan® 5'FAM-TAMRA3' (*Probe*).

V. ANALYSE DES NIVEAUX PROTÉIQUES

V.1. Immunoblot

V.1.1. Préparation des lysats cellulaires

Les cellules traitées sont récupérées par trypsination, après élimination du milieu de culture. La suspension est centrifugée à 500 x g, pendant 5 min à 4°C et le culot ainsi obtenu est lavé trois fois dans du tampon PBS 1X froid avant d'être conservé à -80°C jusqu'à extraction des protéines.

Les culots cellulaires sont resuspendus et incubés pendant 30 min à 4°C dans du tampon de lyse [50 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1 mM EGTA ; 0,1% (m/v) SDS ; 0,1% deoxycholate ; 0,5% Nonidet NP-40 ; 10% glycérol ; 1 mM PMSF ; 3% cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich)] supplémenté ou non avec des inhibiteurs de phosphatases (25 mM NaF ; 2 mM Na₂VO₄). Les suspensions cellulaires ainsi obtenues sont alors traitées aux ultrasons à raison de deux séries de 5 sec (sonicateur VibraCell, Fisher Bioblock Scientific, puissance 50) et centrifugées à 12 000 x g, pendant 15 min à 4°C afin d'éliminer les débris membranaires et le matériel insoluble.

V.1.2. Dosage des protéines par la méthode de Lowry

La concentration protéique des lysats cellulaires est déterminée par comparaison à une gamme de concentrations comprises entre 0 et 25 µg/mL d'albumine sérique bovine en suivant la méthode décrite par Lowry (Lowry *et al*, 1951). La qualité des dosages est systématiquement contrôlée par l'utilisation d'un standard protéique de concentration connue.

V.1.3. Electrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE)

La technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) réalisée en conditions dénaturantes, en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS), permet une séparation des protéines selon leur poids moléculaire (Laemmli, 1970).

Entre 20 et 50 µg de protéines sont dénaturées dans un volume équivalent de tampon [62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 ; 2% (m/v) SDS ; 10% glycérol ; 2% β-mercaptoéthanol ; 0,02%

(m/v) bleu de bromophénol] en les chauffant 3 min à 100°C. Les échantillons protéiques, de même que des marqueurs de poids moléculaire (Euromedex), sont alors séparés par passage successif dans un gel de concentration et dans un gel de séparation constitués respectivement de 5% et de 8 à 14% d'acrylamide/bisacrylamide (Eurobio). La migration s'effectue à température ambiante, au sein du système Mini-Protean Tetra Electrophoresis System (Bio-Rad), dans du tampon de migration [25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 0,1% (m/v) SDS] placé dans un champ électrique de 150 V.

V.1.4. Immunodétection

Après migration électrophorétique, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Macherey-Nagel) par électrotransfert. Dans un premier temps, la membrane et le gel sont incubés pendant 15 min dans du tampon de transfert [12,5 mM Tris 0,1 M glycine ; 10% méthanol]. Puis, le transfert est réalisé en condition immergée dans du tampon de transfert grâce au système XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen) soumis à une tension de 25 V pendant 1 h. L'efficacité du transfert est alors vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau [0,2% (m/v) Rouge Ponceau S ; 3% (v/v) acide acétique].

La membrane est ensuite saturée pendant 1 h dans du tampon TBST 1X [20 mM Tris-HCl, pH 7,6 ; 137 mM NaCl ; 0,1% Tween-20] contenant 5% (m/v) de lait écrémé. Après trois lavages dans du TBST 1X, la membrane est incubée pendant une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire d'intérêt. Les conditions d'utilisation des différents anticorps primaires utilisés sont présentées dans le **tableau 10**. L'anticorps anti- α -tubuline est utilisé afin de vérifier l'homogénéité des dépôts protéiques. La membrane est ensuite lavée trois fois 5 min dans du TBST 1X avant d'être marquée pendant 1 h avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (HRP) : anti-IgG de lapin préparé chez la chèvre (Santa Cruz) ou anti-IgG de souris préparé chez le lapin (Merck) dilué au 1/7500.

Après trois nouveaux lavages dans le TBST 1X, la membrane est mise en présence du substrat de la HRP (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz) et la chimiluminescence générée est visualisée et quantifiée à l'aide du système Molecular Imager ChemiDoc XRS.

Tableau 10. Caractéristiques des anticorps primaires utilisés en Immunoblotting.

Anticorps	Poids moléculaire	Type d'anticorps	Dilution	Clone/Fournisseur
CDC25A	67 kDa	Polyclonal, lapin	1/200	144, Santa Cruz
		Monoclonal souris	1/200	F-6, Santa Cruz
CDC25B	65 kDa	Polyclonal, lapin	1/200	C-20, Santa Cruz
CDC25C	53/46 kDa	Polyclonal, lapin	1/200	C-20, Santa Cruz
		Monoclonal, lapin	1/500	5H9, Cell Signaling
CDK1	34 kDa	Polyclonal, lapin	1/1000	C-19, Santa Cruz
P-CDK1	34 kDa	Polyclonal, lapin	1/1000	sc-12340-R, Santa Cruz
CDK2	34 kDa	Polyclonal, lapin	1/1000	H-298, Santa Cruz
P-CDK2	34 kDa	Polyclonal, lapin	1/1000	sc-28435-R, Santa Cruz
γ -H2AX	17 kDa	Monoclonal, souris	1/2000	JBW301, Upstate/Millipore
p53	53 kDa	Polyclonal, lapin	1/200	FL-3933, Santa Cruz
p21	21 kDa	Monoclonal, souris	1/200	F-5, Santa Cruz
PARP clivée	85 kDa	Polyclonal, lapin	1/1000	214/215 Invitrogen
α -tubuline	50 kDa	Monoclonal, souris	1/5000	DM1A, Sigma

V.2. Immunofluorescence : détection des foyers γ -H2AX

Les cellules sont ensemencées sur lamelle de verre en plaque de 6 puits (surface individuelle de 9,6 cm²) à une densité de 0,2.10⁶ cellules/puits. Au bout de 24 h, les cellules ont adhéré sur les lamelles. Le milieu de culture est alors remplacé par du milieu de culture frais contenant la molécule à tester. A la fin du temps de traitement souhaité, le milieu de culture est éliminé par aspiration. Les cellules sont lavées trois fois pendant 5 min dans du PBS 1X froid avant d'être fixées pendant 15 min à température ambiante dans une solution à 4% de formaldéhyde préparée dans du PBS 1X. Après trois lavages supplémentaires, les cellules sont perméabilisées et bloquées pendant 30 min à température ambiante grâce à une solution contenant 0,1% de Triton X-100 et 3% d'albumine sérique bovine dans du PBS 1X. Les lamelles sont alors mises en contact avec l'anticorps primaire anti- γ -H2AX (**Tableau 10**) dilué au 1/500 pendant une nuit à 4°C. Les lamelles sont à nouveau lavées trois fois avec du PBS 1X, puis incubées pendant 1 h à température ambiante et à l'obscurité avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au FITC (*Fluorescein isothiocyanate*, fluorescence verte, 1/100, Argene) ou à l'AlexaFluor 594 (1/500, fluorescence rouge, Molecular Probes). Les cellules sont lavées quatre fois dans du PBS 1X. Lors de l'avant-dernier lavage, l'ADN des

cellules est marqué en présence de 50 µg/mL de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, fluorescence bleue, Sigma-Aldrich) pendant 5 min. Finalement, les lamelles sont montées sur lames histologiques dans du milieu de montage PermaFluor (Immunon) et les cellules sont visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence Nikon Eclipse 80i (Nikon).

VI. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE PAR CYTOMÉTRIE

Le contenu en ADN des cellules évolue au cours des différentes phases du cycle cellulaire. En phases G₀ et G₁, les cellules se trouvent à l'état diploïde (2n chromosomes). Lors de la phase S, le contenu en ADN va progressivement être doublé, jusqu'à atteindre le stade tétraploïde (4n chromosomes) en phases G₂ et M. Ainsi, la mesure du contenu en ADN permet de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle, notamment en présence d'un traitement. Cette mesure est réalisée par cytométrie en flux après marquage des cellules à l'iodure de propidium (IP), une molécule fluorescente capable de s'intercaler au sein des acides nucléiques (ADN, ARN). L'intensité du marquage à l'IP est alors proportionnelle à la quantité d'ADN présent dans les cellules, à condition d'éliminer le risque de faux positifs par l'ajout de RNase A.

Au terme du traitement, les cellules flottantes et adhérentes sont récupérées et lavées dans du PBS 1X froid. Elles sont ensuite fixées et perméabilisées dans 70% d'éthanol à -20°C pendant au moins 1 h. Après élimination de l'éthanol, les cellules sont reprises dans 500 µL de solution de marquage [50 µg/mL IP (Sigma-Aldrich) ; 0,1 mg/mL RNase A (Euromedex) ; 0,05% Triton X-100] et incubées à l'obscurité pendant 20 min. L'analyse est alors réalisée par passage des échantillons en cytométrie de flux (FACSCalibur, BD Bioscience) et le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle est déterminé à l'aide du logiciel ModFit LT™ (Verity Software).

VII. EVALUATION DU STRESS OXYDANT PAR CYTOMÉTRIE

La quantité relative d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) intracellulaires est évaluée par cytométrie en flux grâce à l'utilisation de la sonde H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate). Cette dernière est une molécule de petite taille, non polaire et non fluorescente qui est capable de pénétrer dans les cellules dans lesquelles elle sera déacétylée par les estérases intracellulaires. Au contact de ERO, en particulier de

peroxydes (comme le peroxyde d'hydrogène), ce composé est rapidement oxydé en DCF (2',7'-dichlorofluorescéine) qui émet une fluorescence verte (FL-1).

Les cellules sont incubées pendant 15 min à 37°C en présence de 50 µM de H₂DCFDA (Acros), puis traitées par les molécules à tester. A la fin du traitement, les cellules sont récupérées par trypsination, lavées dans du PBS 1X froid et centrifugées à 500 x g pendant 5 min à 4°C. Après resuspension du culot dans du PBS 1X, les échantillons sont analysés par cytométrie en flux (FACSCalibur).

VIII. ANALYSES STATISTIQUES

VIII.1. Étude cellulaire

Les analyses statistiques des résultats sont données pour des expériences réalisées au moins trois fois et de manière indépendante. Les résultats sont présentés comme une moyenne ± écart-type. Le **test t de Student**, un test d'hypothèse paramétrique, a été utilisé pour comparer les moyennes de deux petits échantillons indépendants. Les résultats sont jugés statistiquement différents lorsque la probabilité critique p est inférieure à 0,05 par comparaison avec le contrôle. Si l'hypothèse nulle H_0 d'égalité entre les moyennes des deux populations est vérifiée, alors la variable aléatoire t définie ci-dessous suit la loi de Student avec $(n_1 + n_2 - 2)$ degrés de liberté.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{X_1X_2} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

soient \bar{X}_1 et \bar{X}_2 les moyennes des deux populations ; n_1 et n_2 les tailles des deux populations ; et $S_{X_1X_2}$ la moyenne pondérée des variances des deux populations

L'hypothèse H_0 est testée par comparaison de la valeur calculée de t avec la valeur critique au seuil α (risque de première espèce) donnée par la table de Student avec $(n_1 + n_2 - 2)$ degrés de liberté. Si la valeur absolue de t est supérieure à cette valeur critique, alors H_0 est rejetée. Autrement dit, les moyennes des deux populations sont différentes.

VIII.2. Étude tissulaire

Grâce à des tests de normalité (test de Kolmogorov-Smirnov, test d'Agostino, test de Shapiro-Wilk), nous avons pu montrer que l'ensemble des données d'expression relative des

transcrits *CDC25* dans les tumeurs de sein ne suivaient pas une distribution gaussienne, ce qui nous a amené à l'utilisation de tests non paramétriques.

Toutes les analyses statistiques nécessaires à l'étude tissulaire ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.

VIII.2.1. Test de Mann-Whitney-Wilcoxon

Le test de Mann-Whitney-Wilcoxon est un test non paramétrique d'homogénéité permettant de comparer si deux échantillons indépendants sont issus d'une même population. Soient (X_1, X_2, \dots, X_n) et (Y_1, Y_2, \dots, Y_m) deux échantillons indépendants de distributions continues et de taille respective n et m . L'ensemble des observations mélangées des deux échantillons sont classées en ordre croissant, un rang leur est affecté et la somme de ces rangs est calculée (R_X et R_Y).

La statistique U du test (pour $n \leq m$) est définie par :
$$U = R_X - \frac{n(n-1)}{2}$$

L'hypothèse H_0 à contrôler est l'équivalence des deux échantillons étudiés. Sous l'hypothèse H_0 , la variable aléatoire U suit une loi de probabilité spécifique qui dépend des effectifs n et m . La décision est prise en comparant la valeur observée de U aux limites du domaine de refus de l'hypothèse H_0 , données par une table, en fonction de n , m et α .

Si la taille des échantillons est grande (n ou $m > 20$), la loi statistique U est approchée par une loi normale N d'espérance μ_U et de variance σ_U :

$$\mu_U = \frac{nm}{2} \quad \text{et} \quad \sigma_U = \sqrt{\frac{nm(n+m+1)}{12}}$$

Dans ce cas, le test revient à déterminer la statistique

$$Z = \frac{U - \mu_U}{\sigma_U}$$

et à la comparer avec les valeurs critiques d'une loi normale centrée réduite.

VIII.2.2. Test de Kruskal-Wallis

Le test de Kruskal-Wallis peut être perçu comme une extension du test de Mann-Whitney-Wilcoxon à plus de deux échantillons. La situation est analogue à la précédente,

mais la variable X est observée sur k groupes indépendants. Comme précédemment, la somme des rangs (R_j) des éléments de chacun des k échantillons est calculée.

La statistique H du test est définie par :

$$H = \left(\frac{12}{N(N+1)} \sum n_j R_j^2 \right) - 3(N+1) \quad \text{où } N \text{ correspond à l'effectif total } n_1 + n_2 + \dots + n_k$$

Pour des effectifs suffisamment grands, la variable H suit approximativement une loi du khi-2 à (k-1) degrés de liberté.

VIII.2.3. Coefficient de corrélation des rangs de Spearman

Le coefficient de corrélation des rangs de Spearman examine la possibilité d'une relation entre le rang des observations pour deux caractères X et Y, ce qui permet de détecter l'existence de relations monotones, quelle que soit leur forme précise (linéaire, exponentiel, puissance...).

Le coefficient de Spearman est fondé sur l'étude de la différence des rangs entre les attributs des individus pour les deux caractères X et Y :

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^N [r(X_i) - r(Y_i)]^2}{N^3 - N}$$

$r(X_i)$ et $r(Y_i)$ désignent respectivement le rang de la $i^{\text{ème}}$ observation de la variable X et de la variable Y, après classement des deux séries de valeurs dans l'ordre croissant.

Ce coefficient varie entre -1 et +1, avec 0 signifiant l'absence de corrélation. Un test statistique peut être réalisé afin de définir si r_s s'éloigne significativement de 0, ce qui signifierait l'existence d'une relation monotone entre X et Y. La décision est prise en comparant la valeur observée de r_s aux limites du domaine de refus de l'hypothèse H_0 définies par une table.

Bibliographie

A

- Aerts J.L., Gonzales M.I., Topalian S.L. (2004). Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques* **36**, 84-86.
- Alvarez-Fernández M., Halim V.A., Krenning L., Aprelia M., Mohammed S., Heck A.J., Medema R.H. (2010). Recovery from a DNA-damage-induced G2 arrest requires Cdk-dependent activation of FoxM1. *EMBO Rep.* **11**, 452-458.
- Antoniou A., Pharoah P.D., Narod S., Risch H.A., Eyfjord J.E., Hopper J.L., Loman N., Olsson H., Johannsson O., Borg A., Pasini B., Radice P., Manoukian S., Eccles D.M., Tang N., Olah E., Anton-Culver H., Warner E., Lubinski J., Gronwald J., Gorski B., Tulinius H., Thorlacius S., Eerola H., Nevanlinna H., Syrjäkoski K., Kallioniemi O.P., Thompson D., Evans C., Peto J., Lalloo F., Evans D.G., Easton D.F. (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.
- Aref S., Fouda M., El-Dosoky E., Menessy A., Mabed M., Saleeb M., Zalata K. (2003). c-Myc oncogene and Cdc25A cell activating phosphatase expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematology* **8**, 183-190.
- Aressy B., Bugler B., Valette A., Biard D., Ducommun B. (2008). Moderate variations in CDC25B protein levels modulate the response to DNA damaging agents. *Cell Cycle* **7**, 2234-2240.
- Aressy B., Ducommun B. (2008). Cell cycle control by the CDC25 phosphatases. *Anticancer Agents Med. Chem.* **8**, 818-824.
- Astuti P., Boutros R., Ducommun B., Gabrielli B. (2010). Mitotic phosphorylation of Cdc25B Ser321 disrupts 14-3-3 binding to the high affinity Ser323 site. *J. Biol. Chem.* **285**, 34364-34370.

B

- Bahassi el M., Hennigan R.F., Myer D.L., Stambrook P.J. (2004). Cdc25C phosphorylation on serine 191 by Plk3 promotes its nuclear translocation. *Oncogene* **23**, 2658-2663.
- Baldin V., Cans C., Knibiehler M., Ducommun B. (1997a). Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1-cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation. *J. Biol. Chem.* **272**, 32731-32734.
- Baldin V., Cans C., Superti-Furga G., Ducommun B. (1997b). Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? *Oncogene* **14**, 2485-2495.
- Baldin V., Pelpel K., Cazales M., Cans C., Ducommun B. (2002). Nuclear localization of CDC25B1 and serine 146 integrity are required for induction of mitosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 35176-35182.
- Baldin V., Theis-Febvre N., Benne C., Froment C., Cazales M., Burlet-Schiltz O., Ducommun B. (2003). PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation. *Biol. Cell* **95**, 547-554.
- Baranello L., Bertozzi D., Fogli M.V., Pommier Y., Capranico G. (2010). DNA topoisomerase I inhibition by camptothecin induces escape of RNA polymerase II from promoter-proximal pause site, antisense transcription and histone acetylation at the human HIF-1alpha gene locus. *Nucleic Acids Res.* **38**, 159-171.
- Bartek J., Iggo R., Gannon J., Lane D.P. (1990). Genetic and immochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* **5**, 893-899.
- Bartek J., Lukas J. (2001). Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett.* **490**, 117-122.
- Barzilai A., Yamamoto K. (2004). DNA damage responses to oxidative stress, *DNA Repair (Amst.)* **3**, 1109-1115.

- Batist G., Tulpule A., Sinha B.K., Katki A.G., Myers C.E., Cowan K.H. (1986). Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 15544-15549.
- Beadle B.M., Woodward W.A., Buchholz T.A. (2011). The impact of age on outcome in early-stage breast cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* **21**, 26-34.
- Bélot A., Grosclaude P., Bossard N., Jouglu E., Benhamou E., Delafosse P., Guizard A.V., Molinié F., Danzon A., Bara S., Bouvier A.M., Trétarre B., Binder-Foucard F., Colonna M., Daubisse L., Hédelin G., Launoy G., Le Stang N., Maynadié M., Monnereau A., Troussard X., Faivre J., Collignon A., Janoray I., Arveux P., Buemi A., Raverdy N., Schwartz C., Bovet M., Chérié-Challine L., Estève J., Remontet L., Velten M. (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* **56**, 159-175.
- Bendifallah S., Werkoff G., Borie-Moutafoff C., Antoine M., Chopier J., Gligorov J., Uzan S., Coutant C., Rouzier R. (2010). Multiple synchronous (multifocal and multicentric) breast cancer: clinical implications. *Surg. Oncol.* **19**, 115-123.
- Ben-Yosef T., Yanuka O., Halle D., Benvenisty N. (1998). Involvement of Myc targets in c-myc and N-myc induced human tumors. *Oncogene* **17**, 165-171.
- Berget S.M., Moore C., Sharp P.A. (1977). Spliced segments at 5' terminus of adenovirus 2 late messenger-RNA. *Proc. Natl. Sci. USA.* **74**, 3171-3175.
- Berrino F., De Angelis R., Sant M., Rosso S., Bielska-Lasota M., Coebergh J.W., Santaquilani M. (2007). Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO CARE-4 study. *Lancet Oncol.* **8**, 773-783.
- Biamonti G., Cáceres J.F. (2009). Cellular stress and RNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* **34** (3), 146-153.
- Blaustein M., Pelisch F., Srebrow A. (2007). Signals, pathways and splicing regulation. *Int. J. Biochem. Cell B.* **39**, 2031-2048.
- Blomberg I., Hoffmann I. (1999). Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6183-6194.
- Boldrini L., Gisfredi S., Ursino S., Lucchi M., Mussi A., Fontanini G. (2007). CDC25B: relationship with angiogenesis and prognosis in non-small cell lung carcinoma. *Hum. Pathol.* **38**, 1563-1568.
- Bonnet J., Coopman P., Morris M.C. (2008). Characterization of centrosomal localization and dynamics of Cdc25C phosphatase in mitosis. *Cell Cycle* **7**, 1991-1998.
- Bonin S., Brunetti D., Benedetti E., Gorji N., Stanta G. (2006). Expression of cyclin-dependent kinases and CDC25a phosphatase is related with recurrences and survival in women with peri- and post-menopausal breast cancer. *Virchows Arch.* **448**, 539-544.
- Borjesson P.K., Postema E.J., Roos J.C., Colnot D.R., Marres H.A., van Schie M.H., Stehle G., de Bree R., Snow G.B., Oyen W.J., van Dongen G.A. (2003). Phase I therapy study with (186)Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **9**, 3961-3972.
- Børresen-Dale A.L. (2003). TP53 and breast cancer. *Hum. Mutat.* **21**, 292-300.
- Boström P., Söderström M., Palokangas T., Vahlberg T., Collan Y., Carpen O., Hirsimäki P. (2009). Analysis of cyclins A, B1, D1 and E in breast cancer in relation to tumour grade and other prognostic factors. *BMC Res. Notes* **2**, 140.
- Boutros R., Lobjois V., Ducommun B. (2007a). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat. Rev. Cancer* **7**, 495-507.

- Boutros R., Lobjois V., Ducommun B. (2007b). CDC25B involvement in the centrosome duplication cycle and in microtubule nucleation. *Cancer Res.* **67**, 11557-11564.
- Boutros R., Lorenzo C., Mondesert O., Jauneau A., Oakes V., Dozier C., Gabrielli B., Ducommun B. (2011). CDC25B associates with a centrin 2-containing complex and is involved in maintaining centrosome integrity. *Biol. Cell* **103**, 55-68.
- Brezak M.C., Valette A., Quaranta M., Contour-Galcerà M.O., Jullien D., Lavergne O., Frongia C., Bigg D., Kasprzyk P.G., Prevost G.P., Ducommun B. (2009). IRC-083864, a novel bis quinone inhibitor of CDC25 phosphatases active against human cancer cells. *Int. J. Cancer* **124**, 1449-1456.
- Brinkman B.M.N. (2004). Splice variants as cancer biomarkers. *Clin. Biochem.* **37**, 584-594.
- Broggini M., Buraggi G., Brenna A., Riva L., Codegani A.M., Torri V., Lissoni A.A., Mangioni C., D'Incalci M. (2000). Cell cycle-related phosphatases CDC25A and B expression correlates with survival in ovarian cancer patients. *Anticancer Res.* **20**, 4835-4840.
- Brooks S.C., Locke E.R., Soule H.D. (1973). Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J. Biol. Chem.* **248**, 6251-6253.
- Bugler B., Schmitt E., Aressy B., Ducommun B. (2010). Unscheduled expression of CDC25B in S-phase leads to replicative stress and DNA damage. *Mol. Cancer* **9**.
- Bugler B., Quaranta M., Aressy B., Brezak M.C., Prevost G., Ducommun B. (2006). Genotoxic-activated G2-M checkpoint exit is dependent on CDC25B phosphatase expression. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1446-1451.
- Bulavin D.V., Higashimoto Y., Demidenko Z.N., Meek S., Graves P., Phillips C., Zhao H., Moody S.A., Appella E., Piwnica-Worms H., Fornace A.J. Jr. (2003). Dual phosphorylation controls Cdc25 phosphatases and mitotic entry. *Nat. Cell. Biol.* **5**, 545-551.
- Bulavin D.V., Higashimoto Y., Popoff I.J., Gaarde W.A., Basrur V., Potapova O., Appella E., Fornace A.J. Jr. (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* **411**, 102-107.
- Bureik M., Rief N., Drescher R., Jungbluth A., Montenarh M., Wagner P. (2000). An additional transcript of the cdc25C gene from A431 cells encodes a functional protein. *Int. J. Oncol.* **17**, 1251-1258.
- Busà R., Geremia R., Sette C. (2010). Genotoxic stress causes the accumulation of the splicing regulator Sam68 in nuclear foci of transcriptionally active chromatin. *Nucleic Acids Res.* **38**, 3005-3010.
- Busà R., Sette C. (2010). An emerging role for nuclear RNA-mediated responses to genotoxic stress. *RNA Biol.* **7**, 390-396.
- Busch C., Barton O., Morgenstern E., Götz C., Günther J., Noll A., Montenarh M. (2007). The G2/M checkpoint phosphatase cdc25C is located within centrosomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1707-1713.
- Busino L., Chiesa M., Draetta G.F., Donzelli M. (2004). Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* **23**, 2050-2056.

C

- Cáceres J.F., Kornblihtt A.R. (2002). Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* **18**, 186-193.
- Cailleau R., Young R., Olivé M., Reeves W.J.J. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer I.* **53**, 661-674.
- Campeau P.M., Foulkes W.D., Tischkowitz M.D. (2008). Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum. Genet.* **124**, 31-42.

- Cangi M.G., Cukor B., Soung P., Signoretti S., Moreira G.J., Ranashinge M., Cady B., Pagano M., Loda M. (2000). Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* **106**, 753-761.
- Cans C., Ducommun B., Baldin V. (1999). Proteasome-dependent degradation of human CDC25B phosphatase. *Mol. Biol. Rep.* **26**, 53-57.
- Caudill J.S., Porcher J.C., Steensma D.P. (2008). Aberrant pre-mRNA splicing of a highly conserved cell cycle regulator, CDC25C, in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Lymphoma* **49**, 989-993.
- Cazales M., Schmitt E., Montembault E., Dozier C., Prigent C., Ducommun B. (2005). CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle* **4**, 1233-1238.
- Chacón R.D., Costanzo M.V. (2010). Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**.
- Chandler D.S., Singh R.K., Caldwell L.C., Bitler J.L., Lozano G. (2006). Genotoxic stress induces coordinately regulated alternative splicing of the p53 modulators MDM2 and MDM4. *Cancer Res.* **66**, 9502-9508.
- Chen F.P. (2009). Postmenopausal hormone therapy and risk of breast cancer. *Chang. Gung. Med. J.* **32**, 140-147.
- Chen M.S., Hurov J., White L.S., Woodford-Thomas T., Piwnica-Worms H. (2001). Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3853-3861.
- Chen M., Manley J.L. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **10**, 741-754.
- Chen M-S., Ryan C.E., Piwnica-Worms H. (2003). Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7488-7497.
- Chen F., Zhang Z., Bower J., Lu Y., Leonard S.S., Ding M., Castranova V., Piwnica-Worms H., Shi X. (2002). Arsenite-induced Cdc25C degradation is through the KEN-box and ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 1990-1995.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Chow L.T., Roberts J.M., Lewis J.B., Brocker T.R. (1977). A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2, determined by electron microscopy of RNA:DNA hybrids. *Cell* **11**, 819-836.
- Contour-Galcerà M.O., Sidhu A., Prévost G., Bigg D., Ducommun B. (2007). What's new on CDC25 phosphatase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **115**, 1-12.
- Corcos L., Solier S. (2005). Épissage alternatif, pathologie et thérapeutique moléculaire. *Médecine/Sciences* **21**, 253-260.
- Corpet F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10881-10890.
- Cowan K.H., Batist G., Tulpule A., Sinha B.K., Myers C.E. (1986). Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 9328-9332.

D

- Dalal S.N., Schweitzer C.M., Gan J., DeCaprio J.A. (1999). Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4465-4479.
- Dalvai M., Mondesert O., Bourdon J-C., Ducommun B., Dozier C. (2011). Cdc25B is negatively regulated by p53 through Sp1 and NF-Y transcription factors. *Oncogene* **30**, 2282-2288.

- Davezac N., Baldin V., Blot J., Ducommun B., Tassan J.P. (2002). Human pEg3 kinase associates with and phosphorylates CDC25B phosphatase: a potential role for pEg3 in cell cycle regulation. *Oncogene* **21**, 7630-7641.
- Davezac N., Baldin V., Gabrielli B., Forrest A., Theis-Febvre N., Yashida M., Ducommun B. (2000). Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization. *Oncogene* **19**, 2179-2185.
- David C.J., Manley J.L. (2010). Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev.* **24**, 2343-2364.
- De Cremoux P. (2010). Marqueurs pronostiques et prédictifs de réponse aux traitements des cancers du sein. *Bull. Cancer* **97**, 1297-1304.
- De la Grange P., Dutertre M., Martin N., Auboeuf D. (2005). FAST DB: a website resource for the study of the expression regulation of human gene products. *Nucleic Acids Res.* **33**, 4276-4284.
- Demidova A.R., Aau M.Y., Zhuang L., Yu Q. (2009). Dual regulation of Cdc25A by Chk1 and p53-ATF3 in DNA replication checkpoint control. *J. Biol. Chem.* **284**, 4132-4139.
- De Souza C.P., Ellem K.A., Gabrielli B.G. (2000). Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events. *Exp. Cell. Res.* **257**, 11-21.
- D'Hondt V., Piccart M., Sotiriou C. (2008). Has the time arrived for gene expression use at the bedside? *Bull Cancer* **95**, 336-343.
- Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon J.P., Giudice L.C., Hauser R., Prins G.S., Soto A.M., Zoeller R.T., Gore A.C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* **30**, 293-342.
- Dinh P., Sotiriou C., Piccart M.J. (2007). The evolution of treatment strategies: aiming at the target. *Breast* **16**, 10-16.
- Donzelli M., Squatrito M., Ganoth D., Hershko A., Pagano M., Draetta G.F. (2002). Dual mode of degradation of Cdc25A phosphatase. *EMBO J.* **21**, 4875-4884.
- Driessens N., Versteyshe S., Ghadhab C., Burniat A., De Deken X., Van Sande J., Dumont J.E., Miot F., Corvilain B. (2009). Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocr. Relat. Cancer* **16**, 845-856.
- Dutertre M., Sanchez G., De Cian M.C., Barbier J., Dardenne E., Gratadou L., Dujardin G., Le Jossic-Corcoc C., Corcos L., Auboeuf D. (2010a). Cotranscriptional exon skipping in the genotoxic stress response. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1358-1366.
- Dutertre M., Vagner S., Auboeuf D. (2010b). Alternative splicing and breast cancer. *RNA Biol.* **7**, 403-411.
- Dutertre S., Cazales M., Quaranta M., Froment C., Trabut V., Dozier C., Mirey G., Bouché J.P., Theis-Febvre N., Schmitt E., Monsarrat B., Prigent C., Ducommun B. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J. Cell Sci.* **117**, 2523-2531.

E

- Elston C.W., Ellis I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19**, 403-410.
- Esmenjaud-Mailhat C., Lobjois V., Froment C., Golsteyn R.M., Monsarrat B., Ducommun B. (2007). Phosphorylation of CDC25C at S263 controls its intracellular localisation. *FEBS Lett.* **581**, 3979-3985.

Ewertz M., Duffy S.W., Adami H.O., Kvåle G., Lund E., Meirik O., Mellempgaard A., Soini I., Tulinius H. (1990). Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int. J. Cancer* **46**, 597-603.

Eymin B., Claverie P., Salon C., Brambilla C., Brambilla E., Gazzeri S. (2006). p14ARF triggers G2 arrest through ERK-mediated Cdc25C phosphorylation, ubiquitination and proteasomal degradation. *Cell Cycle* **5**, 759-765.

F

Fantes P. (1979). Epistatic gene interactions in the control of division in fission yeast. *Nature* **279**, 428-430.

Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* **127**, 2893-2917.

Ferguson A.M., White L.S., Donovan P.J., Piwnicka-Worms H. (2005). Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 2853-2860.

Filippov V., Filippova M., Duerksen-Hughes P.J. (2007). The early response to DNA damage can lead to activation of alternative splicing activity resulting in CD44 splice pattern changes. *Cancer Res.* **67**, 7621-7630.

Filippov V., Schmidt E.L., Filippova M., Duerksen-Hughes P.J. (2008). Splicing and splice factor SRp55 participate in the response to DNA damage by changing isoform ratios of target genes. *Gene* **420**, 34-41.

Fraczek M., Wozniak Z., Ramsey D., Krecicki T. (2007). Expression patterns of cyclin E, cyclin A and CDC25 phosphatases in laryngeal carcinogenesis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **264**, 923-928.

Franckhauser C., Mamaeva D., Heron-Milhavet L., Fernandez A., Lamb N.J. (2010). Distinct pools of cdc25C are phosphorylated on specific TP sites and differentially localized in human mitotic cells. *PLoS One* **5**, 11798.

Forrest A.R.R., McCormack A.K., DeSouza C.P.C., Sinnamon J.M., Tonks I.D., Hayward N.K., Ellem K.A.O., Gabrielli B.G. (1999). Multiple splicing variants of cdc25B regulate G2/M progression. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **260**, 510-515.

Foster J.S., Henley D.C., Bukovsky A., Seth P., Wimalasena J. (2001). Multifaceted regulation of cell cycle progression by estrogen: regulation of Cdk inhibitors and Cdc25A independent of cyclin D1-Cdk4 function. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 794-810.

G

Gabrielli B.G., Clark J.M., McCormack A.K., Ellem K.A. (1997). Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2. *J. Biol. Chem.* **272**, 28607-28614.

Gabrielli B.G., De Souza C.P.C., Tonks I.D., Clark J.M., Hayward N.K., Ellem K.A.O. (1996). Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J. Cell Sci.* **109**, 1081-1093.

Galaktionov K., Beach D. (1991). Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* **67**, 1181-1194.

Galaktionov K., Chen X., Beach D. (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* **382**, 511-517.

Galaktionov K., Lee A.K., Eckstein J., Draetta G., Meckler J., Loda M, Beach D. (1995). Cdc25 phosphatases as potential human oncogenes. *Science* **269**, 1575-1577.

- Gardner L.B. (2010). Nonsense mediated RNA decay regulation by cellular stress: implications for tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* **8**, 295–308.
- Garner-Hamrick P.A., Fisher C. (1998). Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate cdc25B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects. *Int. J. Cancer* **76**,720-728.
- Guarneri V., Conte P.F. (2004). The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **31**, 149-161.
- Gasparotto D., Maestro R., Piccinin S., Vukosavljevic T., Barzan L., Sulfaro S., Boiocchi M. (1997). Overexpression of CDC25A and CDC25B in Head and Neck Cancers. *Cancer Res.* **57**, 2366-2368.
- Geyer C.E., Forster J., Lindquist D., Chan S., Romieu C.G., Pienkowski T., Jagiello-Gruszfeld A., Crown J., Chan A., Kaufman B., Skarlos D., Campone M., Davidson N., Berger M., Oliva C., Rubin S.D., Stein S., Cameron D. (2006). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2733-2743.
- Ghigna C., Valacca C., Biamonti G. (2008). Alternative splicing and tumor progression. *Current Genomics* **9**, 556-570.
- Giles N., Forrest A., Gabrielli B. (2003). 14-3-3 acts as an intramolecular bridge to regulate cdc25B localization and activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 28580-28587.
- Girard F., Strausfeld U., Cavadore J.C., Russell P., Fernandez A., Lamb N.J. (1992). cdc25 is a nuclear protein expressed constitutively throughout the cell cycle in nontransformed mammalian cells. *J. Cell Biol.* **118**, 785-794.
- Glinsky G.V., Berezovska O., Glinskii A.B. (2005). Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J. Clin. Invest.* **115**, 1503-1521.
- Goldhirsh A., Ingle J.N., Gelber R.D., Coates A.S., Thurlimann B., Senn H-J. (2009). Thresholds for therapies: highlights of the St. Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann. Oncol.* **20**,1319-1329.
- Goss V.L., Cross J.V., Ma K., Qian Y., Mola P.W., Templeton D.J. (2003). SAPK/JNK regulates cdc2/cyclin B kinase through phosphorylation and inhibition of cdc25c. *Cell Signal.* **15**, 709-718.
- Graves P.R., Lovly C.M., Uy G.L., Piwnica-Worms H. (2001). Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *Oncogene* **20**, 1839-1851.
- Gruver A.M., Portier B.P., Tubbs R.R. (2011). Molecular pathology of breast cancer: the journey from traditional practice toward embracing the complexity of a molecular classification. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **135**, 544-557.
- Guo J., Kleeff J., Li J., Ding J., Hammer J., Zhao Y., Giese T., Korc M., Büchler M.W., Friess H. (2004). Expression and functional significance of CDC25B in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* **23**, 71-81.
- Gur-Dedeoglu B., Konu O., Bozkurt B., Ergul G., Seckin S., Yulug I.G. (2009). Identification of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in normal matched breast tumor tissues. *Oncol. Res.* **17**, 353-365.
- Gutierrez G.J., Tsuji T., Cross J.V., Davis R.J., Templeton D.J., Jiang W., Ronai Z.A. (2010). JNK-mediated phosphorylation of Cdc25C regulates cell cycle entry and G(2)/M DNA damage checkpoint. *J. Biol. Chem.* **285**, 14217-14228.

H

- Hanahan D., Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.

- Hasinoff B.B., Wu X., Krokhn O.V., Ens W., Standing K.G., Nitiss J.L., Sivaram T., Giorgianni A., Yang S., Jiang Y., Yalowich J.C. (2005). Biochemical and proteomics approaches to characterize topoisomerase IIalpha cysteines and DNA as targets responsible for cisplatin-induced inhibition of topoisomerase IIalpha. *Mol. Pharmacol.* **67**, 937-947.
- Hernández S., Bessa X., Beà S., Hernández L., Nadal A., Mallofré C., Muntane J., Castells A., Fernández P.L., Cardesa A., Campo E. (2001). Differential expression of cdc25 cell-cycle activating phosphatases in human colorectal carcinoma. *Lab. Invest.* **81**, 465-473.
- Hernández S., Hernández L., Beà S., Cazorla M., Fernández P.L., Nadal A., Muntané J., Mallofré C., Montserrat E., Cardesa A., Campo E. (1998). Cdc25 cell cycle-activating phosphatases and c-myc expression in human non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Res.* **58**, 1762-1767.
- Hernández S., Hernández L., Beà S., Pinyol M., Nayach I., Bellosillo B., Nadal A., Ferrer A., Fernández P.L., Montserrat E., Cardesa A., Campo E. (2000). Cdc25A and the splicing variant cdc25B2, but not cdc25B1, -B3 or -C, are over-expressed in aggressive human non-Hodgkin's lymphomas. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* **89**, 148-152.
- Herschkowitz J., Simin K., Weigman V., Mikaelian I., Usary J., Hu Z., Rasmussen K., Jones L., Assefnia S., Chandrasekharan S., Backlund M., Yin Y., Khramtsov A., Bastein R., Quackenbush J., Glazer R., Brown P., Green J., Kopelovich L., Furth P., Palazzo J., Olopade O., Bernard P., Churchill, G., Van Dyke, T., Perou, C. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* **8**, 76.
- Hochegger H., Takeda S., Hunt T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 910-916.
- Hoffmann I., Draetta G., Karsenti E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J.* **13**, 4302-4310.
- Honaker Y., Piwnica-Worms H. (2010). Casein kinase 1 functions as both penultimate and ultimate kinase in regulating Cdc25A destruction. *Oncogene* **29**, 3324-3334.
- Ho-Pun-Cheung A., Cellier D., Lopez-Crapez E. (2008). Considerations for normalisation of RT-qPCR in oncology. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **66**, 121-129.
- Hu Y.C., Lam K.Y., Law S., Wong J., Srivastava G. (2001). Identification of differentially expressed genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by cDNA expression array: overexpression of Fra-1, Neogenin, Id-1, and CDC25B genes in ESCC. *Clin. Cancer Res.* **7**, 2213-2221.
- Hui J.Y. (2009). Regulation of mammalian pre-mRNA splicing. *Sci. China Ser. C-Life Sci.* **52**, 253-260.
- Hurley P.J., Bunz F. (2007). ATM and ATR components of an integrated circuit. *Cell Cycle* **6**, 414-417.
- Hutchins J.R.A., Dikovskaya D., Clarke P.R. (2003). Regulation of Cdc2/Cyclin B activation in *Xenopus* egg extracts via inhibitory phosphorylation of Cdc25C phosphatase by Ca²⁺/calmodium-dependent kinase II. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4003-4014.

I

- Ito Y., Yoshida H., Nakano K., Kobayashi K., Yokozawa T., Hirai K., Matsuzuka F., Matsuura N., Kakudo K., Kuma K., Miyauchi A. (2002). Expression of cdc25A and cdc25B proteins in thyroid neoplasms. *Br. J. Cancer* **86**, 1909-1913.
- Ito Y., Yoshida H., Tomoda C., Uruno T., Takamura Y., Miya A., Kobayashi K., Matsuzuka F., Kuma K., Nakamura Y., Kakudo K., Miyauchi A. (2005). Expression of cdc25B and cdc25A in medullary thyroid carcinoma: cdc25B expression level predicts a poor prognosis. *Cancer Lett.* **229**, 291-297.

Ito Y., Yoshida H., Uruno T., Takamura Y., Miya A., Kuma K., Miyauchi A. (2004). Expression of cdc25A and cdc25B phosphatase in breast carcinoma. *Breast Cancer* **11**, 295-300.

Izumi T., Maller J.L. (1993). Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol. Biol. Cell* **4**, 1337-1350.

J

Jackson S.P., Bartek J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071-1078.

Jinno S., Suto K., Nagata A., Igarashi M., Kanaoka Y., Nojima H., Okayama H. (1994). CDC25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J.* **13**, 1549-1556.

Jordan V.C., Dowse L.J. (1976). Tamoxifen as an anti-tumor agent: effect on oestrogen binding. *J. Endocrinol.* **68**, 297-303.

Jullien D., Bugler B., Dozier C., Cazales M., Ducommun B. (2011). Identification of N-terminally truncated stable nuclear isoforms of CDC25B that are specifically involved in G2/M checkpoint recovery. *Cancer Res.* **71**, 1968-1977.

K

Kaklamani V.G., Gradishar W.J. (2005). Adjuvant therapy of breast cancer. *Cancer Invest.* **23**, 548-560.

Källström H., Lindqvist A., Pospisil V., Lundgren A., Rosenthal C.K. (2005). Cdc25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import. *Exp. Cell. Res.* **303**, 89-100.

Kanemori Y., Uto K., Sagata N. (2005). Beta-TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 6279-6284.

Kang T., Wei Y., Honaker Y., Yamaguchi H., Appella E., Hung M.C., Piwnica-Worms H. (2008). GSK-3 beta targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3 beta inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. *Cancer Cell* **13**, 36-47.

Kao J., Salari K., Bocanegra M., Choi Y.L., Girard L., Gandhi J., Kwei K.A., Hernandez-Boussard T., Wang P., Gazdar A.F., Minna J.D., Pollack J.R. (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One* **4**, 6146.

Karlsson-Rosenthal C., Millar J.B.A. (2006). Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol.* **16**, 285-292.

Key J., Hodgson S., Omar R.Z., Jensen T.K., Thompson S.G., Boobis A.R., Davies D.S., Elliott P. (2006). Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues. *Cancer Causes Control* **17**, 759-770.

Key T.J., Verkasalo P.K., Banks E. (2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* **2**, 133-140.

Kieffer I., Lorenzo C., Dozier C., Schmitt E., Ducommun B. (2007). Differential mitotic degradation of the CDC25B phosphatase variants. *Oncogene* **26**, 7847-7858.

Komarov P.G., Komarova E.A., Kondratov R.V., Christov-Tselkov K., Coon J.S., Chernov M.V., Gudkov A.V. (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* **285**, 1733-1737.

Königsberg R., Rögelsperger O., Jäger W., Thalhammer T., Klimpfner M., De Santis M., Hudec M., Dittrich C. (2008). Cell cycle dysregulation influences survival in high risk breast cancer patients. *Cancer Invest* **26**, 734-740.

Kristjánisdóttir K., Rudolph J. (2004). Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem. Biol.* **11**, 1043-1051.

Kudo Y., Yasui W., Ue T., Yamamoto S., Yokozaki H., Nikai H., Tahara E. (1997). Overexpression of cyclin-dependent kinase-activating CDC25B phosphatase in human gastric carcinomas. *Jpn J. Cancer Res.* **88**, 947-952.

L

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lammer C., Wagerer S., Saffrich R., Mertens D., Ansorge W., Hoffmann I. (1998). The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J. Cell Sci.* **111**, 2445-2453.

Lavecchia A., Di Giovanni C., Novellino E. (2010). Inhibitors of Cdc25 phosphatases as anticancer agents: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **20**, 405-425.

Lemaire M., Ducommun B., Nebreda A.R. (2010). UV-induced downregulation of the CDC25B protein in human cells. *FEBS Lett.* **584**, 1199-1204.

Lemaire M., Froment C., Boutros R., Mondesert O., Nebreda A.R., Monsarrat B., Ducommun B. (2006). CDC25B phosphorylation by p38 and MK-2. *Cell Cycle* **5**, 1649-1653.

Lemaire M., Montdesert O., Bugler B., Ducommun B. (2004). Ability of human CDC25B phosphatase splice variants to replace the function of the fission yeast Cdc25 cell cycle regulator. *FEMS Yeast Res.* **5**, 205-211.

Lents N.H., Wheeler L.W., Baldassare J.J., Dynlacht B.D. (2008). Identification and characterization of a novel Mdm2 splice variant acutely induced by the chemotherapeutic agents adriamycin and actinomycin D. *Cell Cycle* **7**, 1580-1586.

Li Y., Pan J., Li J.L., Lee J.H., Tunkey C., Saraf K., Garbe J.C., Whitley M.Z., Jelinsky S.A., Stampfer M.R., Haney S.A. (2007). Transcriptional changes associated with breast cancer occur as normal human mammary epithelial cells overcome senescence barriers and become immortalized. *Mol. Cancer* **6**, 7.

Lianidou E.S., Markou A. (2011). Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Detection Systems, Molecular Characterization, and Future Challenges. *Clin. Chem. clinchem.*2011.165068v1.

Lincoln A.J., Wickramasinghe D., Stein P., Schultz R.M., Palko M.E., De Miguel M.P., Tessarollo L., Donovan P.J. (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat. Genet.* **30**, 446-449.

Lindqvist A., Källström H., Karlsson Rosenthal C. (2004). Characterisation of Cdc25B localisation and nuclear export during the cell cycle and in response to stress. *J. Cell Sci.* **117**, 4979-4990.

Lindqvist A., Källström H., Lundgren A., Barsoum E., Rosenthal C.K. (2005). Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J. Cell Biol.* **171**, 35-45.

Lipworth L., Bailey L.R., Trichopoulos D. (2000). History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 302-312.

Löffler H., Syljuåsen R.G., Bartkova J., Worm J., Lukas J., Bartek J. (2003). Distinct modes of deregulation of the proto-oncogenic Cdc25A phosphatase in human breast cancer cell lines. *Oncogene* **22**, 8063-8071.

- López-Bigas N., Audit B., Ouzounis C., Parra G., Guigó R. (2005). Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett.* **579**, 1900-1903.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Luco R.F., Allo M., Schor I.E., Kornblihtt A.R., Misteli T. (2011). Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* **144**, 16-26.
- Lukas J., Gao D.Q., Keshmeshian M., Wen W.H., Tsao-Wei D., Rosenberg S., Press M.F. (2001). Alternative and aberrant messenger RNA splicing of the mdm2 oncogene in invasive breast cancer. *Cancer Res.* **61**, 3212-3219.
- Lukas J., Lukas C., Bartek J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* **3**, 997-1007.
- Lynch B.M., Neilson H.K., Friedenreich C.M. (2011). Physical activity and breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res.* **186**, 13-42.
- Lyng M.B., Laenkholm A.V., Pallisgaard N., Ditzel H.J. (2008). Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer* **22**, 8-20.

M

- Ma Z.Q., Chua S.S., DeMayo F.J., Tsai S.Y. (1999). Induction of mammary gland hyperplasia in transgenic mice over-expressing human cdc25B. *Oncogene* **18**, 4564-4576.
- Mah L-J., El-Osta A., Karagiannis T.C. (2010). γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* **24**, 679-686.
- Mailand N., Falck J., Lukas C., Syljuåsen R.G., Welcker M., Bartek J., Lukas J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288**, 1425-1429.
- Mailand N., Podtelejnikov A.V., Groth A., Mann M., Bartek J., Lukas J. (2002). Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J.* **21**, 5911-5920.
- Malina J., Vrana O., Brabec V. (2009). Mechanistic studies of the modulation of cleavage activity of topoisomerase I by DNA adducts of mono- and bi-functional PtII complexes. *Nucleic Acids Res.* **37**, 5432-5442.
- Malumbres M., Barbacid M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 153-166.
- Malumbres M., Carnero A. (2003). Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog. Cell Cycle Res.* **5**, 5-18.
- Manni I., Mazzaro G., Gurtner A., Mantovani R., Haugwitz U., Krause K., Engeland K., Sacchi A., Soddu S., Piaggio J. (2001). NF-Y mediates the transcriptional inhibition of the cyclin B1, cyclin B2, and cdc25C promoters upon induced G2 arrest. *J. Biol. Chem.* **276**, 5570-5576.
- Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A., McDonald III E.R., Hurov K.E., Luo J., Bakalarski C.E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S.P., Elledge S.J. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**, 1160-1166.
- Mavaddat N., Antoniou A.C., Easton D.F., Garcia-Closas M. (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol. Oncol.* **4**, 174-191.
- Mazoyer S., Puget N., Perrin-Vidoz L., Lynch H.T., Serova-Sinilnikova O.M., Lenoir G.M. (1998). A BRCA1 nonsense mutation causes exon skipping. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 713-715.

- Medema R.H., Macurek L. (2011). Checkpoint recovery in cells: how a molecular understanding can help in the fight against cancer. *FI000 Biol. Rep.* **3**,10.
- Mehdipour P., Pirouzpanah S., Sarafnejad A., Atri M., Shahrestani S.T., Haidari M. (2009). Prognostic implication of CDC25A and cyclin E expression on primary breast cancer patients. *Cell. Biol. Int.* **33**, 1050-1056.
- Meijer L. (2006). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Bull. Cancer hors-serie*, 41-53.
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P., Moll U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* **11**, 577-590.
- Millar J.B.A., Blevitt J., Gerace L., Sadhu K., Featherstone C., Russell P. (1991). p55CDC25 is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10500-10504.
- Millar E.K., Dean J.L., McNeil C.M., O'Toole S.A., Henshall S.M., Tran T., Lin J., Quong A., Comstock C.E., Witkiewicz A., Musgrove E.A., Rui H., Lemarchand L., Setiawan V.W., Haiman C.A., Knudsen K.E., Sutherland R.L., Knudsen E.S. (2009). Cyclin D1b protein expression in breast cancer is independent of cyclin D1a and associated with poor disease outcome. *Oncogene* **28**, 1812-1820.
- Miller L.D., Smeds J., George J., Vega V.B., Vergara L., Ploner A., Pawitan Y., Hall P., Klaar S., Liu E.T., Bergh J. (2005). An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 13550-13555.
- Miller K., Wang M., Gralow J., Dickler M., Cobleigh M., Perez E.A., Shenkier T., Cella D., Davidson N.E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2666-2676.
- Mils M., Baldin V., Goubin F., Pinta I., Papin C., Waye M., Eychene A., Ducommun B. (2000). Specific interaction between 14-3-3 isoforms and the human CDC25B phosphatase. *Oncogene* **19**, 1257-1265.
- Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **56**, 185-229.
- Mirey G., Chartrain I., Froment C., Quaranta M., Bouché J.P., Monsarrat B., Tassan J.P., Ducommun B. (2005). CDC25B phosphorylated by pEg3 localizes to the centrosome and the spindle poles at mitosis. *Cell Cycle* **4**, 806-811.
- Miyata H., Doki Y., Shiozaki H., Inoue M., Yano M., Fujiwara Y., Yamamoto H., Nishioka K., Kishi K., Monden M. (2000). CDC25B and p53 are independently implicated in radiation sensitivity for human esophageal cancers. *Clin. Cancer Res.* **6**, 4859-4865.
- Moreira Júnior G., Colleoni G.W., Cangi M.G., Murphy M., Sherburne B., Bordin J.O., Loda M. (2003). Reciprocal Cdc25A and p27 expression in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Diagn. Mol. Pathol.* **12**, 128-132.
- Moriya T., Kanomata N., Kozuka Y., Hirakawa H., Kimijima I., Kimura M., Watanabe M., Sasano H., Ishida T., Ohuchi N., Kurebayashi J., Sonoo H. (2010). Molecular morphological approach to the pathological study of development and advancement of human breast cancer. *Med. Mol. Morphol.* **43**, 67-73.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Mullan P.B., Millikan R.C. (2007). Molecular subtyping of breast cancer: opportunities for new therapeutic approaches. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 3219-3232.
- Muñoz M.J., Pérez S.M.S., Paronetto M.P., de la Mata M., Pelisch F., Boireau S., Glover-Cutter K., Ben-Dov C., Blaustein M., Lozano J.J., Bird G., Bentley D., Bertrand E., Kornblihtt A.R. (2009). DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. *Cell* **137**, 708-720.

N

- Nagata A., Igarashi M., Jinno S., Suto K., Okayama H. (1991). An additional homolog of the fission yeast *cdc25+* gene occurs in humans and is highly expressed in some cancer cells. *New Biol.* **3**, 959-968.
- Nakabayashi H., Hara M., Shimizu K. (2006). Prognostic significance of CDC25B expression in gliomas. *J. Clin. Pathol.* **59**, 725-728.
- Nakamura T., Hayashi K., Ota M., Ide H., Takasaki K., Mitsuhashi M. (2004). Expression of p21Waf1/Cip1 predicts response and survival of esophageal cancer patients treated by chemoradiotherapy. *Dis. Esophagus* **17**, 315-321.
- Ngan E.S., Hashimoto Y., Ma Z.Q., Tsai M.J., Tsai S.Y. (2003). Overexpression of Cdc25B, an androgen receptor coactivator, in prostate cancer. *Oncogene* **22**, 734-739.
- Nikolényi A., Sükösd F., Kaizer L., Csörgő E., Vörös A., Uhercsák G., Ormándi K., Lázár G., Thurzó L., Brodowicz T., Kahán Z. (2011). Tumor topoisomerase II alpha status and response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Oncology* **80**, 269-277.
- Nishioka K., Doki Y., Shiozaki H., Yamamoto H., Tamura S., Yasuda T., Fujiwara Y., Yano M., Miyata H., Kishi K., Nakagawa H., Shamma A., Monden M. (2001). Clinical significance of CDC25A and CDC25B expression in squamous cell carcinomas of the oesophagus. *Br. J. Cancer* **85**, 412-421.
- Noll A., Ruppenthal S.L., Montenarh M. (2006). The mitotic phosphatase *cdc25C* at the Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 825-830.

O

- Oliveira P.A., Colaço A., Chaves R., Guedes-Pinto H., De-La-Cruz P. L.F., Lopes C. (2007). Chemical carcinogenesis. *An. Acad. Bras. Cienc.* **79**, 593-616.
- Ozen M., Ittmann M. (2005). Increased expression and activity of CDC25C phosphatase and an alternatively spliced variant in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 4701-4706.

P

- Paik S., Shak S., Tang G., Kim C., Baker J., Cronin M., Baehner F.L., Walker M.G., Watson D., Park T., Hiller W., Fisher E.R., Wickerham D.L., Bryant J., Wolmark N. (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2817-2826.
- Pajares M.J., Ezponda T., Catena R., Calvo A., Pio R., Montuenga L.M. (2007). Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol.* **8**, 349-357.
- Pan Q., Shai O., Lee L.J., Frey B.J., Blencowe B.J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* **40**, 1413-1415.
- Patel R., Holt M., Philipova R., Moss S., Schulmani H., Hidaka H., Whitaker M. (1999). Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation and activation of human Cdc25-C at the G2/M phase transition in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 7958-7968.
- Peng C.Y., Graves P.R., Ogg S., Thoma R.S., Byrnes M.J. 3rd, Wu Z., Stephenson M.T., Piwnica-Worms H. (1998). C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ.* **9**, 197-208.
- Peng C.Y., Graves P.R., Thoma R.S., Wu Z., Shaw A.S., Piwnica-Worms H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* **277**, 1501-1505.

Pereg Y., Liu B.Y., O'Rourke K.M., Sagolla M., Dey A., Komuves L., French D.M., Dixit V.M. (2010). Ubiquitin hydrolase Dub3 promotes oncogenic transformation by stabilizing Cdc25A. *Nat. Cell Biol.* **12**, 400-406.

Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L., Brown P.O., Botstein D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752.

Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* **17**, 421-433.

Potemski P., Kusinska R., Watala C., Pluciennik E., Bednarek A.K., Kordek R. (2006). Cyclin E expression in breast cancer correlates with negative steroid receptor status, HER2 expression, tumor grade and proliferation. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **25**, 59-64.

Prat A., Perou C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* **5**, 5-23.

R

Raica M., Jung I., Cîmpean A.M., Suciuc C., Mureşan A.M. (2009). From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change? *Rom. J. Morphol. Embryol.* **50**, 5-13.

Ray D., Terao Y., Fuhrken P.G., Ma Z-Q., DeMayo F.J., Christov K., Heerema N.A., Franks R., Tsai S.Y., Papoutsakis E.T., Kiyokawa H. (2007a). Deregulated CDC25A expression promotes mammary tumorigenesis with genomic instability. *Cancer Res.* **67**, 984-991.

Ray D., Terao Y., Nimbalkar D., Hirai H., Osmundson E.C., Zou X., Franks R., Christov K., Kiyokawa H. (2007b). Hemizygous disruption of Cdc25A inhibits cellular transformation and mammary tumorigenesis in mice. *Cancer Res.* **67**, 6605-6611.

Renehan A.G., Soerjomataram I., Leitzmann M.F. (2010). Interpreting the epidemiological evidence linking obesity and cancer: A framework for population-attributable risk estimations in Europe. *Eur. J. Cancer* **46**, 2581-2592.

Revil T., Shkreta L., Chabot B. (2006). Épissage alternatif des ARN pré-messagers dans le cancer : impact fonctionnel, mécanismes moléculaires et espoirs thérapeutiques. *Bull. Cancer* **93**, 909-919

Rochefort H., Rouesse J. (2008). How to reduce the incidence of breast cancer. *Bull. Acad. Natl. Med.* **192**, 161-179.

Rugo H.S. (2008). The breast cancer continuum in hormone-receptor-positive breast cancer in postmenopausal women: evolving management options focusing on aromatase inhibitors. *Ann. Oncol.* **19**, 16-27.

Russell P., Nurse P. (1986). cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**, 145-153.

S

Sadhu K., Reed S.I., Richardson H., Russell P. (1990). Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 5139-5143.

Sarkaria J.N., Busby E.C., Tibbetts R.S., Roos P., Taya Y., Karnitz L.M., Abraham R.T., (1999). Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res.* **59**, 4375-4382.

- Sasaki H., Yukiue H., Kobayashi Y., Tanahashi M., Moriyama S., Nakashima Y., Fukai I., Kiriya M., Yamakawa Y., Fujii Y. (2001). Expression of the *cdc25B* gene as a prognosis marker in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* **173**, 187-192.
- Sato Y., Sasaki H., Kondo S., Fukai I., Kiriya M., Yamakawa Y., Fujii Y. (2001). Expression of the *cdc25B* mRNA correlated with that of *N-myc* in neuroblastoma. *Jpn J. Clin. Oncol.* **31**, 428-431.
- Schmitt E., Boutros R., Froment C., Monsarrat B., Ducommun B., Dozier C. (2006). CHK1 phosphorylates CDC25B during the cell cycle in the absence of DNA damage. *J. Cell Sci.* **119**, 4269-4275.
- Schmittgen T.D., Livak K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101-1108.
- Schwartz G.K., Shah M.A. (2005). Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* **23**, 9408-9421.
- Schwindling S.L., Noll A., Montenarh M., Götz C. (2004). Mutation of a CK2 phosphorylation site in *cdc25C* impairs importin alpha/beta binding and results in cytoplasmic retention. *Oncogene* **23**, 4155-4165.
- Shamliyan T., Wang S.Y., Virnig B.A., Tuttle T.M., Kane R.L. (2010). Association between patient and tumor characteristics with clinical outcomes in women with ductal carcinoma in situ. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **2010**, 121-129.
- Shkreta L., Michelle L., Toutant J., Tremblay M.L., Chabot B. (2010). The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J. Biol. Chem.* **286**, 331-340.
- Shou J-Z., Hu N., Takikita M., Roth M.J., Johnson L.L., Giffen C., Wang Q-H., Wang C., Wang Y., Su H., Kong L-H., Emmert-Buck M.R., Goldstein A.M., Hewitt S.M., Taylor P.R. (2008). Over-expression of *CDC25B* and *LAMC2* mRNA and protein in esophageal squamous cell carcinomas and pre-malignant lesions in subjects from a high-risk population in China. *Cancer Epid. Biom. Prev.* **17**, 1424-1435.
- Shreeram S., Hee W.K., Bulavin D.V. (2008). Cdc25A serine 123 phosphorylation couples centrosome duplication with DNA replication and regulates tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 7442-7450.
- Skotheim R.I., Nees M. (2007). Alternative splicing in cancer: noise, functional, or systematic? *Int. J. Biochem Cell Biol.* **39**, 1432-1449.
- Smits V.A.J., Medema R.H. (2001). Checking out the G₂/M transition. *Biochim. Biophys. Acta* **1519**, 1-12.
- Sobin L.H., Gospodarowicz M.A., Wittekind C. (2009). TNM classification of malignant tumors. 7th edition Heidelberg, Springer.
- Soerjomataram I., Louwman M.W., Ribot J.G., Roukema J.A., Coebergh J.W. (2008). An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **107**, 309-330.
- Solier S., Lansiaux A., Logette E., Wu J., Soret J., Tazi J., Bailly C., Desoche L., Solary E., Corcos L. (2004). Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells. *Mol. Cancer Res.* **2**, 53-61.
- Sørli T., Perou C.M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Thorsen T., Quist H., Matese J.C., Brown P.O., Botstein D., Eystein Lønning P., Børresen-Dale A.L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 10869-10874.
- Sotiriou C., Wirapati P., Loi S., Harris A., Fox S., Smeds J., Nordgren H., Farmer P., Praz V., Haibe-Kains B., Desmedt C., Larsimont D., Cardoso F., Peterse H., Nuyten D., Buyse M., Van de Vijver M.J., Bergh J., Piccart M., Delorenzi M. (2006). Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 262-272.

Soule H.D., Vasquez J., Long A., Albert S., Brennan M.A. (1973). Human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer I.* **51**, 1409-1416.

Soussi T., Lozano G. (2005). p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **331**, 834-842.

Srebrow A., Kornbliht A.R. (2006). The connection between splicing and cancer. *J. Cell Sci.* **119**, 2635-2641.

St. Clair S., Giono L., Varmeh-Ziaie S., Resnick-Silverman L., Liu W., Padi A., Dastidar J., DaCosta A., Mattia M., Manfredi J.J. (2004). DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Mol. Cell* **16**, 725-736.

Stratton M.R., Campbell P.J., Futreal P.A. (2009). The cancer genome. *Nature* **458**, 719-724.

Strausfeld U., Fernandez A., Capony J.P., Girard F., Lautredou N., Derancourt J., Labbe J.C., Lamb N.J. (1994). Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis. *J. Biol. Chem.* **269**, 5989-6000.

Ström A., Hartman J., Foster J.S., Kietz S., Wimalasena J., Gustafsson J.A. (2004). Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 1566-1571.

Stuart-Harris R., Caldas C., Pinder S.E., Pharoah P. (2008). Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast* **17**, 323-334.

Subik K., Lee J.F., Baxter L., Strzepak T., Costello D., Crowley P., Xing L., Hung M.C., Bonfiglio T., Hicks D.G., Tang P. (2010). The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)* **4**, 35-41.

T

Takahashi H., Murai Y., Tsuneyama K., Nomoto K., Okada E., Fujita H., Takano Y. (2007). High labeling indices of cdc25B is linked to progression of gastric cancers and associated with a poor prognosis. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **15**, 267-272.

Takemasa I., Yamamoto H., Sekimoto M., Ohue M., Noura S., Miyake Y., Matsumoto T., Aihara T., Tomita N., Tamaki Y., Sakita I., Kikkawa N., Matsuura N., Shiozaki H., Monden M. (2000). Overexpression of CDC25B phosphatase as a novel marker of poor prognosis of human colorectal carcinoma. *Cancer Res.* **60**, 3043-3050.

Tazi J., Bakkour N., Stamm S. (2009). Alternative splicing and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 14-26.

Theis-Febvre N., Filhol O., Froment C., Cazales M., Cochet C., Monsarrat B., Ducommun B., Baldin V. (2003). Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity. *Oncogene* **22**, 220-232.

Timofeev O., Cizmecioglu O., Hu E., Orlik T., Hoffmann I. (2009). Human Cdc25A phosphatase has a non-redundant function in G2 phase by activating Cyclin A-dependent kinases. *FEBS Lett.* **583**, 841-847.

Timofeev O., Cizmecioglu O., Settele F., Kempf T., Hoffmann I. (2010). Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition. *J. Biol. Chem.* **285**, 16978-16990.

Toyoshima-Morimoto F., Taniguchi E., Nishida E. (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep.* **3**, 341-348.

Troester M.A., Herschkowitz J.I., Oh D.S., He X., Hoadley K.A., Barbier C.S., Perou C.M. (2006). Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. *BMC Cancer* **6**, 276.

Turowski P., Franckhauser C., Morris M.C., Vaglio P., Fernandez A., Lamb N.J. (2003). Functional cdc25C dual-specificity phosphatase is required for S-phase entry in human cells. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2984-2998.

U

Uchida S., Ohtsubo M., Shimura M., Hirata M., Nakagama H., Matsunaga T., Yoshida M., Ishizaka Y., Yamashita K. (2004). Nuclear export signal in CDC25B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 226-232.

Uchida S., Yoshioka K., Kizu R., Nakagama H., Matsunaga T., Ishizaka Y., Poon R.Y., Yamashita K. (2009). Stress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res.* **69**, 6438-6444.

V

van Nes J.G., Seynaeve C., Jones S., Markopoulos C., Putter H., van de Velde C.J.; on behalf of the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational (TEAM) trialists. (2010). Variations in locoregional therapy in postmenopausal patients with early breast cancer treated in different countries. *Br. J. Surg.* **97**, 671-679.

Van't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A., Mao M., Peterse H.L., van der Kooy K., Marton M.J., Witteveen A.T., Schreiber G.J., Kerkhoven R.M., Roberts C., Linsley P.S., Bernards R., Friend S.H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530-536.

van Vugt M.A., Bràs A., Medema R.H. (2005). Restarting the cell cycle when the checkpoint comes to a halt. *Cancer Res.* **65**, 7037-7040.

Varmeh S., Manfredi J.J. (2008). Overexpression of the dual specificity phosphatase, Cdc25C, confers sensitivity on tumor cells to doxorubicin-induced cell death. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3789-3799.

Vegran F., Boidot R., Oudin C., Riedinger J.M., Lizard-Nacol S. (2005). Distinct expression of Survivin splice variants in breast carcinomas. *Int. J. Oncol.* **27**, 1151-1157.

Venables J.P., Klinck R., Bramard A., Inkel L., Dufresne-Martin G., Koh C., Gervais-Bird J., Lapointe E., Froehlich U., Durand M., Gendron D., Brosseau J-P., Thibault P., Lucier J-F., Tremblay K., Prinos P., Wellinger R.J., Chabot B., Rancourt C., Elela S.A. (2008). Identification of alternative splicing markers for breast cancer. *Cancer Res.* **68**, 9525-9531.

Venables J.P., Klinck R., Koh C., Gervais-Bird J., Bramard A., Inkel L., Durand M., Couture S., Froehlich U., Lapointe E., Lucier J-F., Thibault P., Rancourt C., Tremblay K., Prinos P., Chabot B., Elela S.A. (2009). Cancer-associated regulation of alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 670-677.

Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131-149.

Viallard J.F., Lacombe F., Belloc F., Pellegrin J.L., Reiffers J. (2001). Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire : aspects fondamentaux et implications en cancérologie. *Cancer/Radiother.* **5**, 109-129.

Vigo E., Müller H., Prosperini E., Hateboer G., Cartwright P., Moroni M.C., Helin K. (1999). CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6379-6395.

Viry E., Anwar A., Kirsch G., Jacob C., Diederich M., Bagrel D. (2011). Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases. *Int. J. Oncol.* **38**, 1103-1111.

W

Wang Y., Dean J.L., Millar E.K.A., Tran T.H., McNeil C.M., Burd C.J., Henshall S.M., Utama F.E., Witkiewicz A., Rui H., Sutherland R.L., Knudsen K.E., Knudsen E.S. (2008a). Cyclin D1b is aberrantly regulated in response to therapeutic challenge and promotes resistance to estrogen antagonists. *Cancer Res.* **68**, 5628-5638.

- Wang Y., Klijn J.G., Zhang Y., Sieuwerts A.M., Look M.P., Yang F., Talantov D., Timmermans M., Meijer-van Gelder M.E., Yu J., Jatkoe T., Berns E.M., Atkins D., Foekens J.A. (2005). Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* **365**, 671-679.
- Wang E.T., Sandberg R., Luo S., Khrebtkova I., Zhang L., Mayr C., Kingsmore S.F., Schroth G.P., Burge C.B. (2008b). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**, 470-476.
- Wang Z., Trope C.G., Florenes V.A., Suo Z., Nesland J.M., Holm R. (2010). Overexpression of CDC25B, CDC25C and phospho-CDC25C (Ser216) in vulvar squamous cell carcinomas are associated with malignant features and aggressive cancer phenotypes. *BMC Cancer* **10**, 233.
- Ward A.J., Cooper T.A. (2010). The pathobiology of splicing. *J. Pathol.* **220**, 152-163.
- Weigel M.T., Dowsett M. (2010). Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr. Relat. Cancer* **17**, 245-262.
- Wegener S., Hampe W., Herrmann D., Schaller H.C. (2000). Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C. *Eur. J. Cell. Biol.* **79**, 810-815.
- Wesierska-Gadek J., Gueorguieva M., Horky M. (2003). Dual action of cyclin-dependent kinase inhibitors: induction of cell cycle arrest and apoptosis. A comparison of the effects exerted by roscovitine and cisplatin. *Pol. J. Pharmacol.* **55**, 895-902.
- Whelan R.D., Waring C.J., Wolf C.R., Hayes J.D., Hosking L.K., Hill B.T. (1992). Overexpression of p-glycoprotein and glutathione S-transferase pi in MCF-7 cells selected for vincristine resistance in vitro. *Int. J. Cancer* **52**, 241-246.
- Woo E.S., Rice L.R., Lazo J.S. (1999). Cell cycle dependent subcellular distribution of Cdc25B subtypes. *Oncogene* **18**, 2770-2776.
- Woodbine L., Brunton H., Goodarzi A.A., Shibata A., Jeggo P.A. (2011). Endogenously induced DNA double strand breaks arise in heterochromatic DNA regions and require ataxia telangiectasia mutated and Artemis for their repair. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkr331.
- Wu W., Slomovitz B.M., Celestino J., Chung L., Thornton A., Lu K.H. (2003). Coordinate expression of Cdc25B and ER- α is frequent in low-grade endometrioid endometrial carcinoma but uncommon in high-grade endometrioid and nonendometrioid carcinomas. *Cancer Res.* **63**, 6195-6199.
- Wu W., Fan Y.H., Kemp B.L., Walsh G., Mao L. (1998). Overexpression of cdc25A and cdc25B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is not associated with overexpression of c-myc1. *Cancer Res.* **58**, 4082-4085.

X

- Xiao Z., Chen Z., Gunasekera A.H., Sowin T.J., Rosenberg S.H., Fesik S., Zhang H. (2003). Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J. Biol. Chem.* **278**, 21767-21773.
- Xing X., Chen J., Chen M. (2008). Expression of CDC25 phosphatases in human gastric cancer. *Dig. Dis. Sci.* **53**, 949-953.
- Xu X., Yamamoto H., Sakon M., Yasui M., Ngan C.Y., Fukunaga H., Morita T., Ogawa M., Nagano H., Nakamori S., Sekimoto M., Matsuura N., Monden M. (2003). Overexpression of CDC25A phosphatase is associated with hypergrowth activity and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1764-1772.

Y

Yao Y., Slosberg E.D., Wang L., Hibshoosh H., Zhang Y-J., Xing W-Q., Santella R.M., Weintein I.B. (1999). Increased susceptibility to carcinogen-induced mammary tumors in MMTV-Cdc25B transgenic mice. *Oncogene* **18**, 5159-5166.

Yerushalmi R., Hayes M.M., Gelmon K.A. (2009). Breast carcinoma--rare types: review of the literature. *Ann. Oncol.* **20**, 1763-1770.

Yoshida K., Miki Y. (2010). The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Sci.* **101**, 831-835.

Z

Zhou X.Z., Kops O., Werner A., Lu P.J., Shen M., Stoller G., Küllertz G., Stark M., Fischer G., Lu K.P. (2000). Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol. Cell* **6**, 873-883.

Zhu N., Gu L., Findley H.W., Li F., Zhou M. (2004). An alternatively spliced survivin variant is positively regulated by p53 and sensitizes leukemia cells to chemotherapy. *Oncogene* **23**, 7545-7551.

Zografos G.C., Roukos D.H. (2011). Innovative biomarker development for personalized medicine in breast cancer care. *Biomark. Med.* **5**, 73-78.

Zwicker J., Gross C., Lucibello F.C., Truss M., Ehiert F., Engeland K., Muller R. (1995). Cell cycle regulation of cdc25C transcription is mediated by the periodic repression of the glutamine-rich activators NF-Y and Sp1. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3822-3830.

BANQUES DE DONNÉES ET LOGICIELS DE BIOINFORMATIQUE

ELM-Functional Sites in Proteins : <http://elm.eu.org/help.html>

Ensemble Genome Browser : www.ensembl.org <http://www.ensembl.org/index.html>

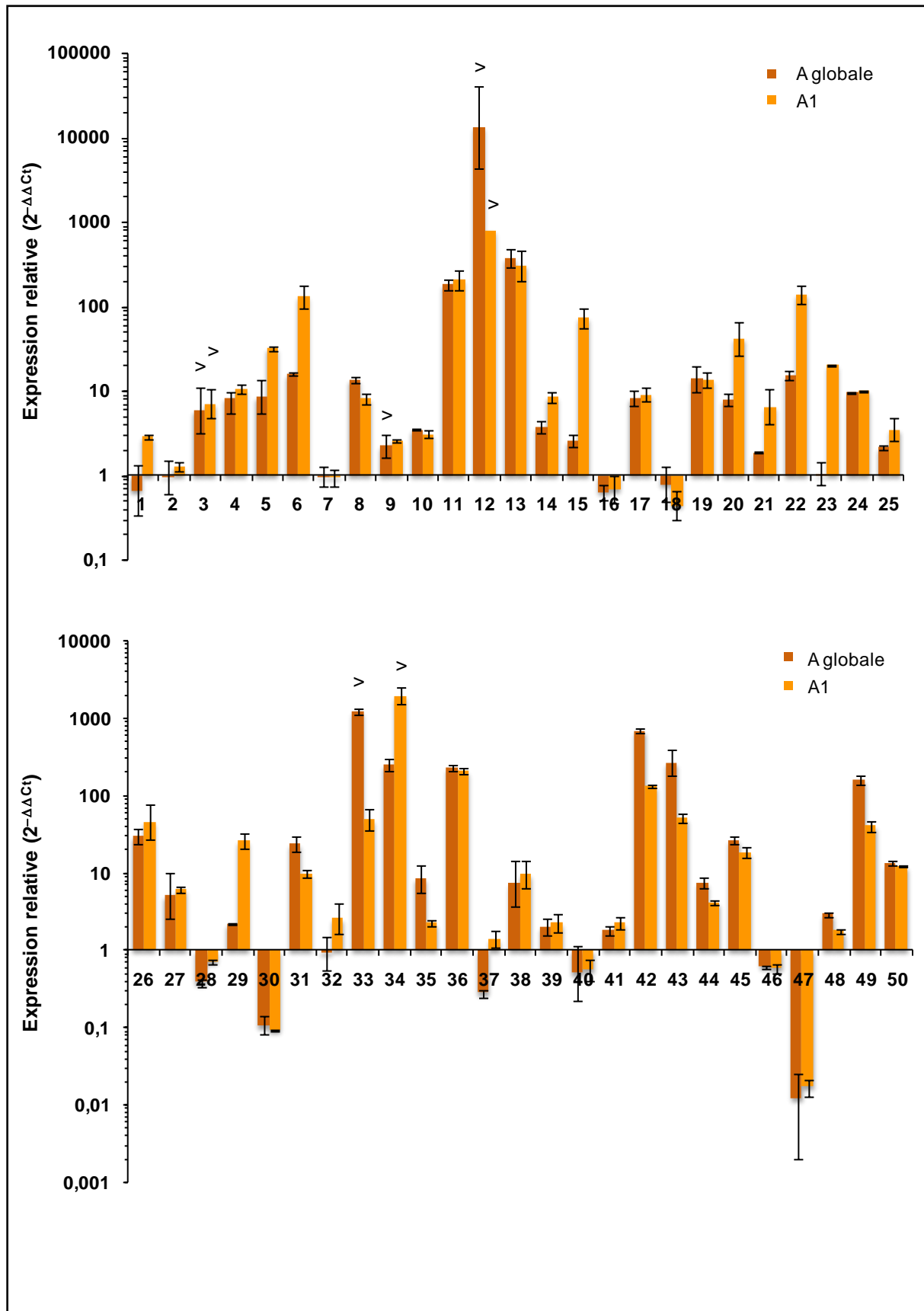
GenBank : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Primer 3 : <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

PrimerQuest : <http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>

Annexes

ANNEXE 1.



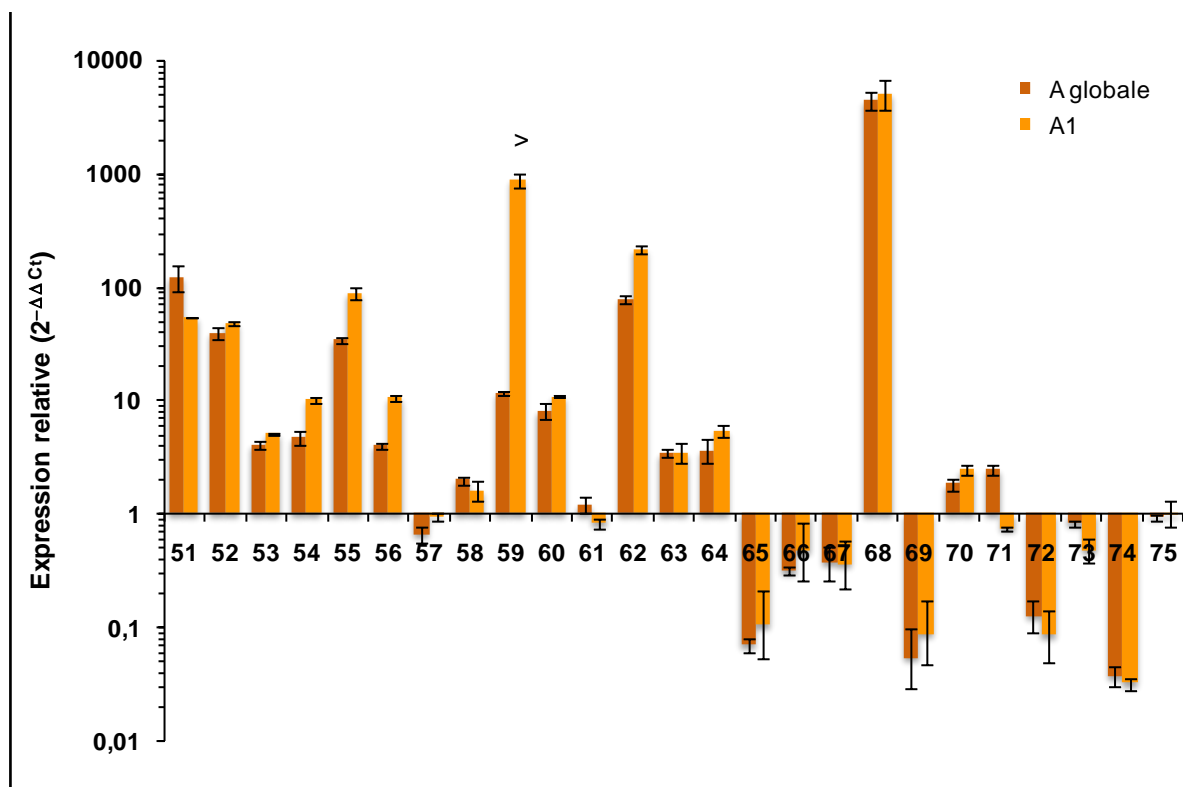
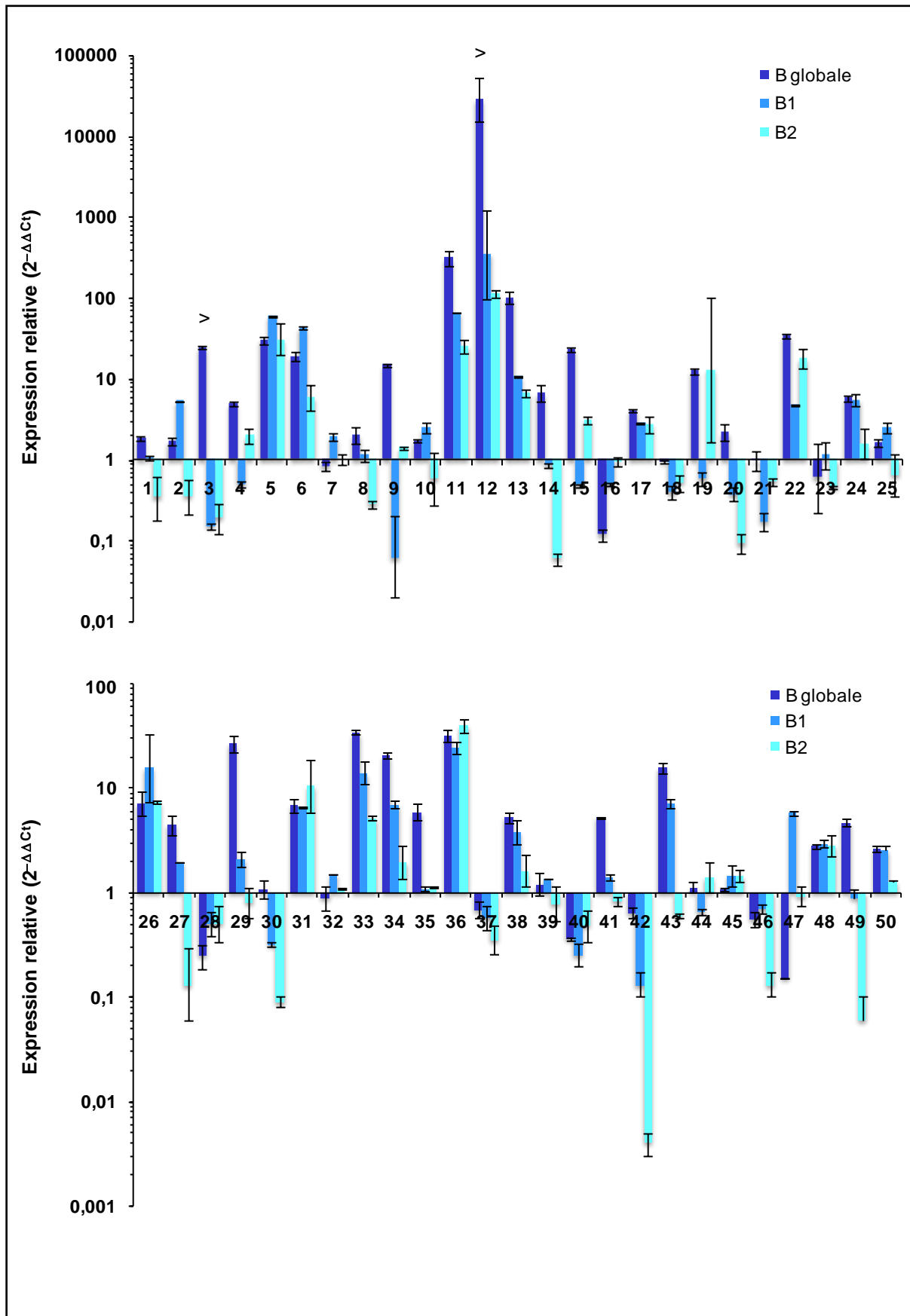


Figure 54. Analyse de l'expression globale de *CDC25A* et du variant *CDC25A1* par RT-PCR quantitative dans les tumeurs de sein. Les résultats sont exprimés comme l'expression relative entre le tissu tumoral et le tissu péri-tumoral apparié : moyenne des $2^{-\Delta\Delta C_T} \pm$ écart-type (trois expériences indépendantes), avec l'utilisation de l'ARNr 18S comme gène endogène de référence. > signifie que la valeur de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ est en fait supérieure à celle indiquée sur le graphique, mais ne peut être déterminée plus précisément en raison de l'absence d'expression observée dans le tissu péri-tumoral.

ANNEXE 2.



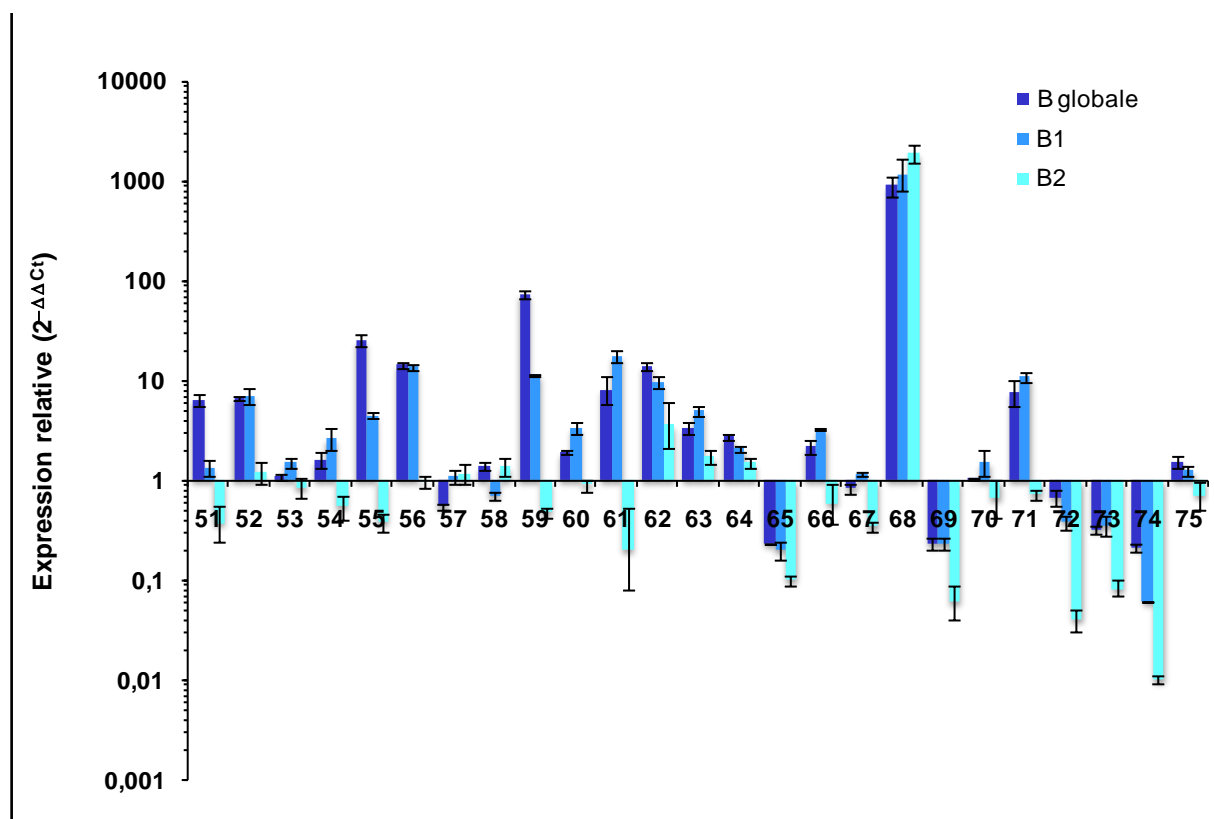
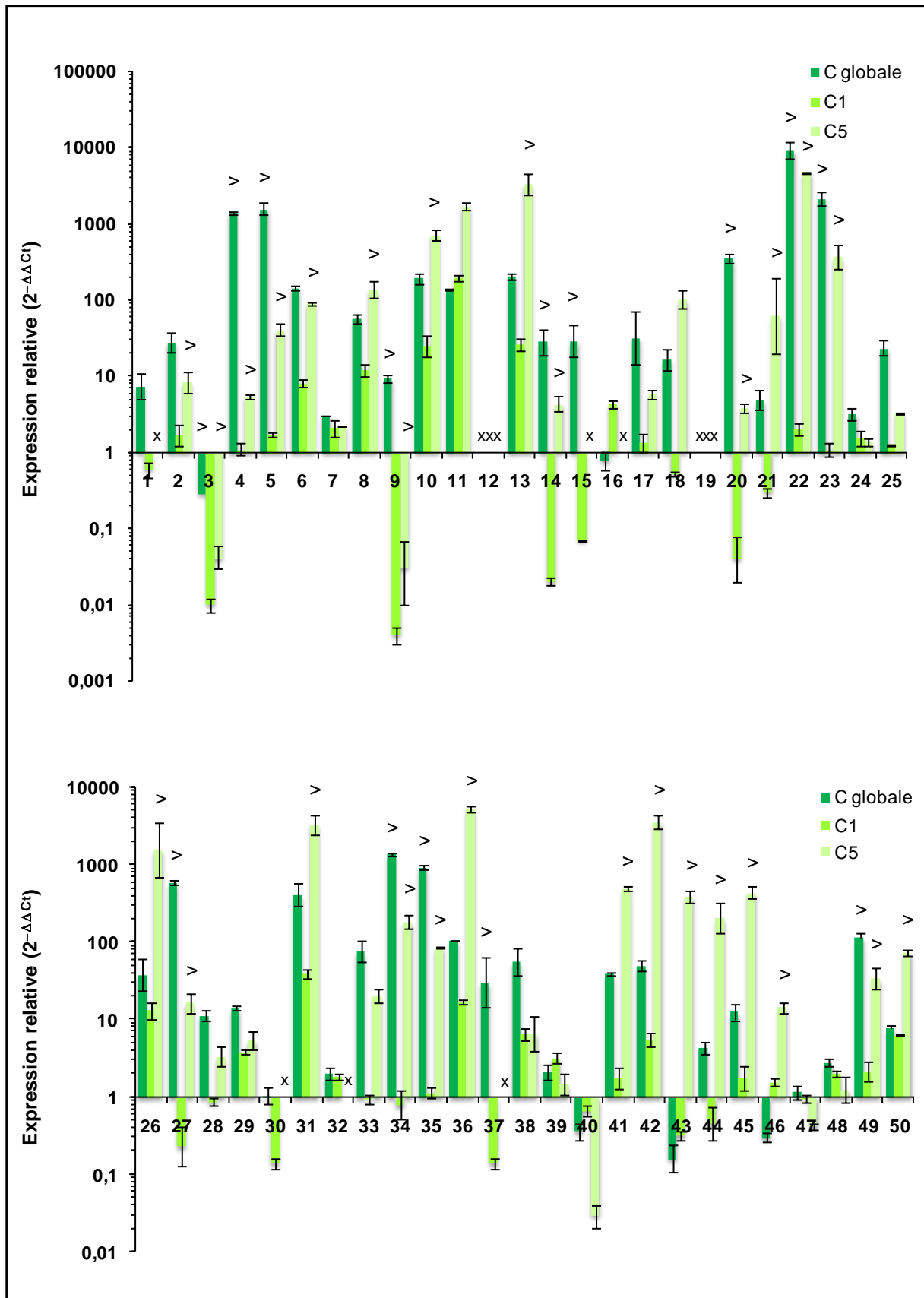


Figure 55. Analyse de l'expression globale de *CDC25B* et des variants *CDC25B1* et *CDC25B2* par RT-PCR quantitative dans les tumeurs de sein. Les résultats sont exprimés comme l'expression relative entre le tissu tumoral et le tissu péri-tumoral apparié : moyenne des $2^{-\Delta\Delta C_T} \pm$ écart-type (trois expériences indépendantes), avec l'utilisation de l'ARNr 18S comme gène endogène de référence. > signifie que la valeur de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ est en fait supérieure à celle indiquée sur le graphique, mais ne peut être déterminée plus précisément en raison de l'absence d'expression observée dans le tissu péri-tumoral.

ANNEXE 3.



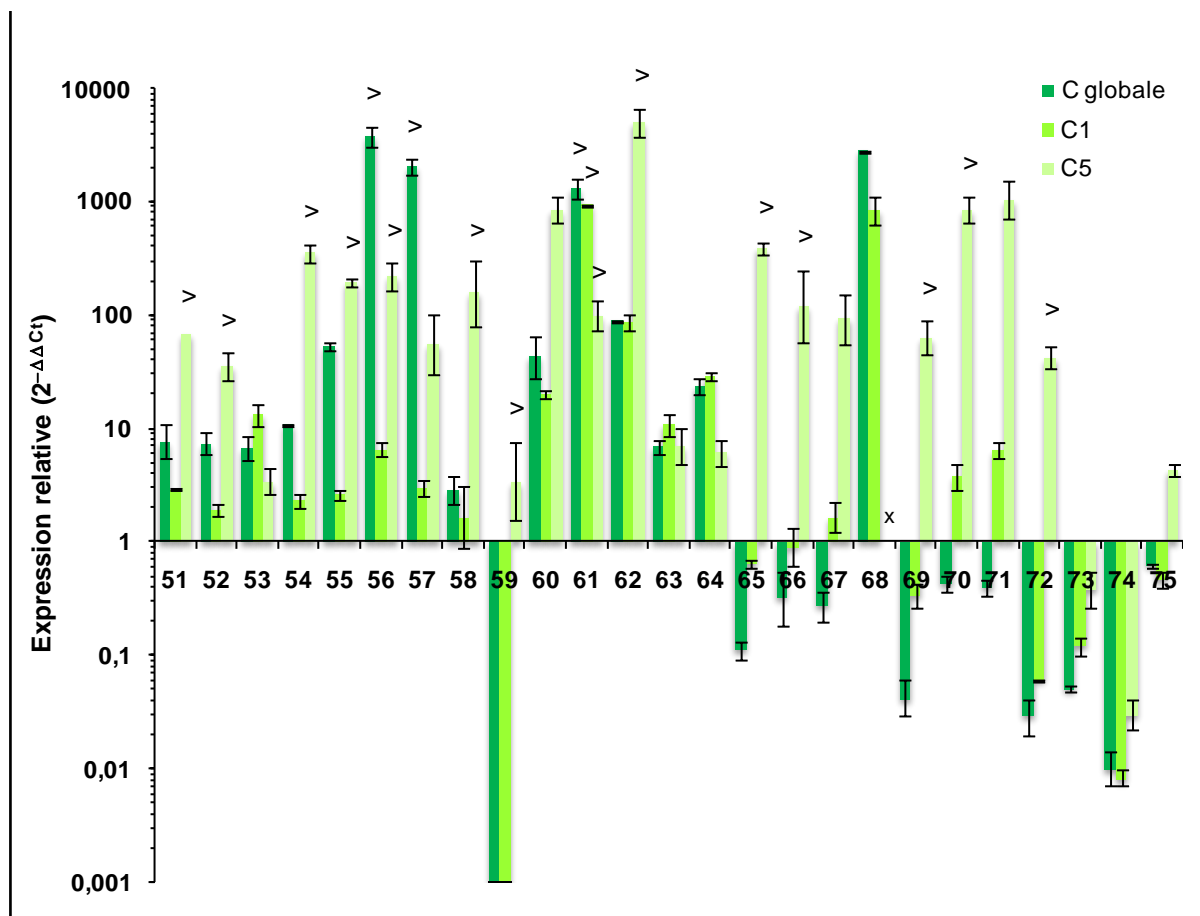


Figure 56. Analyse de l'expression globale de *CDC25C* et des variants *CDC25C1* et *CDC25C5* par RT-PCR quantitative dans les tumeurs de sein. Les résultats sont exprimés comme l'expression relative entre le tissu tumoral et le tissu péri-tumoral apparié : moyenne des $2^{-\Delta\Delta C_T} \pm$ écart-type (trois expériences indépendantes), avec l'utilisation de l'ARNr 18S comme gène endogène de référence. > signifie que la valeur de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ est en fait supérieure à celle indiquée sur le graphique, mais ne peut être déterminée plus précisément en raison de l'absence d'expression observée dans le tissu péri-tumoral. x indique qu'aucune amplification n'a été observée lors de la PCRq, ni dans le tissu péri-tumoral, ni dans le tissu tumoral.

ANNEXE 4.

Tableau 11. Corrélations entre l'expression des transcrits *CDC25* et les caractéristiques histopathologiques des tumeurs de sein (variables qualitatives).

Test	Paramètre	A globale			B1			B2			C globale			C1			C5								
		n	M	p	n	M	p	n	M	p	n	M	p	n	M	p	n	M	p						
<i>Mann-Whitney-Wilcoxon</i>	Grade																								
	I/II	47	2,9	0,056	47	4,1	0,035	47	2,0	0,015	47	1,3	0,014	47	0,7	0,024	46	7,8	0,169	46	1,7	0,199	39	86,6	0,930
	III	21	8,4		21	10,8		21	7,0		21	5,0		21	1,7		20	35,2		20	1,9		20	30,3	
	Métastases																								
	négatif	47	5,9	0,843	47	9,7	0,933	47	2,8	0,120	47	1,5	0,096	47	1,0	0,559	46	28,5	0,801	46	1,9	0,524	41	86,6	0,104
	positif	12	6,0		12	9,0		12	6,9		12	4,0		12	1,1		11	23,7		11	1,7		10	13,1	
<i>Mann-Whitney-Wilcoxon</i>	Statut RE																								
	négatif	10	13,4	0,074	10	47,4	0,042	10	20,5	0,013	10	7,9	0,036	10	3,4	0,092	10	33,5	0,591	10	6,4	0,446	10	41,6	0,431
	positif	65	2,9		65	5,1		65	2,0		65	1,4		65	0,7		63	11,2		63	1,7		56	64,7	
	Statut PR																								
	négatif	22	8,9	0,257	22	8,7	0,303	22	6,2	0,123	22	4,9	0,039	22	1,5	0,073	22	35,2	0,403	22	3,2	0,032	20	118,3	0,072
	positif	53	2,9		53	5,1		53	1,8		53	1,3		53	0,7		51	9,5		51	1,6		46	48,4	
<i>Mann-Whitney-Wilcoxon</i>	Statut HER2																								
	négatif	52	3,4	0,245	52	4,6	0,381	52	2,2	0,253	52	1,4	0,479	52	0,9	0,542	51	9,5	0,707	51	1,9	0,652	46	58,7	0,078
	positif	19	4,7		19	10,0		19	5,8		19	2,1		19	0,7		18	11,9		18	1,6		16	366,1	
	Type histologique																								
	canalaire	63	3,8	0,908	63	5,5	0,782	63	2,7	0,720	63	2,0	0,281	63	0,8	0,733	61	16,6	0,720	61	1,7	0,869	54	60,5	0,206
	lobulaire	6	3,9		6	6,7		6	1,5		6	0,7		6	0,5		6	4,0		6	1,4		6	32,6	
autres	4	5,0		4	6,1		4	3,0		4	1,0		4	1,3		4	208,0		4	2,4		4	451,3		
<i>Kruskal-Wallis</i>	Classification moléculaire																								
	luminal A	49	2,9	0,190	49	4,1	0,184	49	2,0	0,056	49	1,3	0,198	49	0,9	0,390	48	20,0	0,406	48	1,7	0,699	43	42,3	0,217
	luminal B	16	3,6		16	9,9		16	3,5		16	1,7		16	0,6		15	10,8		15	1,7		13	380,0	
	HER2-enrichi	3	369,7		3	48,7		3	34,2		3	10,7		3	5,1		3	76,1		3	0,9		3	20,1	
	triple négatif	7	11,7		7	46,2		7	7,0		7	5,0		7	1,7		7	23,7		7	10,8		7	63,1	

Ce tableau consigne les valeurs des médianes (M) des sous-groupes définis par le paramètre considéré. Les médianes ont été comparées par les tests de Mann-Whitney-Wilcoxon (pour deux variables) ou de Kruskal-Wallis (plus de deux variables) donnant les valeurs de la probabilité critique p . Les corrélations significatives ($p < 0,05$) sont en caractères gras. n : nombre d'échantillons analysés dans chaque sous-groupe.

ANNEXE 5.

Tableau 12. Corrélations entre l'expression des transcrits *CDC25* et l'âge de la patiente ou la taille de la tumeur (variables continues).

Paramètre	A globale			A1		
	n	r _s	p	n	r _s	p
Âge de la patiente	64	0,230	0,068	64	0,220	0,081
Taille de la tumeur	73	0,256	0,029	73	0,190	0,107

Paramètre	B globale			B1			B2		
	n	r _s	p	n	r _s	p	n	r _s	p
Âge de la patiente	64	0,18	0,155	64	0,181	0,152	64	0,139	0,273
Taille de la tumeur	73	0,199	0,092	73	0,218	0,063	73	0,236	0,044

Paramètre	C globale			C1			C5		
	n	r _s	p	n	r _s	p	n	r _s	p
Âge de la patiente	62	0,463	0,0002	62	0,232	0,07	56	0,164	0,227
Taille de la tumeur	72	0,309	0,008	72	0,159	0,181	65	0,136	0,281

Ce tableau consigne les valeurs du coefficient de corrélation des rangs de Spearman (r_s) ainsi que celles de la probabilité critique p . Les corrélations significatives ($p < 0,05$) sont en caractères gras. n : nombre d'échantillons analysés pour chaque paramètre.

ANNEXE 6.

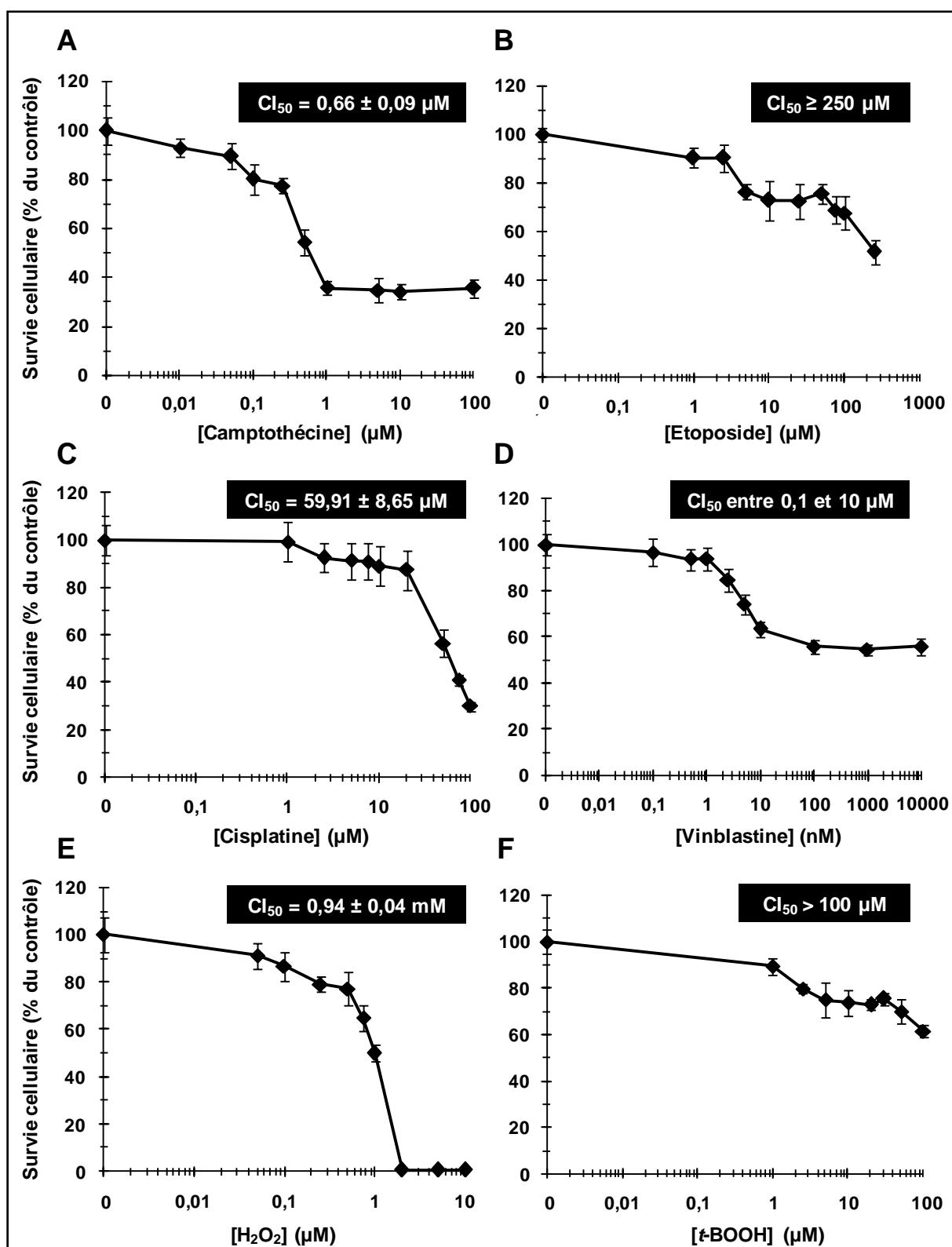


Figure 57. Effet de différents agents génotoxiques sur la croissance des cellules MCF-7. Les cellules ont été incubées en présence de concentrations croissantes de camptothécine (A), d'étoposide (B), de cisplatine (C), de vinblastine (D), de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (E) et de *tert*-butyl hydroperoxyde (*t*-BOOH) (F) pendant 24 h, puis la viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du test MTT. Chaque figure est représentative de trois expériences indépendantes. Les valeurs de CI_{50} ont été déterminées grâce au logiciel GraphPad Prism 5 quand les données le permettaient.

ANNEXE 7.

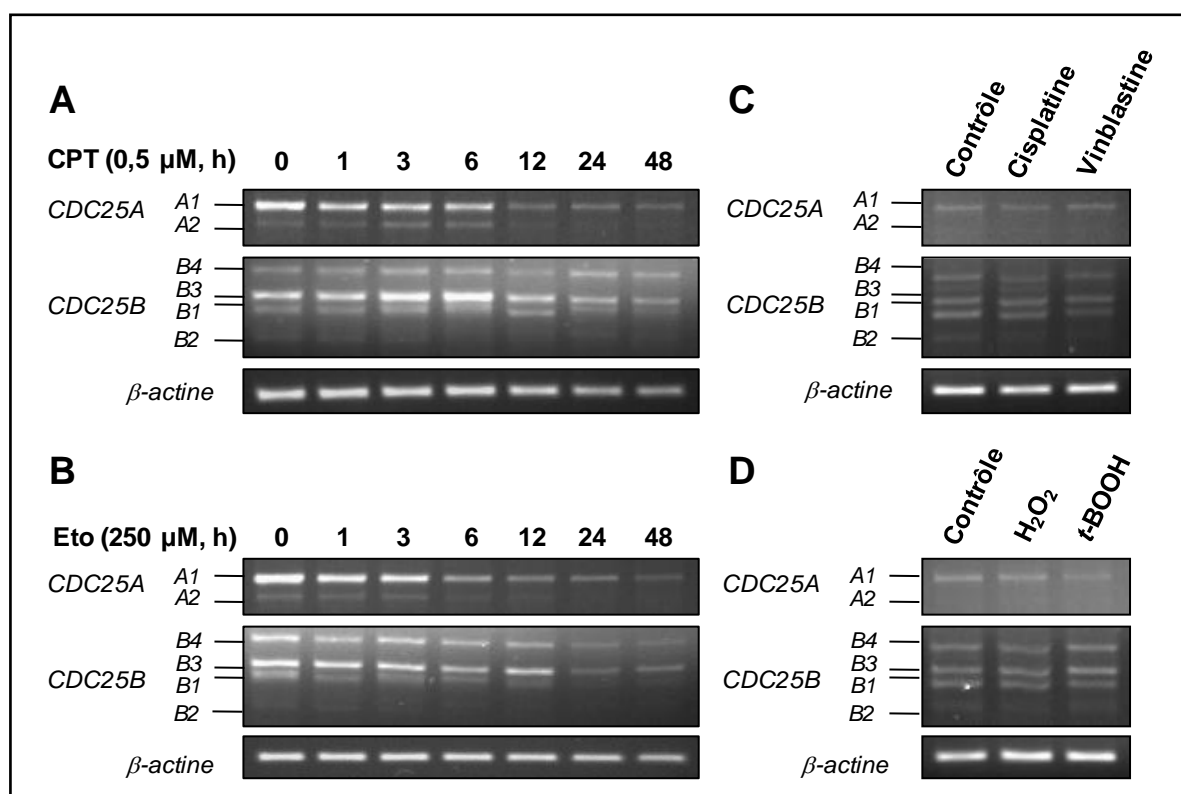


Figure 58. Analyse de l'épissage alternatif de *CDC25A* et *CDC25B* par RT-PCR semi-quantitative dans les cellules MCF-7. Les cellules ont été traitées par 0,5 μ M de camptothécine (CPT) (A) et par 250 μ M d'étoposide (Eto) (B) pendant différents temps, ainsi que par 50 μ M de cisplatine et par 1 μ M de vinblastine (C) ou par 1 mM de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et par 100 μ M de *tert*-butyl hydroperoxyde (*t*-BOOH) pendant 12 h (D).

Publications

ARTICLE 1.

Clin Chem Lab Med 2011;49(10):xxx-xxx © 2011 by Walter de Gruyter • Berlin • Boston. DOI 10.1515.CCLM.2011.635

Differential expression of CDC25 phosphatases splice variants in human breast cancer cells

Hélène Albert¹, Susana Santos^{2,3}, Eric Battaglia¹, Miguel Brito⁴, Carolino Monteiro^{2,5} and Denyse Bagrel^{1,*}

¹ Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique, EA 3940, FR CNRS 2843, Université Paul Verlaine-Metz, Metz, France

² Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

³ Centro de Química Estrutural, Complexo Interdisciplinar – Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal

⁴ Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Lisboa, Portugal

⁵ CIMAGO, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Abstract

Background: CDC25 phosphatases control cell cycle progression by activating cyclin dependent kinases. The three CDC25 isoforms encoding genes are submitted to alternative splicing events which generate at least two variants for CDC25A and five for both CDC25B and CDC25C. An over-expression of CDC25 was reported in several types of cancer, including breast cancer, and is often associated with a poor prognosis. Nevertheless, most of the previous studies did not address the expression of CDC25 splice variants. Here, we evaluated *CDC25* spliced transcripts expression in anti-cancerous drug-sensitive and resistant breast cancer cell lines in order to identify potential breast cancer biomarkers. **Methods:** *CDC25* splice variants mRNA levels were evaluated by semi-quantitative RT-PCR and by an original real-time RT-PCR assay.

Results: *CDC25* spliced transcripts are differentially expressed in the breast cancer cell lines studied. An up-regulation of *CDC25A2* variant and an increase of the *CDC25C5/C1* ratio are associated to the multidrug-resistance in VCREMS and DOXOR breast cancer cells, compared to their sensitive counterpart cell line MCF-7. Additionally, *CDC25B2* transcript is exclusively over-expressed in VCREMS resistant cells and could therefore be involved in the development of certain type of drug resistance.

Conclusions: *CDC25* splice variants could represent interesting potential breast cancer prognostic biomarkers.

*Corresponding author: Prof. Denyse Bagrel, Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique, Rue du Général Delestraint, 57070, Metz, France
Phone: +33 3 87 37 84 04, Fax: +33 3 87 37 84 23,
E-mail: bagrel@univ-metz.fr

Received January 18, 2011; accepted April 12, 2011

Keywords: alternative splicing; breast cancer; CDC25 phosphatases; prognostic markers.

Introduction

A wide variety of cancers present abnormal expression of cell cycle regulatory proteins related to the malignant transformation of cells. The most important effectors of the cell cycle control belong to the cyclins and cyclin dependent kinase (CDK) family. Different cyclin/CDK complexes are sequentially activated and inactivated throughout cell cycle progression. CDK activity is regulated, among other mechanisms, by phosphorylation of two residues located within the ATP binding site (Thr14 and Tyr15 of CDK1). The phosphorylation of these residues by the WEE1 and MYT1 kinases maintains CDK to an inactive form (1), whereas their dephosphorylation by CDC25 phosphatases activates CDK, allowing progression into the next phase of the cell cycle (2).

CDC25 phosphatases are essential for cell cycle control in eukaryotes under normal conditions and in response to DNA damage (3). The N-terminal regulatory domain is involved in a tight regulation of CDC25 by multiple mechanisms, including phosphorylation, protein interactions (14-3-3), changes in their intracellular localization, and proteasome-mediated degradation (4). Three isoforms of CDC25 were identified in humans: CDC25A, CDC25B, and CDC25C. CDC25A was initially found to act mainly at the G₁/S transition (5), while CDC25B and CDC25C were preferentially required at the G₂/M transition (6, 7). However, recent studies suggest a functional redundancy of the three CDC25 isoforms both at the G₁/S and G₂/M transitions (8). Previously, CDC25A and CDC25B, but not CDC25C, were described as potential oncogenes as they cooperate either with expression of HRAS or loss of RB1 to induce oncogenic transformation in murine fibroblasts (9). Consistent with this potential oncogenic role, CDC25A and CDC25B over-expression was reported in a variety of human cancers, such as breast (9–14), ovarian (15), colorectal (16), esophageal (17), and non-small cell lung carcinomas (18), or in non-Hodgkin's lymphomas (19). Furthermore, this over-expression was frequently correlated with a more aggressive form of tumor and with a poor prognosis (20). Conversely, CDC25C over-expression has been observed in a limited number of cancers (16, 21, 22). However, the over-expression of CDC25, in particular CDC25C, could be misestimated in many of those studies due to the non-discrimination between alternative splice variants.

Indeed, the three CDC25 isoforms are submitted to an alternative splicing mechanism occurring at the N-terminal regulatory domain which generates at least two variants for

CDC25A (23) and five for both CDC25B (24, 25) and CDC25C (23, 26) (Figure 1). All CDC25 splice isoforms keep an intact catalytic domain, except CDC25C3 which gives rise to a truncated protein, lacking the phosphatase activity (23). This alternative splicing leads to the loss of consensus regulatory sites that might modulate the ability of each spliced protein to regulate the cell cycle. Little is known until now about the specific functions of each CDC25 splice variant, their expression in tumors, and their potential role in oncogenesis. More precisely, to our knowledge, no expression study of these variants in breast cancer has been reported so far. As disruption of the splicing process is a recurrent phenomenon during tumorigenesis (27), alternatively spliced transcripts can represent valuable cancer biomarkers (28). Therefore, the aim of our study was to evaluate CDC25 splice variants mRNA expression in breast cancer cell lines in order to identify potential breast cancer biomarkers. Moreover, evaluating the expression of CDC25 splice variants in sensitive and resistant cell lines may help to understand the role of these variants in cancer progression.

Materials and methods

Cell lines and cell culture conditions

MCF-7 (ECACC, Salisbury, UK, 86012803) (29), VCREMS (30), and MDA-MB231 (ATCC, Manassas, VA, HTB-26) (31) cell lines were grown in RPMI-1640 medium (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 2 mmol/L glutamine, and 100 UI/mL penicillin/100 µg/mL streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. DOXOR cells (initially denoted ADR^h) (32) were cultured in the same conditions in the presence of 9 µmol/L doxorubicin to maintain their resistance phenotype. hTERT-HME1 cell line (ATCC, CRL-4010) was maintained in 90% of the medium mentioned above and 10% of MEGM medium (Cambrex, Walkersville, MD). The cells were plated at a density of 1.10⁶ in 100-mm dishes and then harvested in exponential growing phase.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was extracted using Extract-All reagent (Eurobio) following the manufacturer's instructions and treated with RNase-free DNase I (Qiagen, Courtaboeuf, France) to eliminate genomic DNA. RNA was quantified and checked for integrity by means of agarose gel electrophoresis. For subsequent semi-quantitative RT-PCR experiments, 2 µg of total RNA were used to synthesize cDNA. RNA was first incubated with oligodT (10 µmol/L), heated for 10 min at 70°C, cooled for 5 min on ice and then incubated for 1 h at 42°C in the presence of 400 units of Maloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), 1.2 U/µL RNase inhibitor, and 500 µmol/L dNTP. For real-time RT-PCR assays, cDNA was obtained using the TaqMan[®] Reverse Transcription Reagent kit with random hexamers (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) as described in the manufacturer's protocol.

Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

PCRs were performed using 100 ng of cDNA prepared as described above, in a total volume of 25 µL. PCR experiments specific for

each CDC25 variant were performed using the following primer pairs (see Figure 1 for localization): (i) for CDC25A splice variants (23) – Av forward (Fw) 5'-GGGGGACTGTCGCTGTACCAACCT-3' and Av reverse (Rv) 5'-GGGGTCTCCTCCTCATTCTCAGATTC-3'; (ii) for CDC25B splice variants (24) – Bv Fw 5'-GCTTCTCGCCGGTCACCAC-3' and Bv Rv 5'-CCTGCGCTGGCCCACTC-3'; (iii) for CDC25C splice variants (23) – Cv Fw 5'-CTCCTGGAGAGAGACACTTCTTAC-3' and Cv Rv 5'-CCACTTCTGCTCACCTTTGCTTCTTG-3'; and (iv) for β -actin as an internal control – Fw 5'-GGACGACATGGAGAAAATCTGG-3' and Rv 5'-TGGATAGCAACGTACATGGCTG-3'. Amplification conditions were the following: a denaturation step – 95°C for 45 s; a primer hybridization step – 63°C for CDC25A, CDC25B, and CDC25C or 60°C for β -actin for 45 s; and an extension step of 72°C for 1 min 30 s with, respectively, 24 cycles for β -actin, 32 cycles for CDC25A and CDC25B, and 35 cycles for CDC25C, with a common additional elongation step of 72°C for 5 min. All reactions were performed in a PTC-100[™] thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA). Amplified products were separated by electrophoresis in 2% agarose Tris-borate EDTA gel, and stained with 0.5 µg/mL ethidium bromide.

Real-time quantitative RT-PCR

The mRNA level of each CDC25 isoform was measured by real-time RT-PCR with the StepOne Plus System (Applied Biosystems) using specific primers and TaqMan[®] probes presented in Table 1. Primers and probes were carefully designed to avoid self-complementarity or the formation of primer-dimers and hairpins. Reactions were performed using iTaq Supermix with ROX (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), in a final volume of 25 µL with 0.4 µmol/L of each primer and 0.3 µmol/L of TaqMan[®] probe. The house-keeping gene, used to normalize each result, was the 18S rRNA (Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control, VIC/TAMRA Probe, Applied Biosystems). The real-time PCR program consisted of an initial denaturation step at 95°C for 3 min followed by 45 cycles at 95°C for 15 s and at 60°C for 1 min. Each sample was analyzed in triplicate and each PCR experiment included at least one non-template control well. Gene expression was relatively quantified using the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} method (33), where $\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ target gene} - C_T \text{ 18S rRNA}) \text{ cancerous cell line} - (C_T \text{ target gene} - C_T \text{ 18S rRNA}) \text{ non-cancerous cell line (hTERT-HME1)}$, and C_T represents the PCR cycle required to cross an arbitrarily placed threshold. Real-time PCR efficiencies were determined using serial dilutions of cDNA and calculated by the relationship $E = 10^{(1/\text{slope})} - 1$ (Table 1).

Statistical analysis

Data represent the mean of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using the Student's t-test. Differences between samples were considered as statistically significant for a p-value < 0.05.

Results

Experiments were performed on different cell lines. The non-cancerous mammary epithelial cell line hTERT-HME1, immortalized with the human telomerase reverse transcriptase, was used as a control relative to the mammary adenocarcinoma cell lines MCF-7 and MDA-MB231. These cell lines were obtained from pleural effusion of two different patients diagnosed with breast cancer and are considered as

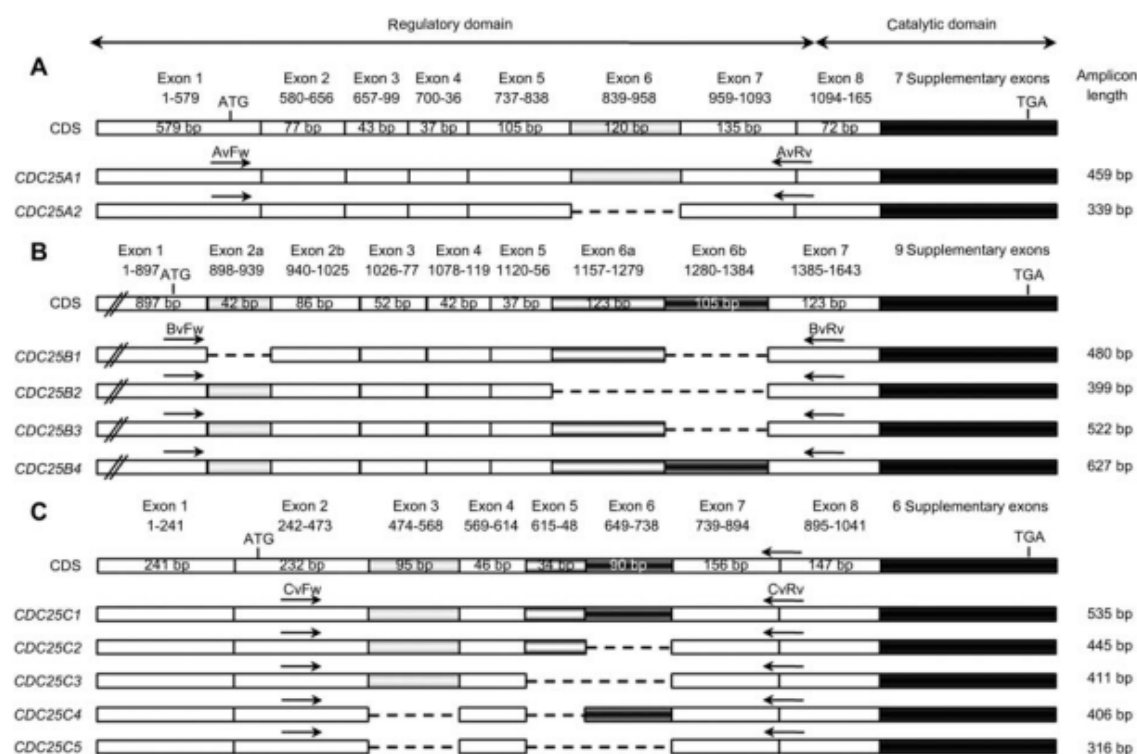


Figure 1 Schematic representation of major *CDC25* alternatively spliced variants.

Coding sequences (CDS) are depicted above cDNA of *CDC25A* (A), *CDC25B* (B), and *CDC25C* (C) splice variants. Numbers at the top indicate exons numbers and nucleotides positions. Number in each rectangle indicates size (bp) of corresponding exon. Dark/light gray rectangles correspond to alternatively spliced exons. ATG, translation start codon; TGA, translation stop codon. Figure is not drawn to scale. Localization of the three primers sets used to amplify the different *CDC25A*, *CDC25B*, and *CDC25C* variants by semi-quantitative RT-PCR is indicated by arrows (see Materials and methods for primers sequences). Amplicon length expected for each splice variant appears at the right of the figure.

sensitive towards different anti-cancerous drugs. Moreover, two multidrug-resistant cell lines deriving from MCF-7 were compared to their sensitive MCF-7 counterpart: VCREMS selected as resistant to vincristine and DOXOR selected as resistant to doxorubicin, both exhibiting cross-resistance to a wide range of anti-cancerous agents.

***CDC25* splice variants expression in breast cancer cell lines**

The expression of the currently known *CDC25* splice transcripts was first evaluated by semi-quantitative RT-PCR using primers adjacent to the region submitted to alternative splicing and designed in order to generate amplicons of different length specific for each *CDC25* variant (Figure 1). Afterwards the contribution of the potentially major variants was evaluated through real-time, quantitative RT-PCR (qRT-PCR). For this purpose, we designed original primers and TaqMan[®] probes able to detect specifically each *CDC25* variant (Table 1). qRT-PCR efficiency was determined as 87%–100%, thus validating the primers and probe accuracy (Table 1). Furthermore, primer specificity was verified since single amplicons of the expected size have been detected on agarose gel (data not shown).

CDC25A Two *CDC25A* splice variants were identified to date (23), differing in the presence/absence of the exon 6 (Figure 1A). As shown by semi-quantitative RT-PCR, *CDC25A1* is expressed in all tested cell lines, whereas *CDC25A2* mRNA level is extremely low (Figure 2). With a more accurate qRT-PCR assay, a significant over-expression of global *CDC25A* (with an increase of both *CDC25A1* and *CDC25A2* variants) was observed in MDA-MB231 cell line compared to hTERT-HME1, but not in MCF-7 (Figure 3A). As MCF-7 and MDA-MB231 cell lines were obtained from two different patients, the expression level for the tested variants could depend on the tumor status. Additionally, global *CDC25A*, *CDC25A1*, and *CDC25A2* expression is up-regulated in the resistant cell line VCREMS compared to the sensitive parental cell line MCF-7, whereas only the proportion of *CDC25A2* is increased in DOXOR cells (Figure 3A). Consequently, *CDC25A2* variant could be a resistance marker in these cells.

CDC25B *CDC25B* pre-mRNA alternative splicing generates at least five variants (24, 25). *CDC25B1-B4* transcripts diverge by differential incorporation of exons 2a, 6a, and 6b (Figure 1B). The *CDC25B5* sequence is quite controversial

Table 1 Sequences and position of primers and TaqMan[®] probes designed for real-time PCR experiments.

CDC25 detected	Primers (5' → 3')		Probes (6FAM-5' → 3'TAMRA)		Amplicon length (bp)	Real-time PCR efficiency (E) ^b
	Sequences	Position ^a	Sequences	Position ^a		
global <i>CDC25A</i>	Fw GAAAGAGATAGCAGTGAACCAGGG	Ex7	AGTCACCTGTGACA GCCACTTTGTCTG	Ex7	98	E = 96.2% R ² = 0.983
	Rv TCCACGAAGCCATCATCCCTCATCA	Ex7				
<i>CDC25A1</i>	Fw AGTAAAGACCTGTATCTCGTGGCTG	Ex6	TCTCATGGACTCCAG GAGGGTAAAGATCT	Ex6	83	E = 90.1% R ² = 0.989
	Rv CAGAGTTCTGCCCTCTGTGTGAAGA	Ex6				
<i>CDC25A2</i>	Fw AGGAGCCATTCTGATTCTCTTG	Ex5	AGATGAGAAACAAGG AAAATCTTTCTCTCA	jEx5-7	122	E = 89.3% R ² = 0.956
	Rv TCACAGGTGACTGGGGTGTGA	Ex7				
global <i>CDC25B</i>	Fw TCCTGACCGGAAGATGGAAG	Ex8	CCCCCTGGCCCTAGG TCGCTTC	Ex8	111	E = 98.7% R ² = 0.977
	Rv AGGATGTCCACAAATCCATCA	Ex8				
<i>CDC25B1</i>	Fw CCGGTCACCAACCCTCACCCA	Ex1	ACCTCGCCGGGCTCG GCAGCCCGCA	jEx1-2b	75	E = 91.3% R ² = 0.996
	Rv GGATAGGTGCGTCAGGCGGC	Ex2b				
<i>CDC25B2</i>	Fw TCGAAACGAGCAGTTTGGCCATCA	jEx4-5	AGCTTCCAGTCTATG CCGGATGGATTGTG	jEx5-7	79	E = 86.7% R ² = 0.991
	Rv TGTGGGCTTCCATGGCATCTTGA	Ex7				
global <i>CDC25C</i>	Fw GGAGGAAGATTCTAACCCAGG	Ex9	TTTCCAAGGTATGTG CGCTGCCAA	jEx9-10	86	E = 99.8% R ² = 0.989
	Rv GATCTTGGTGTTCCTCGAC	Ex10				
<i>CDC25C1</i>	Fw TGGGGAGATAACTGCCACTCA	Ex3	ATTCTTCAGGACTTC AGGAAAGTGCAAT	Ex4	144	E = 88.9% R ² = 0.997
	Rv AGAAGCTGTGCTGGGCTACATT	jEx5-6				
<i>CDC25C5</i>	Fw AGCATTTTGTCTGGGTACCTG	jEx2-4	ATTCTTCAGGACTTC AGGAAAGTGCAAT	Ex4	72	E = 92.2% R ² = 0.992
	Rv GTTCCATTGTCAATCCAGCTA	jEx4-7				

Fw, forward primer; Rv, reverse primer. ^aThe hybridizing position of each primer or probe is shown; e.g., Ex7 means that the primer is located within exon 7, jEx4-5 means that it is located at the junction between exons 4 and 5. ^bReal-time PCR efficiency was determined as described in Materials and methods.

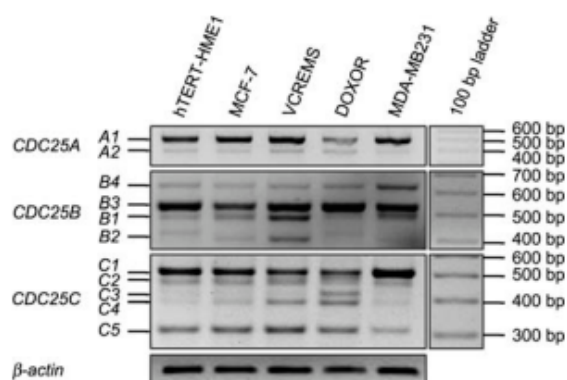


Figure 2 *CDC25* splice variants expression in different human mammary cell lines.

mRNA levels of *CDC25A*, *CDC25B*, and *CDC25C* splice variants were evaluated by semi-quantitative RT-PCR using primers sets surrounding the region subject to alternative splicing (see Figure 1). *CDC25* splice variants levels in the indicated breast cancer cell lines were compared to those of the non-cancerous immortalized hTERT-HME1 cell line. Results are representative of two independent experiments.

(2), because it was found in only one study (25), but is not listed in the Ensembl database. Thus, we chose not to study this variant. *CDC25B3* represents the main variant in all studied cell lines, whereas *CDC25B1*, *CDC25B2*, and *CDC25B4* were expressed at lower levels (Figure 2). In order to obtain more rigorous data, we determined the expression level of global *CDC25B*, *CDC25B1*, and *CDC25B2* by real-time PCR assay. *CDC25B3* expression was not determined because it was impossible to design the primers and a TaqMan[®] probe specific for this variant with an amplicon length recommended for this kind of assay. The overall expression level of global *CDC25B* and *CDC25B1* variant is quite similar in MCF-7 and MDA-MB231 cell lines relative to the normal cell line, whereas *CDC25B2* is over-expressed, suggesting that this variant could be involved in the malignant transformation of these cells (Figure 3B). Resistant cell lines showed opposite results with VCREMS over-expressing *CDC25B* related isoforms, particularly *CDC25B2*, whereas DOXOR under-expressed them (compared to MCF-7) (Figure 3B). Therefore, the *CDC25B2* variant could be implicated in the acquisition of certain types of resistance.

CDC25C *CDC25C* pre-mRNA alternative splicing results into at least five variants exhibiting differential skipping of exons 3, 5, and 6 (Figure 1C) (23). Semi-quantitative RT-PCR experiments showed that the major alternatively spliced transcripts correspond to the full-length *CDC25C1* and to the shortest *CDC25C5* variant, while other variants are present in lower amounts (Figure 2). Interestingly, drug-resistant cell lines present particular profiles, since *CDC25C5* and *CDC25C4* variants appear to be up-regulated in VCREMS, whereas *CDC25C4* and *CDC25C3* expression is increased in DOXOR, to the detriment of *CDC25C1* (Figure 2). Quantitative RT-PCR demonstrated that global expression of

CDC25C is constant in all cell lines, despite an unequal proportion of *CDC25C* splice variants (Figure 3C). *CDC25C* related variants expression is not statistically different in MCF-7 compared to hTERT-HME1, while MDA-MB231 cells present an increase of *CDC25C1* and a decrease of *CDC25C5* (Figure 3C). Most relevant, the ratio between *CDC25C5* and *CDC25C1* variants is increased in both resistant cell lines VCREMS and DOXOR compared to their sensitive cell line of origin MCF-7 (2.2 ± 0.2 and 2.4 ± 0.4 -fold change, respectively) (Figure 3D). Therefore, *CDC25C5/C1* ratio could represent a potential marker for multidrug-resistance development.

Discussion

CDC25 phosphatases are involved in cell cycle progression by activating cyclin/CDK complexes. Over-expression of *CDC25A* and *CDC25B* was documented in a variety of human malignancies (9–19, 34), consistent with their oncogenic potential in cooperation with other oncogenic events (9). Conversely, the implication of *CDC25C* in cancer remains enigmatic. Among the few studies having assessed *CDC25C* expression in cancer, some reported no implication of this isoform (18, 19, 34, 35), while others observed an over-expression of *CDC25C* associated with aggressive cancer phenotypes (16, 21, 22, 36). *CDC25A* up-regulation was reported particularly in breast cancer, often in association with a poor survival (9, 10, 12–14), except for one study (11). *CDC25B* over-expression was shown in two studies giving contradictory results. One of them showed a correlation between *CDC25B* up-regulation and severe histological grading (9), whereas the other observed that *CDC25B* expression was significantly lower in aggressive breast tumors (11). *CDC25C* expression has not been evaluated until now in breast cancer, except by Galaktionov et al. (9). Nevertheless, they did not detect any expression of *CDC25C* in either normal tissues or tumoral ones.

These inconsistent results could be attributed to the lack of sensitivity of the techniques used or to the lack of exploration of the effective contribution of *CDC25* alternative splicing (20). In this context, we developed an original quantitative RT-PCR method and we report here the first sensitive and specific evaluation of *CDC25* splice variants expression in breast cancer cells. We chose to work on two anti-cancerous drug-sensitive and two resistant cancer cell lines as well as on a non-cancerous mammary cell line, in order to highlight particular expression of *CDC25* splice variants in these cells, and to suggest their possible implication in the tumorigenesis or in the drug resistance of breast cancer cells.

CDC25 pre-mRNA generates at least two alternative spliced transcripts for *CDC25A* and five for *CDC25B* and *CDC25C* (2). All these previously described splice variants were observed by semi-quantitative RT-PCR in our study, except *CDC25B5*. We showed that *CDC25A2* variant mRNA level is very low compared to that of *A1* in all mammary cell lines. Concerning *CDC25B*, *CDC25B3* is the major variant both in normal and cancerous cells, which is consistent

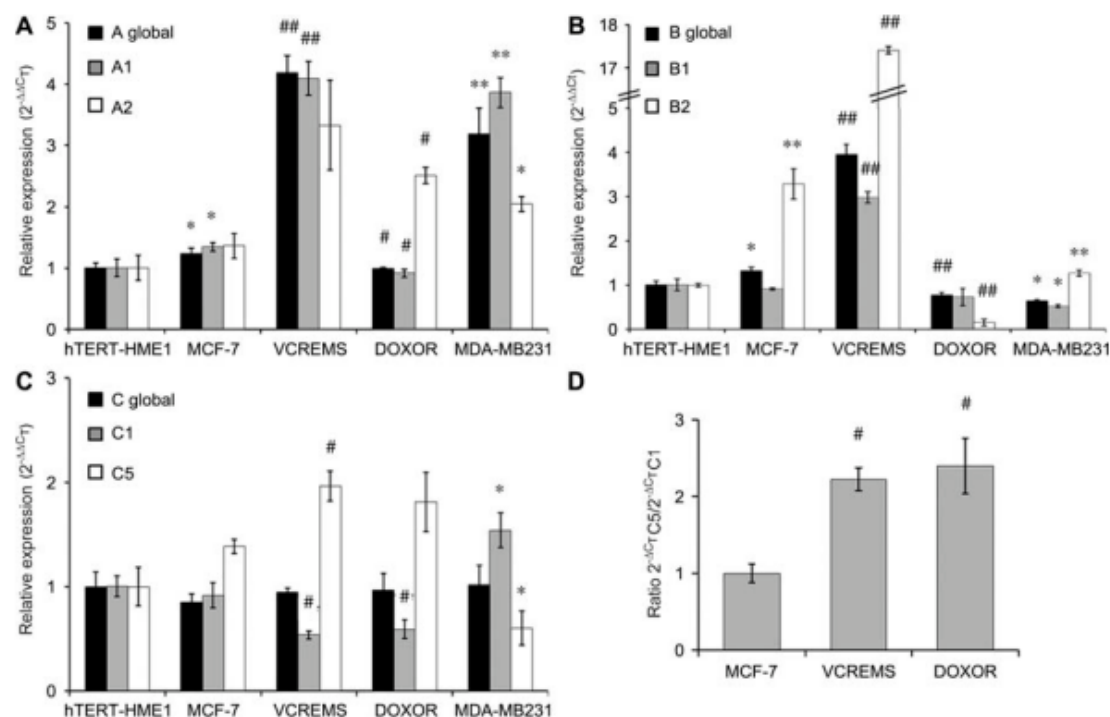


Figure 3 Relative expression of different *CDC25* splice variants in breast cancer cell lines. mRNA levels of global *CDC25A*, *CDC25A1*, *CDC25A2* (A); global *CDC25B*, *CDC25B1*, *CDC25B2* (B); global *CDC25C*, *CDC25C1*, and *CDC25C5* (C) were assessed by real-time quantitative RT-PCR using primers and TaqMan[®] probes presented in Table 1. The results are expressed as $2^{-\Delta\Delta C_T}$ mean \pm SD of three independent experiments (see Materials and methods), where 18S rRNA was used as an endogenous reference gene. * and ** show significant differences between MCF-7 and MDA-MB231 cells and the hTERT-HME1 control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Student's t-test). # and ## show significant difference between resistant VCREMS and DOXOR cells and their sensitive counterpart MCF-7 at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Student's t-test). (D) The ratio between *CDC25C5* and *CDC25C1* expressions was measured in MCF-7 cell line (control) and compared to its resistant counterpart cell lines VCREMS and DOXOR. The $2^{-\Delta\Delta C_T} C5 / 2^{-\Delta\Delta C_T} C1$ ratio is significantly increased in the resistant cells (* $p < 0.05$).

with previous studies (16, 19, 24, 25, 35). Interestingly, *CDC25B1* and *CDC25B4* are expressed at a quite high level in all mammary cell lines tested, although they were previously reported as rare transcripts in other types of cell lines and tissues (16, 19, 25, 35), suggesting that they may have some specific function in breast tissue. Moreover, in the present study, global *CDC25C* expression is constant between all cell lines, whereas splicing profiles are rather divergent. Full length *CDC25C1* and the alternative spliced *CDC25C5* variant are the most abundant transcripts in mammary cell lines, in agreement with previous studies (21, 23). It is worth noting that additional *CDC25C* variants (*CDC25C6-10*) were identified recently in myelodysplastic syndromes (37). Nevertheless, these variants seem to be expressed specifically in this type of malignancy, since they were not detected in previous studies as well as in our study, despite the use of the same RT-PCR primers.

In this study, we were particularly interested in the possible implication of *CDC25* splice variants in multidrug resistance development. qRT-PCR assays showed that *CDC25A2* variant, even if less expressed than *CDC25A1*, is up-regulated in drug-resistant VCREMS and DOXOR cell lines compared to their sensitive counterpart MCF-7 and could therefore be

associated with the resistance phenotype of these cells. Exon 6 is skipped in *CDC25A2* and the consequence of such a deletion is still unknown. However, this sequence contains multiple regulatory sites including a Chk1 phosphorylation site (Ser178) leading to cytoplasmic sequestration of *CDC25A* protein by interaction with 14-3-3 protein (38). The absence of this site could increase *CDC25A2* oncogenic potential. Moreover, we observed that *CDC25B2* is highly over-expressed in the vincristine-resistant VCREMS cell line. Strikingly, doxorubicin-resistant DOXOR cells showed completely opposite results probably due to the distinct mode of resistance acquisition between these two cell lines (30, 32). Over-expression of this transcript was previously found in poorly differentiated colorectal carcinomas and in aggressive non-Hodgkin's lymphomas (16, 19). Interestingly, in fission yeast, *CDC25B2* is more efficient as an inducer of mitosis compared to *CDC25B3* and *CDC25B1* (24). In fact, *CDC25B2* is very stable throughout mitosis because it lacks the KEN box motif (exon 6a) recognized by the APC/C^{cdh1} ubiquitin ligase complex and leading to the proteasome-mediated degradation of the protein (39). Finally, *CDC25C* showed the most important particularities in resistant cells, i.e., a down-regulation of *CDC25C1* and an up-regulation of *CDC25C5*

and *CDC25C4* variants. At the protein level, these last variants encompass 15 unique amino acids (23) corresponding to a putative CDK phosphorylation site. The role of this sequence is unknown, but it could be involved in drug-resistant phenotypes. Additionally, *CDC25C3* level is up-regulated only in the DOXOR cell line. This transcript gives rise to a protein lacking the phosphatase activity, whose function is still unknown. Interestingly, the two-fold increase of the *CDC25C5/C1* ratio observed by qRT-PCR in the two resistant cell lines relative to their sensitive counterpart can be considered as a more significant resistance marker than each *CDC25C* variant expression taken separately. The up-regulation of the alternatively spliced *CDC25C5* mRNA was already reported in prostate cancer in correlation with biochemical recurrence (21). This correlates with the increased uncoupling of mitosis from DNA replication observed with *CDC25C5* compared to *CDC25C1* (26). Therefore, the expression of the *CDC25C5* variant could potentially result in genomic instability and thus facilitate the emergence of more aggressive diseases, perhaps through poor regulation of its activity. Finally, these observations may call into question the lack of oncogenic potential reported for *CDC25C* (9). In the future, the oncogenic potential of *CDC25C* should be evaluated considering each splice variant separately.

Breast cancer is the most frequent malignant tumor in women and, despite extensive progress in the clinical outcome of this disease, it still remains imperative to identify new powerful molecular biomarkers. In this context, splice variants have emerged as a novel source for clinical diagnostic and prognostic strategies (28). For instance, Venables et al. (40) analyzed the alternative splicing profiles of 600 cancer-associated genes and identified 41 alternative splicing events significantly different between normal breast tissues and breast tumors. Five of them allowed classification of tumors according to their histopathologic grade. One of the best known cancer-related genes whose alternative splicing is of particular importance in cancer is the *CD44* gene, coding for a transmembrane protein involved in cell–cell adhesion. For example, *CD44v6* over-expression was shown to correlate with a higher grade in gastric cancer and with a lower survival rate for the patients (28), suggesting that *CD44* variants may be useful cancer biomarkers.

On the basis of these observations and the inconsistencies between studies discussed above concerning *CDC25* expression and its correlation with clinical features, the consideration of *CDC25* alternative splicing will probably improve their clinical interest. Indeed, the present study demonstrates the limitation of analyzing *CDC25* expression without considering its alternative splicing, since we showed that *CDC25* splice variants mRNA are differentially expressed in breast cancer cell lines. Particularly, our data suggest that *CDC25A2* and *CDC25B2* variants and an increased *CDC25C5/C1* ratio may be associated to multidrug-resistance development in cancer cells. Thanks to the experimental assays developed in the present study, we are currently evaluating *CDC25* splice variants expression in primary mammary tumors. If the preferential expression of certain *CDC25* variants was confirmed, it could highlight the potential interest

of these splice variants as new biomarkers for the diagnosis and prognosis of breast cancer, in addition to other markers routinely used in clinical practice. These results could also pave the way for new personalized therapeutic options for breast cancer based on the selective inhibition of the relevant *CDC25* splice variants implicated.

Acknowledgments

H.A. is recipient of a fellowship from the French Ministry of Research. This work was supported in part by the Ligue Contre le Cancer. We gratefully acknowledge Inês Coelho for technical support. This article is based on a contribution presented at the Fifth Santorini Conference Biologie Prospective 2010, Santorini, Greece, Sep 30–Oct 2, 2010.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article. Research support played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

References

1. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009;9:153–66.
2. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 2007;7:495–507.
3. Karlsson-Rosenthal C, Millar JB. Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol* 2006;16:285–92.
4. Aressy B, Ducommun B. Cell cycle control by the CDC25 phosphatases. *Anticancer Agents Med Chem* 2008;8:18–24.
5. Jinno S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, et al. CDC25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J* 1994;13:1549–56.
6. Lammer C, Wagerer S, Saffrich R, Mertens D, Ansoerge W, Hoffmann I. The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Sci* 1998;111:2445–53.
7. Millar JB, Blevitt J, Gerace L, Sadhu K, Featherstone C, Russell P. p55 cdc25 is a nuclear phosphorylation required for the initiation of mitosis in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10500–4.
8. Boutros R, Dozier C, Ducommun B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:185–91.
9. Galaktionov K, Lee AK, Eckstein J, Draetta G, Meekler J, Loda M, et al. Cdc25 phosphatases as potential human oncogenes. *Science* 1995;269:1575–7.
10. Cangi MG, Cukor B, Soung P, Signoretti S, Moreira GJ, Ranshinge M, et al. Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer. *J Clin Invest* 2000;106:753–61.

11. Ito Y, Yoshida H, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kuma K, et al. Expression of cdc25A and cdc25B phosphatase in breast carcinoma. *Breast Cancer* 2004;11:295–300.
12. Bonin S, Brunetti D, Benedetti E, Gorji N, Stanta G. Expression of cyclin-dependent kinases and CDC25a phosphatase is related with recurrences and survival in women with peri- and postmenopausal breast cancer. *Virchows Arch* 2006;448:539–44.
13. Königsberg R, Rögelsperger O, Jäger W, Thalhammer T, Klimpfänger M, De Santis M, et al. Cell cycle dysregulation influences survival in high risk breast cancer patients. *Cancer Invest* 2008;26:734–40.
14. Mehdipour P, Pirouzpanah S, Sarafnejad A, Atri M, Shahrestani ST, Haidari M. Prognostic implication of CDC25A and cyclin E expression on primary breast cancer patients. *Cell Biol Int* 2009;33:1050–6.
15. Broggin M, Buraggi G, Brenna A, Riva L, Codegoni AM, Torri V, et al. Cell cycle-related phosphatases CDC25A and B expression correlates with survival in ovarian cancer patients. *Anti-cancer Res* 2000;20:4835–40.
16. Hernández S, Bessa X, Beà S, Hernández L, Nadal A, Mallofré C, et al. Differential expression of cdc25 cell-cycle activating phosphatases in human colorectal carcinoma. *Lab Invest* 2001;81:465–73.
17. Nishioka K, Doki Y, Shiozaki H, Yamamoto H, Tamura S, Yasuda T, et al. Clinical significance of CDC25A and CDC25B expression in squamous cell carcinomas of the oesophagus. *Br J Cancer* 2001;85:412–21.
18. Wu W, Fan YH, Kemp BL, Walsh G, Mao L. Overexpression of cdc25A and cdc25B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is not associated with overexpression of c-myc1. *Cancer Res* 1998;58:4082–5.
19. Hernández S, Hernández L, Beà S, Pinyol M, Nayach I, Bellosillo B, et al. Cdc25A and the splicing variant cdc25B2, but not cdc25B1, -B3 or -C, are over-expressed in aggressive human non-Hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 2000;89:148–52.
20. Kristjánisdóttir K, Rudolph J. Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem Biol* 2004;11:1043–51.
21. Ozen M, Ittmann M. Increased expression and activity of CDC25C phosphatase and an alternatively spliced variant in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:4701–6.
22. Wang Z, Trope CG, Florenes VA, Suo Z, Nesland JM, Holm R. Overexpression of CDC25B, CDC25C and phospho-CDC25C (Ser216) in vulvar squamous cell carcinomas are associated with malignant features and aggressive cancer phenotypes. *BMC Cancer* 2010;10:233.
23. Wegener S, Hampe W, Herrmann D, Schaller HC. Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C. *Eur J Cell Biol* 2000;79:810–5.
24. Baldin V, Cans C, Superti-Furga G, Ducommun B. Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? *Oncogene* 1997;14:2485–95.
25. Forrest AR, McCormack AK, DeSouza CP, Sinnamon JM, Tonks ID, Hayward NK, et al. Multiple splicing variants of cdc25B regulate G2/M progression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:510–5.
26. Bureik M, Rief N, Drescher R, Jungbluth A, Montenarh M, Wagner P. An additional transcript of the cdc25C gene from A431 cells encodes a functional protein. *Int J Oncol* 2000;17:1251–8.
27. Venables JP, Klinck R, Koh C, Gervais-Bird J, Bramard A, Inkel L, et al. Cancer-associated regulation of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16:670–7.
28. Brinkman BM. Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem* 2004;37:584–94.
29. Soule HD, Vasquez J, Long A, Albert S, Brennan MA. Human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer I* 1973;51:1409–16.
30. Whelan RD, Waring CJ, Wolf CR, Hayes JD, Hosking LK, Hill BT. Overexpression of p-glycoprotein and glutathione S-transferase pi in MCF-7 cells selected for vincristine resistance in vitro. *Int J Cancer* 1992;52:241–6.
31. Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer I* 1974;53:661–74.
32. Batist G, Tulpule A, Sinha BK, Katki AG, Myers CE, Cowan KH. Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1986;261:15544–9.
33. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–8.
34. Gasparotto D, Maestro R, Piccinin S, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S, et al. Overexpression of CDC25A and CDC25B in head and neck cancers. *Cancer Res* 1997;57:2366–8.
35. Guo J, Kleeff J, Li J, Ding J, Hammer J, Zhao Y, et al. Expression and functional significance of CDC25B in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2004;23:71–81.
36. Tsuda H, Hashiguchi Y, Inoue T, Yamamoto K. Alteration of G2 cell cycle regulators occurs during carcinogenesis of the endometrium. *Oncology* 2003;65:159–66.
37. Caudill JS, Porcher JC, Steensma DP. Aberrant pre-mRNA splicing of a highly conserved cell cycle regulator, CDC25C, in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Lymphoma* 2008;49:989–93.
38. Chen MS, Ryan CE, Piwnicka-Worms H. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol* 2003;23:7488–97.
39. Kieffer I, Lorenzo C, Dozier C, Schmitt E, Ducommun B. Differential mitotic degradation of the CDC25B phosphatase variants. *Oncogene* 2007;26:7847–58.
40. Venables J, Klinck R, Bramard A, Inkel L, Dufresne-Martin G, Koh C, et al. Identification of alternative splicing markers for breast cancer. *Cancer Res* 2008;68:9525–31.

ARTICLE 2.

Soumis à *Biology of the Cell*.

Genotoxic stress modulates CDC25C phosphatase alternative splicing in human breast cancer cell lines

Hélène Albert*, Eric Battaglia*, Carolino Monteiro^{‡§} and Denyse Bagrel*¹

*Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique, EA 3940, FR CNRS 2843, Université Paul Verlaine-Metz, Metz, France. [‡] Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal. [§] CIMAGO, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

Running title: Modulation of CDC25C alternative splicing by genotoxic stress

¹Correspondence may be addressed to this author at LIMBP, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 METZ. Tel.: +33 3 87 37 84 04; Fax: +33 3 87 37 84 23.

E-mail address: bagrel@univ-metz.fr

Key words: alternative splicing, breast cancer cells, CDC25 phosphatases, doxorubicin, genotoxic stress

Abbreviations used: ATM, ataxia telangiectasia-mutated; ATR, ATM- and Rad3-related; CDC25, cell division cycle 25; CDK, cyclin-dependent kinase; CHK, checkpoint kinase; CPT, camptothecin; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DNA-PKcs, DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit; Dox, doxorubicin; DSB, double strand breaks; Eto, etoposide; hnRNP, heterogeneous ribonucleoproteins; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; PFT- α , pifithrin- α ; siRNA, small interfering RNA; SR, ser/arg rich protein; *t*-BOOH, *tert*-butyl hydroperoxide.

Abstract

Background information. CDC25 (cell division cycle 25) phosphatases are essential for cell cycle control under normal conditions and in response to DNA damage. They are represented by three isoforms, CDC25A, B and C, each of them being submitted to an alternative splicing mechanism. Alternative splicing of many genes is affected in response to genotoxic stress, but the impact of such a stress on CDC25 splicing has never been investigated.

Results. In this study, we demonstrate that genotoxic agents (doxorubicin, camptothecin, etoposide, cisplatin and *tert*-butyl hydroperoxide), alter the balance between CDC25C splice variants in human breast cancer cell lines both at the mRNA and protein levels. This modulation occurs during the early response to sub-lethal DNA damage. We also show that the CDC25C splice variants expression shift induced by a genotoxic stress is dependent on the ATM/ATR signaling but not on p53.

Conclusions. Our results highlights the modulation of CDC25C alternative splicing as an additional regulatory event involved in cellular response to DNA damage in breast cancer cells.

Introduction

CDC25 (cell division cycle 25) phosphatases play a critical role in the eukaryotic cell cycle progression during normal cell division and checkpoint response following DNA damage (Karlsson-Rosenthal and Millar, 2006; Boutros et al., 2007). They allow the activation of cyclin/cyclin-dependent kinases (CDK) complexes by dephosphorylating the Thr14 and Tyr15 residues located in the ATP binding site of CDK. In humans, CDC25 belong to a multigene family consisting of three isoforms: CDC25A, CDC25B and CDC25C. CDC25A appears to be preferentially required during the G₁/S transition (Jinno et al., 1994), whereas CDC25B and CDC25C are essentially involved in the entry into mitosis (Millar et al., 1991; Lammer et al., 1998). However, recent evidences suggest that all CDC25 isoforms can regulate both G₁/S and G₂/M transitions (Boutros et al., 2006). In order to assure a controlled progression through each cell cycle phase and thus maintain genomic integrity, a tight regulation of CDC25 phosphatases activity is needed, both in unperturbed cell cycle and in response to DNA damage checkpoints. This regulation depends upon post-translational mechanisms such as phosphorylations, sub-cellular relocalization and proteasome-mediated degradation (Aressy and Ducommun, 2008), together with p53-dependent transcriptional repression of the three CDC25 isoforms (St Clair et al., 2004; Demidova et al., 2009; Dalvai et al., 2011).

Overexpression of CDC25A and CDC25B was reported in a wide variety of human malignancies including breast cancer and was commonly associated with both tumor aggressiveness and poor prognosis for the patients (Kristjánsson and Rudolph, 2004). With regard to CDC25C, only a few studies showed an overexpression of this isoform in cancers (Hernández et al., 2001; Ozen and Ittmann, 2005; Wang et al., 2010). However, growing evidences suggest that the overexpression of CDC25C could be underrated because of the non-consideration of its alternative splicing (Kristjánsson and Rudolph, 2004; Albert et al., 2011).

In fact, all *CDC25* genes generate several transcripts from an alternative splicing mechanism: at least two variants were identified so far for *CDC25A* (Wegener et al., 2000) and five for *CDC25B* (Baldin et al., 1997; Forrest et al., 1999) and *CDC25C* (Bureik et al., 2000; Wegener et al., 2000) (Figure 1A). Although the knowledge is so far limited concerning the role of each CDC25 splice variant, it appears that some variants are preferentially up-regulated in cancers. For instance, *CDC25B3* variant was found to be overexpressed in pancreatic cancer (Guo et al., 2004), whereas *CDC25B2* variant overexpression is correlated with the grade of differentiation in colorectal cancer (Hernández et al., 2001) and with tumor aggressiveness in non-Hodgkin's lymphoma (Hernández et al., 2000). Interestingly, this last variant possesses a higher activity in fission yeast (Baldin et al., 1997) and is more stable during mitosis than other CDC25B isoforms (Kieffer et al., 2007). Additionally, *CDC25C5* mRNA level is increased in prostate cancer in correlation with prostate-specific antigen recurrence (Ozen et Ittmann, 2005).

Alternative splicing is an essential mechanism contributing to proteome diversity. Indeed, a recent study revealed that more than 90% of human genes may undergo alternative splicing (Wang et al., 2008a). It is now clear that it contributes with transcriptional regulation to the control of gene expression in various conditions (Chen and Manley, 2009). Interestingly, alteration of splicing events has been reported in a variety of diseases, including cancer (Pajares et al., 2007). In cancer cells, this alteration leads to the apparition of new transcripts or to the modification of the ratio between normally existing splice variants which can potentially play a role in tumor progression. In addition, alternative splicing of many genes is modulated in response to cellular stresses such as oxidative stress, heat shock or hypoxia (Biamonti and Caceres, 2009). Particularly, a growing number of studies highlight the crucial role of alternative splicing in response to genotoxic stress (Busà and Sette, 2010). Of particular interest is the effect of DNA-damaging agents and irradiations on the splicing of genes involved in cellular processes as essential as apoptosis (*caspase-2*, *Bcl-x*) (Solier et al., 2004; Shkreta et al., 2010), cell motility (*CD44*) (Filippov et al., 2007) and cell cycle control (*cyclin D1*, *MDM2* and *MDM4*) (Chandler et al., 2006; Lents et al., 2008; Wang et al., 2008b)

While the transcriptional and post-translational regulation of CDC25 in response to DNA damage has been widely investigated, the impact of genotoxic stress on CDC25 phosphatases alternative splicing has never been reported to our knowledge. In this study, we show that various genotoxic agents, namely doxorubicin, camptothecin, etoposide, cisplatin and *tert*-butyl hydroperoxide, are able to alter the ratio between CDC25C splice variants in human breast cancer cell lines. This regulation only occurs in condition of mild DNA damage, is associated to a cell cycle arrest, and disappears at

the onset of apoptosis. Moreover, part of the signaling pathway mediating CDC25C splicing modulation was elucidated. Our results provide new insights concerning the variety of regulation events involved in cellular response to DNA damage.

Results

Doxorubicin alters CDC25C alternative splicing in human breast cancer cell lines

To test the hypothesis that a genotoxic stress could modify the alternative splicing pattern of CDC25, we first chose to examine the effect of the DNA damage-inducing agent doxorubicin (Dox), an anthracycline commonly used in breast cancer chemotherapy (Kaklamani and Gradishar, 2005). The human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells were treated with 1 μ M of doxorubicin, a dose corresponding to the IC₅₀ at 24 h of treatment (concentration of drug reducing the cell growth by 50% compared to the control, determined by a MTT test, data not shown). The levels of CDC25 alternatively spliced transcripts were then analyzed by semi-quantitative RT-PCR using primers surrounding the region submitted to alternative splicing and generating amplicons of different length for each CDC25 variant (Figure 1A). These primers recognize all CDC25 splice variants currently known, except CDC25B5. CDC25A and CDC25B splicing profiles were not modified following treatment with Dox, although the global transcription level of CDC25A was decreased as reported previously (Demidova et al., 2009) (Figure 1B). Interestingly, Dox induced an up-regulation of the shortest CDC25C5 splice variant accompanied by a down-regulation of the full-length CDC25C1 variant (Figure 1B). These observations were confirmed by Real-Time quantitative RT-PCR experiments showing an increase of the CDC25C5/C1 ratio reaching a maximal value of 17-fold at 24 h post-treatment (Figure 1C). Using an antibody directed against a domain constant in all CDC25C variants (C-terminal domain), we were able to distinguish CDC25C1 and C5 proteins on the basis of their molecular weight differences (Figure 1D). Other CDC25C variants were not detected by immunoblotting, probably due to their too low level of expression. Consistent with mRNA results, doxorubicin also induced a modification of the CDC25C5/C1 ratio at the protein level, with a reduction of CDC25C1 and an increase in the expression of the CDC25C5 isoform.

Interestingly, the same alteration of CDC25C splicing was also observed in the MCF-7-derived multidrug-resistant cell line Vcr-R treated with Dox (Figure 1E).

Modulation of CDC25C splicing is involved in the early response to DNA damage induced by doxorubicin

In order to decipher the link between CDC25C splicing modulation induced by doxorubicin and the DNA damage pathway, we first chose to compare the effect of a sub-lethal dose of Dox (1 μ M) to that of a higher dose of this drug (5 μ M). As shown in Figure 2A, CDC25C splicing modulation is substantially less pronounced, both at mRNA and protein levels, for the highest dose of Dox. We considered the possibility that this observation could be linked to differences in the severity of DNA insult induced by the two doses of Dox. To address this hypothesis, we evaluated the phosphorylation of the histone H2AX (γ -H2AX), a selective and sensitive marker of DNA damage, especially of DNA double strand breaks (DSB) (Mah et al., 2010). Indeed, in the course of DNA damage response, key effectors such as ATM (ataxia telangiectasia-mutated) and ATR (ATM- and Rad3-related) kinases and DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit) catalyze the phosphorylation of the histone H2AX on Ser139 which leads to subsequent formation of γ -H2AX foci at the DSB sites, essential for the assembly of the repair machinery and for the transduction of DNA damage signals (Mah et al., 2010). Immunoblot analysis showed an induction of γ -H2AX with 5 μ M of Dox starting from 12 h of treatment (Figure 2B). To study the possibility of a lower induction of DNA damage with 1 μ M of Dox that could not be detected by immunoblotting, we used immunofluorescence detection as a more sensitive method. In this context, the intrinsic fluorescence of Dox had to be taken into account. Control images without anti- γ -H2AX antibody incubation showed orange-brown cells characteristic of the overflow of the red fluorescence of Dox in the green channel used for FITC detection (data not shown). Nevertheless, this fluorescence overlap could be set aside, since the own fluorescence of Dox can be clearly distinguished from that of γ -H2AX staining (green). Figure 2C shows the presence of γ -H2AX foci in cells treated with Dox during 12 h, the fluorescence intensity of

which increasing with drug concentration. After 24 h of treatment, cells with punctuated γ -H2AX foci were still present, but also accompanied by cells with a diffuse staining, which was brighter with 5 μ M of Dox (Figure 2C). Altogether, these observations indicate that the formation of DSB depends upon treatment time and drug concentration.

Depending on the nature and the intensity of the DNA injury, the DNA damage checkpoint signaling leads either to a cell cycle arrest in order to allow time for the cell to repair its DNA or to the initiation of apoptosis if the repair fails (Jackson and Bartek, 2009). Activation of the checkpoint pathway in MCF-7 cells was confirmed by the induction of the p53 protein for both doses of Dox (Figure 2B). However, the consequence of this activation differs according to the drug concentration. On the one hand, in MCF-7 cells treated with 1 μ M of Dox, the expression of the cell cycle inhibitor p21 is induced (Figure 2B) in association with a blockage in the G₂/M phase of the cell cycle (Figure 2D), whereas in presence of 5 μ M of Dox, no induction of p21 was observed (Figure 2B), which correlates with a more limited cell cycle arrest (Figure 2D). On the other hand, apoptosis is induced only with the highest dose of Dox as seen by the cleavage of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (Figure 2E). Altogether, these results suggest that the regulation of CDC25C splicing occurs during the early response to sub-lethal DNA damage induced by doxorubicin.

Alteration of CDC25C splicing by doxorubicin is dependent of ATM/ATR kinases and independent of p53

Because *CDC25C* is regulated at the transcriptional level by p53 in response to DNA damage (St Clair et al., 2004) and transcription and splicing are two mechanisms closely connected (Chen and Manley, 2009), we asked whether the regulation of CDC25C splicing required a functional p53. In this context, we treated MCF-7 cells (with a wild-type p53) with pifithrin- α (PFT- α), a pharmacological inhibitor of p53 transcriptional activity (Komarov et al., 1999). The inhibition of p53 activity was confirmed by the decrease of p21 induction, a well-identified p53 target gene (Figure 3A). In addition, to further define the contribution of p53 in the CDC25C splicing, we used the p53-mutated breast cancer cell line MDA-MB231 (Bartek et al., 1990). The lack of p53 activity did not prevent the increase of the CDC25C5/C1 ratio after Dox treatment (Figures 3A and 3C), suggesting that the modulation of CDC25C splicing induced by DNA damage is a p53-independent mechanism.

Upstream of p53 in the checkpoint signaling pathway, ATM and ATR kinases play a crucial role in the response to DNA damage. They are known to activate CHK1 and CHK2 kinases, responsible for CDC25A proteasome-mediated degradation and CDC25B and CDC25C cytoplasmic sequestration (Karlsson-Rosenthal and Millar, 2006). Therefore, we asked if ATM/ATR kinases were also able to affect CDC25C splicing following a treatment with Dox. For this purpose, MCF-7 cells were treated with caffeine, a well-known inhibitor of both ATM and ATR kinases activities (Sarkaria et al., 1999). To ensure that caffeine effectively inhibited ATM and ATR kinases, we performed immunoblot analyses and observed the expected decrease of p53 and p21 induction after Dox treatment (Figure 3B). Interestingly, the changes in CDC25C alternative splicing induced by Dox were reversed in the presence of caffeine (at both RNA and protein levels), indicating that this regulation process is dependent on the ATM/ATR signaling pathway.

Modulation of CDC25C alternative splicing by other DNA-damaging agents

To confirm the association between CDC25C splicing modulation and the DNA damage response pathway, MCF-7 cells were also treated with other genotoxic agents, all of them used at a concentration corresponding to the IC₅₀ for 24 h of treatment (determined by a MTT test, data not shown). Camptothecin (CPT) and etoposide (Eto), which respectively inhibit DNA topoisomerase I and II, induce the formation of DNA breaks as seen by γ -H2AX staining and activation of the p53/p21 checkpoint pathway (Figure 4A and B). Moreover, these drugs provoked the same increase of CDC25C5/C1 ratio than that observed with Dox (Figure 4A and B). A similar effect on CDC25C alternative splicing was obtained with the DNA intercalating agent cisplatin (Figure 4C). Conversely, CDC25C splicing was not affected by the anti-microtubule drug vinblastin which, as expected, did not affect DNA integrity (Figure 4C). As oxidative stress is known to generate DNA lesions (Barzilai and Yamamoto, 2004), we also tested hydrogen peroxide (H₂O₂) and *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) as potential modulators of CDC25C splicing. Although both compounds lead to γ -H2AX foci formation, they apparently induced DNA damage response pathways somehow distinct from those

induced by the previous drugs, since p53 protein level was not increased (Figure 4D). Surprisingly, *t*-BOOH affected CDC25C splicing, whereas H₂O₂ did not (Figure 4D). Although this matter was not investigated in the present study, this discrepancy may be due to differences in the influx, lability or intracellular localization of these two structurally distinct peroxides.

Finally, it is worth noting that all these compounds, as previously indicated in the case of Dox, did not induce a modification of CDC25A and CDC25B alternative splicing (data not shown).

Discussion

CDC25 phosphatases are key players of cell cycle progression. Moreover, they are tightly regulated in response to DNA damage, both by p53-mediated transcriptional repression of the three CDC25 isoforms (St Clair et al., 2004; Demidova et al., 2009; Dalvai et al., 2011) and by post-translational processes involving CDC25A proteasome-dependent degradation and cytoplasmic sequestration of CDC25B and CDC25C through interaction with 14-3-3 proteins (Karlsson-Rosenthal and Millar, 2006). Additionally to these regulation events, we provide here the first evidence for the alteration in CDC25C alternative splicing under conditions of genotoxic stress. Indeed, we showed that CDC25C5 splice variant is up-regulated to the detriment of CDC25C1, both at mRNA and protein levels, following treatment of MCF-7 mammary adenocarcinoma cell line with low doses of various DNA-damaging agents such as the DNA topoisomerase inhibitors doxorubicin, camptothecin and etoposide, the DNA-intercalating drug cisplatin and the oxidative stress inducing agent *tert*-butyl hydroperoxide. Our results indicate that this regulation is dependent upon double-strand breaks as all compounds affecting CDC25C alternative splicing also induce the formation of γ -H2AX foci. Conversely, CDC25A and CDC25B alternative splicing is not affected in these conditions, suggesting that the pathways involved in the regulation of the three CDC25 isoforms splicing are distinct. A growing number of recent studies showed the existence of a link between the DNA damage response and the modification of alternative splicing of several genes involved, among others, in cell cycle control such as *cyclin D1*, *MDM2* and *MDM4* (Chandler et al., 2006; Lents et al., 2008; Markey and Berberich, 2008; Wang et al., 2008b) and in apoptosis such as *caspase-2*, *Bcl-x* and *Fas* (Solier et al., 2004; Filippov et al., 2008; Shkreta et al., 2010), suggesting that splicing associated to cell proliferation and death may be disrupted in cells subjected to a genotoxic stress.

Despite an increasing interest in the alternative splicing regulation following DNA damage, the mechanisms underlying this process are yet poorly understood. In order to start to understand the molecular mechanisms engaged in CDC25C splicing modulation, we treated MCF-7 cells with the p53 transcriptional activity inhibitor pifithrin- α and used the MDA-MB231 breast cancer cell line with a mutated-p53 to evaluate the contribution of p53 in CDC25C splicing modifications induced by doxorubicin. Since a CDC25C splice variants expression shift was still observed in these conditions, we concluded that this event is controlled independently of p53, unlike CDC25C transcriptional repression (St Clair et al., 2004). Additionally, we inferred that CDC25C splicing modulation induced by doxorubicin is dependent on ATM and ATR kinase activities since turning off these pathways with caffeine reversed this process. Several studies showed that cancerous cells are able to use different ways to modify alternative pre-mRNA splicing in order to deal with DNA injuries. It has been proposed that genotoxic stress can decrease the rate of transcription via RNA polymerase II phosphorylation (Muñoz et al., 2009) and can also alter the communication between transcription and splicing machineries (Dutertre et al., 2010), both events resulting in increased exon skipping. Moreover, recent evidences suggest that DNA damage-inducing agents can affect the chromatin structure by acetylation, thereby making some domains more accessible for the splicing machinery (Busà and Sette, 2010). Finally, the activation of signaling pathways in response to various stress conditions may lead to phosphorylation of splicing factors such as hnRNP (heterogeneous ribonucleoproteins) and SR (ser/arg rich) proteins, thereby modifying their activity, sub-cellular localization or interaction with proteins (Biamonti and Caceres, 2009). Few studies have identified the nature of splicing factors able to triggering the alternative splicing of certain genes following DNA damage. For instance, Filippov et al showed that treatment with the genotoxic agent mitomycin C induces the expression of the SRp55 splicing factor in association with a shift in the splicing pattern of genes encoding the CD44 receptor, the mda7/IL24 cytokine and the KSR1 and ZAK kinases (Filippov et al., 2007, 2008). The splicing factors eventually implicated in CDC25C splicing regulation in

response to genotoxic stress remain to be identified. However, according to our results, they might be downstream effectors of the ATM/ATR pathway. In agreement with this assumption, a large-scale proteomic screen identified numerous splicing factors as ATM/ATR phosphorylation targets (Matsuoka et al., 2007).

At this stage, the consequence of CDC25C splicing disruption on cell survival following treatment with genotoxic agents can only be speculated. In this study, we showed that the modification of CDC25C splicing pattern appears to occur in the early response to sub-lethal DNA damage. Indeed, treatment of MCF-7 cells with a low dose of doxorubicin (1 μ M), inducing mild DNA damage as observed by the weak γ -H2AX staining, induced an increase of CDC25C5/C1 ratio in association with a cell cycle arrest. This effect was less pronounced with a strong genotoxic, pro-apoptotic dose of doxorubicin (5 μ M) inducing PARP cleavage, suggesting that the regulation of CDC25C splicing occurs prior to the onset of apoptosis. While the main response to cytotoxic drugs consists in the activation of death pathways, this effect can be attenuated by the simultaneous induction of protective mechanisms. For instance, splicing modulation of *caspase-2* pre-mRNA in response to topoisomerases inhibitors leads to the up-regulation of the anti-apoptotic short *caspase-2* transcript (Solier et al., 2004) and the modification of Fas receptor splicing profile induced by mitomycin C results in an enrichment of the anti-apoptotic soluble Fas isoform (Filippov et al., 2008). These observations together with our results reasonably suggest that the increase of CDC25C5/C1 ratio could help the cells to withstand apoptosis induced by a moderate genotoxic stress. This assumption is reinforced by the existence of the same CDC25C splicing modulation induced by doxorubicin in the multidrug-resistant Vcr-R cell line. Additionally, we previously showed that CDC25C5/C1 transcripts ratio was higher in the drug-resistant Vcr-R and Adr-R cells compared to their sensitive counterpart MCF-7 in non-stressing conditions (Albert et al., 2011). Coincidentally, overexpression of CDC25C5 splice variant has been reported in prostate cancer and correlates with biochemical (prostate-specific antigen) recurrence (Ozen et al., 2005). It was also observed that this alternative spliced variant increases uncoupling of mitosis to DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe* compared to CDC25C1 full-length variant (Bureik et al., 2000) and this feature could be linked to the absence in the CDC25C5 variant of the KEN box, a motif responsible for CDC25 ubiquitin-mediated degradation (Chen et al., 2002). Intriguingly, Varmeh and Manfredi showed that adenovirus-mediated overexpression of CDC25C sensitizes cells to doxorubicin-induced apoptosis (Varmeh and Manfredi, 2008). However, this study was most likely performed with the CDC25C1 isoform. It will be of interest to similarly evaluate the effect of the overexpression of the CDC25C5 isoform, considering that CDC25C1 and CDC25C5 variants may have distinct or even antagonistic functions.

In conclusion, this study highlights a higher level of complexity in the regulation of CDC25C gene expression in response to DNA damage, namely the modulation of its alternative splicing, in addition to its well-known transcriptional and post-translational regulations. Further studies are needed to elucidate the exact mechanism by which CDC25C alternative splicing is modulated and the significance of this event in relation to cellular resistance towards genotoxic stress. However, we can already hypothesize that the increased CDC25C5/C1 ratio may limit the anti-tumoral effect of DNA-damaging chemotherapeutic agents (doxorubicin, etoposide, cisplatin...). In this regard, the overexpression of CDC25C5 variant observed in some cancers could be partially responsible for therapeutic failures. If this hypothesis was confirmed, it would be interesting to design original therapeutic approaches based on the selective inhibition of CDC25C5, either directly by siRNA (small interfering RNA) or indirectly by preventing the modulation of CDC25C alternative splicing, to circumvent this resistance mechanism.

Materials and methods

Drugs and materials

Doxorubicin, pifithrin- α , caffeine, camptothecin, etoposide, cisplatin, vinblastin, propidium iodide and 4',6-diamidino-2-phenylindole were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Hydrogen peroxide and *tert*-butyl hydroperoxide were provided by Acros (Fisher Scientific, Illkirch, France).

Cell culture conditions and drug treatment

MCF-7 (ECACC, Salisbury, UK, 86012803) (Soule et al., 1973), Vcr-R (Whelan et al., 1992) and MDA-MB231 (ATCC, Manassas, USA, HTB-26) (Cailleau et al., 1974) cell lines were grown in RPMI-1640 medium (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 100 UI/mL penicillin/100 µg/mL streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Cells were seeded at a density of 1.10⁶ in 100-mm Petri dishes and allowed to attach for 24 h. Cells were then exposed to the different drugs as described in each figure legend.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was extracted using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions. For subsequent quantitative RT-PCR experiments, genomic DNA was eliminated by a RNase-free DNase I treatment (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA was then quantified and checked for integrity by means of agarose gel electrophoresis. Reverse transcription was performed as described in (Albert et al., 2011).

Semi-quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis

PCRs were performed using the following primer pairs (see Figure 1A for localization): for *CDC25A* splice variants (Wegener et al., 2000) Av forward (Fw) 5'-GGGGACTGTCGCCTGTCACCAACCT-3' and Av reverse (Rv) 5'-GGGGTCTCCTCCTCATTCTTCAGATTC-3'; for *CDC25B* splice variants (Baldin et al., 1997) Bv Fw 5'-GCTTCCTCGCCGGTCACCAC-3' and Bv Rv 5'-CCTGCGGCTGGCCCACTC-3'; for *CDC25C* splice variants (Wegener et al., 2000) Cv Fw 5'-CTCCTGGAGAGAGACACTTCTTTAC-3' and Cv Rv 5'-CCACTTCTGCTCACCTTTGCTTCTTG-3'; and for *β-actin* as an internal control Fw 5'-GGACGACATGGAGAAAATCTGG-3' and Rv 5'-TGGATAGCAACGT ACATGGCTG-3'. Amplification conditions were as described in (Albert et al., 2011).

Real-Time quantitative RT-PCR

CDC25C1 and *C5* transcripts level was measured by Real-Time RT-PCR with the StepOne Plus System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using the following specific primers and TaqMan® probes (see Figure 1C for localization): *C1* Fw 5'-TGGGGAGATAACTGCCACTCA-3'; *C1* Rv 5'-AGAAGCTGTGCTGGGCTACATT-3'; *C5* Fw 5'-AGCATTTTGTCTGGGTACCTG-3'; *C5* Rv 5'-GTTTCCATTGTCATCCAGCTA-3'; and the *C1/C5* probe 5'-6FAM-ATTCTTCAGGACTTCAGGAAGTGCATT-TAMRA-3' for detection of both variants. Quantitative PCR (qPCR) reactions were performed using iTaq Supermix with ROX (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) as described in (Albert et al., 2011). 18S rRNA (Applied Biosystems) was used as an endogenous reference gene in each assay. *CDC25C5/C1* ratio was relatively quantified using the $2^{-\Delta C_T C5} / 2^{-\Delta C_T C1}$ expression where $\Delta C_T = (C_T \text{ target gene} - C_T \text{ 18S rRNA})$. Results were normalized to 1.0 in the non-treated control.

Protein extraction and immunoblotting

Cells were lysed in ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% SDS, 0.1% deoxycholate, 0.5% NP-40, 10% glycerol, supplemented with protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 mM NaF and 2 mM Na₂VO₄. Cells were then sonicated (2 x 5 sec) and harvested at 12,000 g for 15 min at 4°C. 50 µg of total proteins were separated on 8-14% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Immunoblotting was carried out following standard procedures using primary antibodies directed against CDC25C (1:200, sc-327), p53 (1:200, sc-6243), p21 (1:200, sc-6246) purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany), antibody specific of the 85 kDa cleaved-fragment of PARP (1:1000, 214/215, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and anti-γ-H2AX (1/2000, 05-636; Upstate/Millipore, Molsheim, France). The equal loading of the proteins was confirmed by probing with α-tubulin antibody (Sigma-Aldrich). Immunodetection was performed with horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies and Western Blotting Luminol (Santa Cruz). Densitometry of bands was analyzed using ChemiDoc™ (Bio-Rad). Relative protein expression in non-treated control was set to 1.0.

Immunofluorescence

Cells attached on glass coverslips were washed three times with cold PBS and fixed with 4% formaldehyde in PBS for 15 min at room temperature. Cells were then permeabilized and blocked with 0.1% Triton X-100 and 3% bovine serum albumin in PBS for 30 min at room temperature. The mouse anti- γ -H2AX primary antibody was diluted 1:500 and incubated overnight at 4°C prior incubation with Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated (1:100, Argene, Verniolle, France) or AlexaFluor 594-conjugated (1:500, Molecular Probes/Invitrogen) anti-mouse IgG for 1 h in the dark. Cells were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at 50 μ g/mL for 5 min, mounted in PermaFluor mounting medium (Immunon, Pittsburg, PA, USA) and visualized with a Nikon Eclipse 80i fluorescence microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France).

Cell cycle analysis

Floating and adherent treated cells were harvested by trypsinization, washed twice in PBS and fixed in ice-cold 70% ethanol at -20°C. The fixed cells were subsequently stained with a solution containing 50 μ g/mL propidium iodide, 0.1 mg/mL RNase I and 0.05% Triton X-100 for 20 min in the dark and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The percentage of cells in each phase of the cell cycle was determined using ModFit LT software (Verity software, Brush Prairie, WA, USA).

Statistical analysis

All semi-quantitative RT-PCR and immunoblot analyses presented are representatives of at least three independent experiments giving similar results. For quantitative RT-PCR and cell cycle analyses, data are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test. Differences between treatment and control were considered as statistically significant for a *p* value < 0.05.

Author contribution

All authors participated in the conception of this study and in the interpretation of data. Hélène Albert performed all experiments and wrote the first draft of the manuscript. Other authors contributed to the final manuscript.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Susana Santos for helpful discussion.

Funding

This work was supported in part by the Ligue Contre le Cancer (committee 57). H.A. is recipient of a fellowship from the French Ministry of Research.

References

- Albert, H., Santos, S., Battaglia, E., Brito, M., Monteiro, C. and Bagrel, D. (2011) Differential expression of CDC25 phosphatases splice variants in human breast cancer cells. *Clin. Chem. Lab. Med.* 10.1515.CCLM.2011.635
- Aressy, B. and Ducommun, B. (2008) Cell cycle control by the CDC25 phosphatases. *Anticancer Agents Med. Chem.* **8**, 818-824
- Baldin, V., Cans, C., Superti-Furga, G. and Ducommun, B. (1997) Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? *Oncogene* **14**, 2485-2495
- Bartek, J., Iggo, R., Gannon, J. and Lane, D.P. (1990) Genetic and immochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* **5**, 893-899
- Barzilai, A. and Yamamoto, K. (2004) DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst.)* **3**, 1109-1115

- Biamonti, G. and Caceres, J.F. (2009) Cellular stress and RNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 146-153
- Boutros, R., Dozier, C., and Ducommun, B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **18**, 185-191
- Boutros, R., Lobjois, V. and Ducommun, B. (2007) CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat. Rev. Cancer* **7**, 495-507
- Bureik, M., Rief, N., Drescher, R., Jungbluth, A., Montenarh, M. and Wagner, P. (2000) An additional transcript of the *cdc25C* gene from A431 cells encodes a functional protein. *Int. J. Oncol.* **17**, 1251-1258
- Busà, R. and Sette, C. (2010) An emerging role for nuclear RNA-mediated responses to genotoxic stress. *RNA Biol.* **7**, 390-396
- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M. and Reeves, W.J.J. (1974) Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer I.* **53**, 661-674
- Chandler, D.S., Singh, R.K., Caldwell, L.C., Bitler, J.L. and Lozano, G. (2006) Genotoxic stress induces coordinately regulated alternative splicing of the p53 modulators MDM2 and MDM4. *Cancer Res.* **66**, 9502-9508
- Chen, M. and Manley J.L. (2009) Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **10**, 741-754
- Chen, F., Zhang, Z., Bower, J., Lu, Y., Leonard, S.S., Ding, M., Castranova, V., Piwnicka-Worms, H. and Shi, X. (2002) Arsenite-induced Cdc25C degradation is through the KEN-box and ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 1990-1995
- Dalvai, M., Mondesert, O., Bourdon, J-C., Ducommun, B. and Dozier, C. (2011) Cdc25B is negatively regulated by p53 through Sp1 and NF-Y transcription factors. *Oncogene* **30**, 2282-2288
- Demidova, A.R., Aau, M.Y., Zhuang, L. and Yu, Q. (2009) Dual regulation of Cdc25A by Chk1 and p53-ATF3 in DNA replication checkpoint control. *J. Biol. Chem.* **284**, 4132-4139
- Dutertre, M., Sanchez, G., De Cian, M.C., Barbier, J., Dardenne, E., Gratadou, L., Dujardin, G., Le Jossic-Corcós, C., Corcos, L. and Auboeuf, D. (2010) Cotranscriptional exon skipping in the genotoxic stress response. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1358-1366
- Filippov, V., Filippova, M. and Duerksen-Hughes, P.J. (2007) The early response to DNA damage can lead to activation of alternative splicing activity resulting in CD44 splice pattern changes. *Cancer Res.* **67**, 7621-7630
- Filippov, V., Schmidt, E.L., Filippova, M. and Duerksen-Hughes, P.J. (2008) Splicing and splice factor SRp55 participate in the response to DNA damage by changing isoform ratios of target genes. *Gene* **420**, 34-41
- Forrest, A.R.R., McCormack, A.K., DeSouza, C.P.C., Sinnamon, J.M., Tonks, I.D., Hayward, N.K., Ellem, K.A.O. and Gabrielli, B.G. (1999) Multiple splicing variants of *cdc25B* regulate G2/M progression. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **260**, 510-515
- Guo, J., Kleeff, J., Li, J., Ding, J., Hammer, J., Zhao, Y., Giese, T., Korc, M., Büchler, M.W., and Friess, H. (2004) Expression and functional significance of CDC25B in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* **23**, 71-81
- Hernández, S., Bessa, X., Beà, S., Hernández, L., Nadal, A., Mallofré, C., Muntane, J., Castells, A., Fernández, P.L., Cardesa, A. and Campo, E. (2001) Differential expression of *cdc25* cell-cycle activating phosphatases in human colorectal carcinoma. *Lab. Invest.* **81**, 465-473
- Hernández, S., Hernández, L., Beà, S., Pinyol, M., Nayach, I., Bellosillo, B., Nadal, A., Ferrer, A., Fernández, P.L., Montserrat, E., Cardesa, A. and Campo, E. (2000) Cdc25A and the splicing variant *cdc25B2*, but not *cdc25B1*, -B3 or -C, are over-expressed in aggressive human non-Hodgkin's lymphomas. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* **89**, 148-152
- Jackson, S.P. and Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071-1078
- Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H. and Okayama, H. (1994) CDC25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J.* **13**, 1549-1556
- Kaklamani, V.G. and Gradishar, W.J. (2005). Adjuvant therapy of breast cancer. *Cancer Invest.* **23**, 548-560
- Karlsson-Rosenthal, C. and Millar, J.B.A. (2006) Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends Cell Biol.* **16**, 285-292

- Kieffer, I., Lorenzo, C., Dozier, C., Schmitt, E. and Ducommun, B. (2007) Differential mitotic degradation of the CDC25B phosphatase variants. *Oncogene* **26**, 7847-7858
- Komarov, P.G., Komarova, E.A., Kondratov, R.V., Christov-Tselkov, K., Coon, J.S., Chernov, M.V. and Gudkov, A.V. (1999) A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* **285**, 1733-1737
- Kristjánisdóttir, K. and Rudolph, J. (2004) Cdc25 phosphatases and cancer. *Chem. Biol.* **11**, 1043-1051
- Lammer, C., Wagerer, S., Saffrich, R., Mertens, D., Ansorge, W. and Hoffmann, I. (1998) The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J. Cell Sci.* **111**, 2445-2453
- Lents, N.H., Wheeler, L.W., Baldassare, J.J. and Dynlacht, B.D. (2008) Identification and characterization of a novel Mdm2 splice variant acutely induced by the chemotherapeutic agents adriamycin and actinomycin D. *Cell Cycle* **7**, 1580-1586
- Mah, L.-J., El-Osta, A. and Karagiannis, T.C. (2010) γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* **24**, 679-686
- Markey, M. and Berberich, S.J. (2008) hdmX transcripts decrease following genotoxic stress. *Oncogene* **27**, 6657-6666
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald III, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P. and Elledge, S.J. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**, 1160-1166
- Millar, J.B.A., Blevitt, J., Gerace, L., Sadhu, K., Featherstone, C. and Russell, P. (1991) p55CDC25 is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 10500-10504
- Muñoz, M.J., Pérez, S.M.S., Paronetto, M.P., de la Mata, M., Pelisch, F., Boireau, S., Glover-Cutter, K., Ben-Dov, C., Blaustein, M., Lozano, J.J., Bird, G., Bentley, D., Bertrand, E. and Kornblihtt, A.R. (2009) DNA damage regulates alternative splicing through inhibition of RNA polymerase II elongation. *Cell* **137**, 708-720
- Ozen, M. and Ittmann, M. (2005) Increased expression and activity of CDC25C phosphatase and an alternatively spliced variant in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 4701-4706
- Pajares, M.J., Ezponda, T., Catena, R., Calvo, A., Pio, R. and Montuenga, L.M. (2007) Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol.* **8**, 349-357
- Sarkaria, J.N., Busby, E.C., Tibbetts, R.S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L.M. and Abraham, R.T., (1999) Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res.* **59**, 4375-4382
- Shkreta, L., Michelle, L., Toutant, J., Tremblay, M.L. and Chabot, B. (2010) The DNA damage response pathway regulates the alternative splicing of the apoptotic mediator Bcl-x. *J. Biol. Chem.* **286**, 331-340
- Solier, S., Lansiaux, A., Logette, E., Wu, J., Soret, J., Tazi, J., Bailly, C., Desoche, L., Solary, E. and Corcos, L. (2004) Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells. *Mol. Cancer Res.* **2**, 53-61
- Soule, H.D., Vasquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M.A. (1973) Human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer I.* **51**, 1409-1416
- St. Clair, S., Giono, L., Varmeh-Ziaie, S., Resnick-Silverman, L., Liu, W., Padi, A., Dastidar, J., DaCosta, A., Mattia, M. and Manfredi, J.J. (2004) DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Mol. Cell* **16**, 725-736
- Varmeh, S. and Manfredi, J.J. (2008) Overexpression of the dual specificity phosphatase, Cdc25C, confers sensitivity on tumor cells to doxorubicin-induced cell death. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 3789-3799
- Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P. and Burge, C.B. (2008a) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**, 470-476
- Wang, Y., Dean, J.L., Millar, E.K.A., Tran, T.H., McNeil, C.M., Burd, C.J., Henshall, S.M., Utama, F.E., Witkiewicz, A., Rui, H., Sutherland, R.L., Knudsen, K.E. and Knudsen, E.S. (2008b) Cyclin D1b is aberrantly regulated in response to therapeutic challenge and promotes resistance to estrogen antagonists. *Cancer Res.* **68**, 5628-5638

- Wang, Z., Trope, C.G., Florenes, V.A., Suo, Z., Nesland, J.M. and Holm, R. (2010) Overexpression of CDC25B, CDC25C and phospho-CDC25C (Ser216) in vulvar squamous cell carcinomas are associated with malignant features and aggressive cancer phenotypes. *BMC Cancer* **10**, 233
- Wegener, S., Hampe, W., Herrmann, D. and Schaller, H.C. (2000) Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C. *Eur. J. Cell. Biol.* **79**, 810-815
- Whelan, R.D., Waring, C.J., Wolf, C.R., Hayes, J.D., Hosking, L.K. and Hill, B.T. (1992) Overexpression of p-glycoprotein and glutathione *S*-transferase pi in MCF-7 cells selected for vincristine resistance in vitro. *Int. J. Cancer* **52**, 241-246

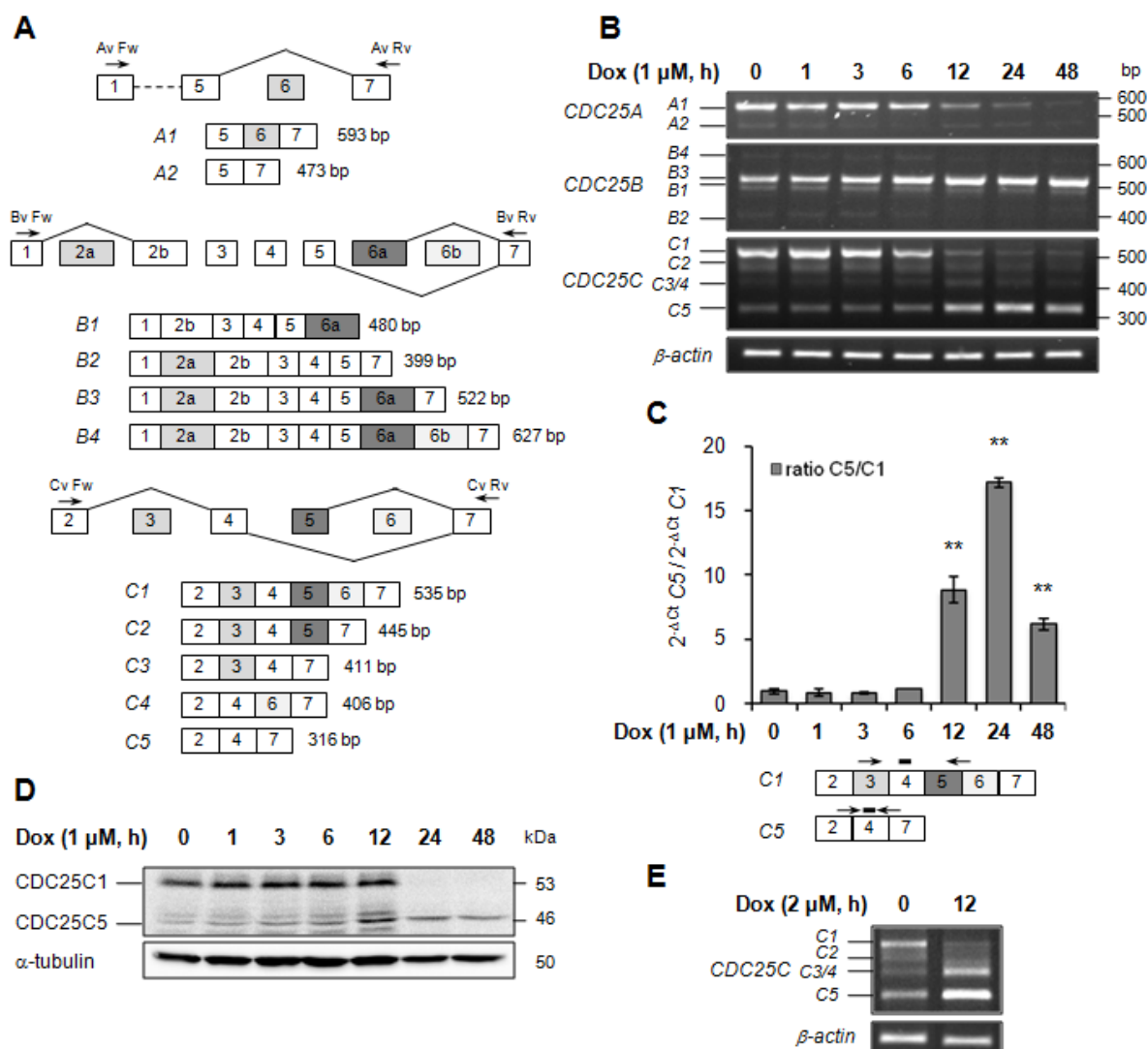


Figure 1. Modulation of CDC25C splicing by doxorubicin in human breast cancer cell lines

(A) Schematic representation of *CDC25A*, *CDC25B* and *CDC25C* pre-mRNA and alternatively spliced transcripts sequences. Gray rectangles correspond to alternatively spliced exons. Arrows show the localization of primers used to amplify the different *CDC25A*, *CDC25B* and *CDC25C* variants by semi-quantitative RT-PCR (see Materials and Methods for primers sequences). Amplicon length expected for each splice variant appears at the right of the figure. (B) MCF-7 cells were treated with 1 μM of doxorubicin at the indicated times. RNA were subjected to semi-quantitative RT-PCR to detect *CDC25A*, *CDC25B* and *CDC25C* splice variants. PCR products are identified on the left and molecular weight markers are indicated on the right. The β-actin gene was used as a standardizing control. (C), top, RNA from MCF-7 cells treated with doxorubicin as indicated were subjected to Real-Time quantitative RT-PCR to evaluate the ratio between *CDC25C5* and *C1* variants. The results are expressed as $2^{-\Delta C_T} C5 / 2^{-\Delta C_T} C1$ (mean ± S.D.) of three independent experiments. 18S rRNA was used as an endogenous reference gene. ** shows significant difference from control at $p < 0.01$ (Student's *t* test); bottom, schematic representation of primers (arrows) and TaqMan® probe (bold line) used to detect *C1* and *C5* variants. (D) *CDC25C* protein expression from MCF-7 cells treated as indicated were examined by immunoblotting. α-tubulin was used as a loading control. Molecular weights for each protein are indicated on the right. (E) The MCF-7 multidrug-resistant counterpart cell line Vcr-R was treated with 2 μM of doxorubicin for 12 h. *CDC25C* splicing was studied by semi-quantitative RT-PCR as described above.

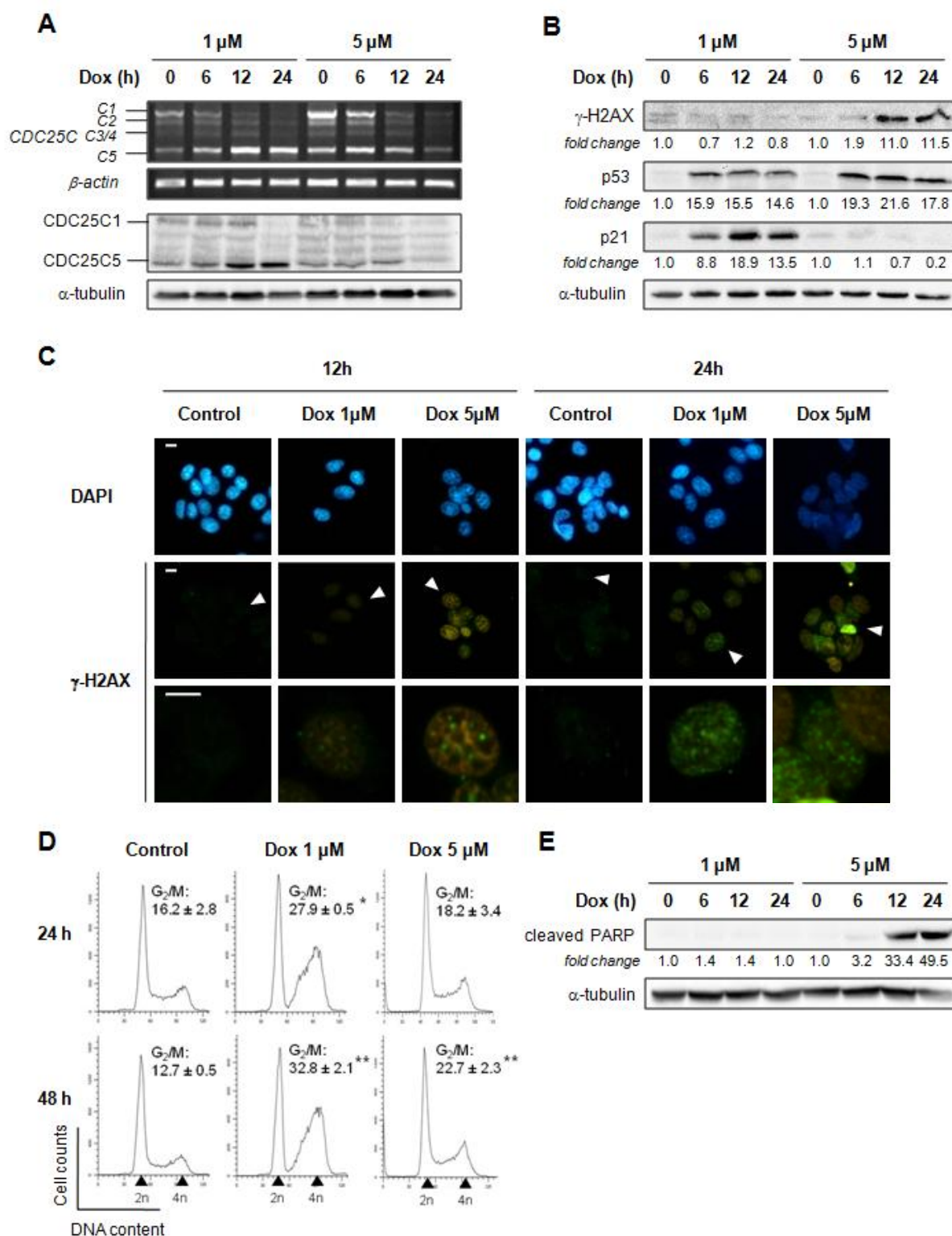


Figure 2. CDC25C splicing modulation induced by doxorubicin is associated with DNA-damage and cell cycle arrest, independently of apoptosis

MCF-7 cells were treated with 1 μ M and 5 μ M of doxorubicin for the indicated times. (A) CDC25C variants expression was evaluated by RT-PCR (*top*) and immunoblot (*bottom*). β -actin and α -tubulin were used as internal controls for the RT-PCR and immunoblotting assays, respectively (B) Immunoblotting of DNA damage response proteins. The fold-changes of protein levels between treatment and control, measured by densitometry, are shown beneath the blots. Equal loading was confirmed by α -tubulin immunoblot. (C) Immunofluorescence analysis of nuclear γ -H2AX foci

formation using anti- γ -H2AX specific antibody (green, FITC). Images at the bottom correspond to a magnification of the cell pointed by an arrow in the images above. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bars, 10 μ m. (D) Cell cycle distribution was monitored by flow cytometry after propidium iodide staining. Shown is the result of a representative FACS experiment and the frequency of cells in G_2/M phase. Data are displayed as mean \pm S.D. of three independent experiments. * and ** indicate a significant difference between treated and untreated cells with $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. (E) Analysis of PARP cleavage by immunoblotting. The fold-changes of protein levels between treatment and control, measured by densitometry, are shown beneath the blots. Equal loading was confirmed by α -tubulin immunoblot.

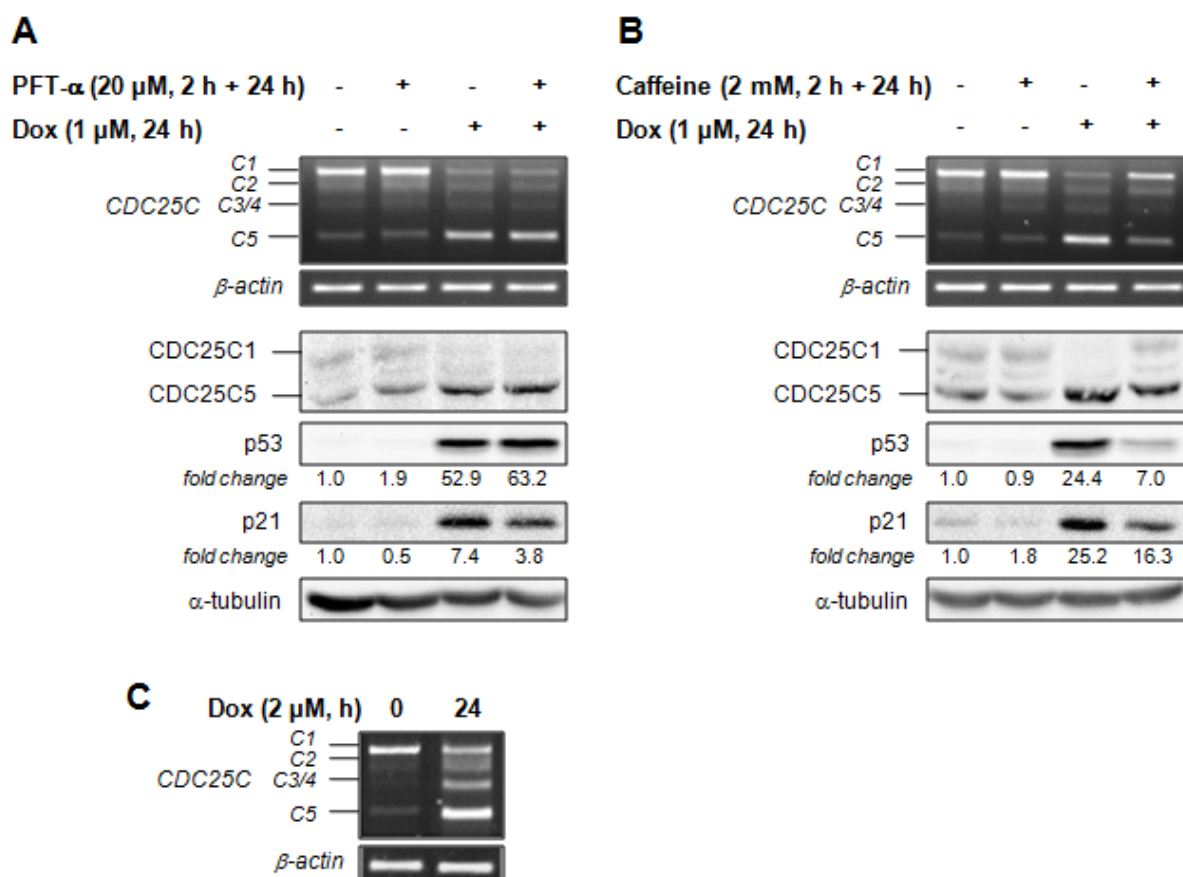


Figure 3. Regulation of CDC25C splicing is dependent on ATM/ATR and independent on p53 pathways

MCF-7 cells (with wild-type p53) were pre-treated with 20 μ M of the p53 inhibitor pifithrin- α (PFT- α) (A) or with 2 mM of the ATM/ATR kinases inhibitor caffeine (B) for 2 h, followed by a co-incubation with 1 μ M of doxorubicin for 24 h, *top*, RNA was subjected to RT-PCR to detect CDC25C splice variants. The β -actin gene was used as an internal control; *bottom*, Immunoblots were performed to evaluate CDC25C, p53 and p21 proteins expression. The fold-changes of protein expression between treatment and control, measured by densitometry, are shown beneath the blots. Staining of the blot with α -tubulin was used as an internal loading control. (C) MDA-MB231 cells (with mutated-p53) were treated with 2 μ M of doxorubicin for 24 h and CDC25C splice variants expression was assessed by RT-PCR. The β -actin gene was used as an internal control.

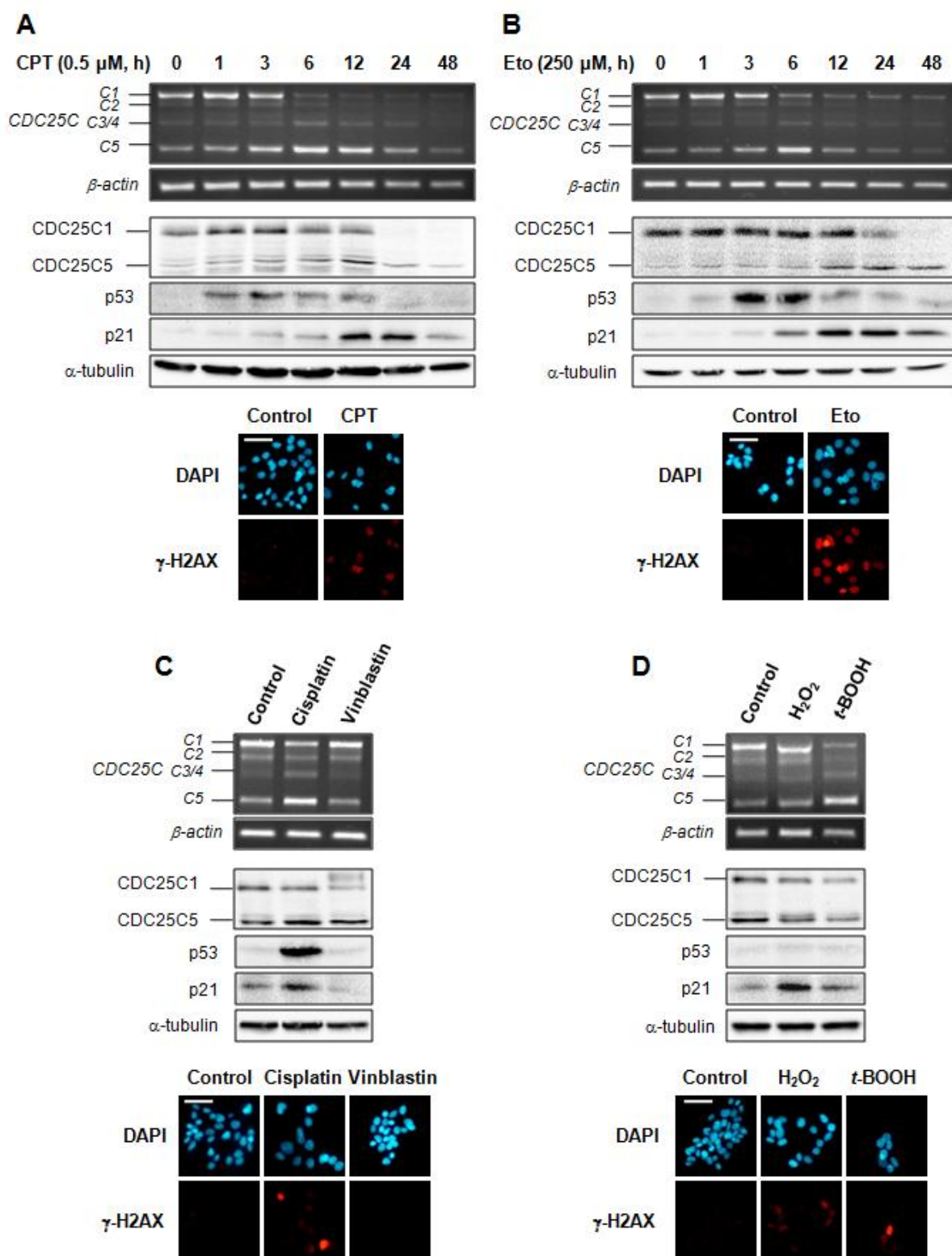


Figure 4. Modulation of CDC25C alternative splicing in response to other DNA-damaging agents in MCF-7 cells

Cells were treated with the topoisomerase I inhibitor camptothecin (CPT, 0.5 μ M) (A) and the topoisomerase II inhibitor etoposide (Eto, 250 μ M) (B) for the indicated times. Cells were also treated with the chemotherapeutic agents cisplatin (50 μ M) and vinblastin (1 μ M) (C) or with the oxidative stress-inducing agents hydrogen peroxide (H₂O₂, 1 mM) and *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH, 100 μ M) (D) for 12 h. *Top*, RNA was subjected to semi-quantitative RT-PCR to detect CDC25C splice

variants. The β -actin gene was used as a standardizing control; *middle*, Cell lysates were subjected to immunoblotting. Equal protein loading was confirmed by α -tubulin immunoblot; *bottom*, Cells were treated with the different compounds for 24 h and immunostained with anti- γ -H2AX specific antibodies (red, AlexaFluor 594). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bars, 50 μ m.