

Université
de Liège



Identification de protéines interagissant
avec les facteurs de transcription AP-2 et
contribuant à la surexpression du gène
ERBB2 dans le cancer du sein

Faculté de Médecine

Département des Sciences Biomédicales

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire – GIGA Cancer

Thèse soumise par

Grégory Nolens

En vue de l'obtention du grade de

Docteur en Sciences biomédicales

Année académique 2008-2009



Identification de protéines interagissant
avec les facteurs de transcription AP-2 et
contribuant à la surexpression du gène
ERBB2 dans le cancer du sein.

Faculté de Médecine

Département des Sciences Biomédicales

Laboratoire d'oncologie Moléculaire – GIGA Cancer

Thèse soumise par

Grégory Nolens

En vue de l'obtention du titre de

Docteur en Sciences biomédicales

Année académique 2008-2009

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Rosita Winkler, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire d'oncologie moléculaire et surtout pour son enseignement tout au long de ces dernières années. Ses grandes connaissances en biologie moléculaire ont su éveiller ma curiosité et nos discussions ont forgé mon sens de la critique.

Je tiens ensuite à remercier les Docteurs Benaïssa ElMoualij et Willy Zorzi pour m'avoir permis d'intégrer l'équipe du laboratoire du CRPP, pour leurs excellents conseils et leur soutien, tant logistique que moral, dans l'avancement de mes travaux.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers le professeur Edwin De Pauw, qui m'a donné accès à son laboratoire de spectrométrie de masse, ainsi qu'à l'ami, le Docteur Gabriel Mazzucchelli pour m'avoir aidé à maintes reprises dans ce laboratoire.

Je remercie également le professeur Jacques Boniver qui a réussi, et y parvient toujours, à motiver et mobiliser les troupes de chercheurs dans des activités scientifiques (séminaires « Sol Cress », séminaire des jeunes chercheurs...), mais également dans la création d'activités extra-laboratoires pour la remarquable cause qu'est le Télévie.

Une grande partie de mon travail n'aurait pas vu le jour sans l'aide, l'apprentissage et les nombreuses discussions avec de nombreux collègues et amis dans ces différents laboratoires, ainsi que dans d'autres laboratoires disséminés dans l'université. Je pense ainsi à Jean-Christophe, Benjamin, Corinne, Guillaume, Laurence, Dominique du labo « Onco Mol », ou encore à Olivier, Jean-François, Danièle, Ingrid, Ben, Guérin, Nandini,... du CRPP, ainsi que Renaud, Nicolas, Ludovic, Khalid, Céline, Julie, Virginie..., de l'Ulg/GIGA, sans oublier les réflexions caféinées de Manu. Mes remerciements vont également au service de Santé publique pour leurs activités sportives et récréatives qui m'ont aidées à prendre du recul quand il le fallait.

Je tiens également à remercier ma famille et mes amis proches qui ont su être compréhensifs et m'écouter quand j'en avais besoin. Mes pensées vont à mes parents et ma sœur pour avoir toujours cru en moi, et je remercie plus spécialement mon père et ses nombreux passages au labo encourageants et porteurs.

Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans mon incroyable (petite) femme, qui m'a donné une étonnante dose de soutien et d'affection durant ce travail, ainsi que pendant ma convalescence. Souvent utilisée comme punching-ball, elle a su transformer un « pour le pire » en « pour le meilleur ». Enfin, elle continue à me combler de bonheur en agrandissant notre famille.

Enfin, j'exprime toute ma gratitude envers le F.N.R.S (Fonds National de la Recherche Scientifique), le Télévie et le centre Anticancéreux qui ont financé les recherches présentées dans ce travail, ainsi que l'Université de Liège et le GIGA.

Table des matières

Introduction	1
I.1. Le cancer du sein	2
I.2. ERBB2-Her2.....	4
I.2.1. Activation des récepteurs ERBB.....	4
I.2.2. Implication du réseau ERBB dans le cancer du sein.....	6
I.2.2.a. Conséquences de la surexpression d'ERBB2.....	6
I.2.2.b. ERBB2 – Cible thérapeutique.....	7
I.2.3. Mécanismes moléculaires responsables de la surexpression du gène <i>ERBB2</i> . 8	8
I.3. Les facteurs de transcription AP-2.....	11
I. 3.1. Structure des protéines AP-2	11
I. 3.2. Activité transcriptionnelle d'AP-2 et sa régulation.....	12
I. 3.3. Régulation de l'expression des gènes AP-2.....	13
I. 3.4. Cofacteurs et protéines interagissant avec AP-2.	14
I. 3.5. Rôles biologiques d'AP-2.....	16
I.3.5.a. AP-2 dans l'embryogenèse	16
I.3.5.b. AP-2 chez l'adulte.....	16
I.3.5.c. AP-2 dans la régulation de la prolifération et de l'apoptose	17
I. 3.6. AP-2 dans le cancer du sein.....	18
I.3.6.a. AP-2 dans la régulation oestrogénique	19
I.3.6.b. AP-2 dans la régulation du gène <i>ERBB2</i>	19
I.4. Les protéines YY1.....	21
I.4.1. Structure de la protéine YY1	21
I.4.2. Rôles biologiques d'YY1.....	22
I.4.3. YY1 dans les cellules de cancer du sein	24
I.5. Les protéines Ku	25
I.5.1. Structure des protéines Ku	26
I.5.2. Les protéines Ku dans la réparation de l'ADN	26
I.5.3. Les protéines Ku dans l'immunité	27
I.5.4. Les protéines Ku dans la prolifération et la survie cellulaires	27
I.5.5. Les protéines Ku dans la stabilité des télomères	28
I.5.6. Activité transcriptionnelle de Ku	29
I.5.7. Implications des protéines Ku dans le cancer.	30

Travaux antérieurs et objectifs du travail	33
Résultats	34
R.1. Rôle combiné des protéines YY1 et AP-2 dans l'expression d'ERBB2.....	34
R.1.1 Rôle combiné des protéines AP-2α et YY1 dans l'expression d'ERBB2 endogène.....	34
R.1.2 Immunodetection combinée d'AP-2α et YY1 associée avec la surexpression d'ERBB2.	35
R.2. Identification de nouvelles protéines interagissant avec AP-2 et étude de leur implication dans l'expression d'ERBB2.	38
R.2.1 Identification de protéines interagissant avec AP-2α	38
R.2.2 Expression des protéines Ku dans les lignées de cancer du sein.....	39
R.2.3 Rôle de la protéine Ku80 dans l'activité transcriptionnelle d'AP-2α sur le promoteur d' <i>ERBB2</i>	41
R.2.4 Rôle des protéines Ku dans l'expression d'ERBB2.....	42
R.2.4.a Rôle des protéines Ku dans l'expression de l'ARNm du gène <i>ERBB2</i>	42
R.2.4.b Rôle des protéines Ku dans l'expression de la protéine p185-erbB2.	43
R.2.4.c Rôle des protéines Ku avec AP-2α et AP-2γ dans l'expression de l'ARNm d'ERBB2.	44
R.2.5 Rôle des protéines Ku dans l'activité du promoteur du gène <i>ERBB2</i>	45
R.2.6 Interaction des protéines Ku avec le promoteur proximal du gène <i>ERBB2</i> . 46	
R.2.7 Conclusion.	48
Résultats Annexes	51
R.3. R-Annexe I. Mises au point et d'une technique d'affinité sur ADN.....	51
R.4. R-Annexe II. Rôle des protéines AP-2 et Ku dans la croissance cellulaire. ...	56
Discussion générale et perspectives.....	61
Matériels et Méthodes	67
M.1. Mise au point de la chromatographie d'affinité sur ADN	67
M.1.1. Self-priming PCR.....	67
M.1.2. Retard sur gel – EMSA (Electrophoretic mobility-shift assay).....	67
M.1.3. Chromatographie d'affinité sur ADN.....	68
M.1.4. Utilisation des siRNAs.....	68
M.2. Etude de la croissance cellulaire	69
M.2.1. Photographie cellulaire	69
M.2.2. Anticorps (autres que dans les articles)	69
M.2.3. Test Annexin-Pi	69
Liste des Références	71
Annexes Bibliographiques	83

Abréviations

aa : acide aminé	IHC : immunohistochimie
ADAM : a disintegrin and a metalloprotease	Kb : kilobase
ADN : acide désoxyribonucléique	KO : knock out
AKT :	LBD : ligand binding domain
AP-2 : activator protein-2	MAPK : mitogen activated protein kinase
AR : amphiréguline	MAR : matrix-attachment region
ARN : acide ribonucléique	MMP : matrix metalloprotease
ARNm : ARN messenger	mTOR : mammalian target of rapamycin
bp : paires de bases	Mut : muté(e)
BSA : Bovine Serum Albumin	NRG : neuréguline, héréguline
CAA : Chromatographie d'affinité sur ADN	PARP : polyADP-ribose polymerase
CBP : cAMP-responsive element binding protein	PC4 : positive cofactor 4
C/EBPα : CCAAT/enhancer binding protein	PCAF : p300/CBP associated factor
ChIP : chromatin immunoprecipitation	PBS : Phosphate Buffer Saline
CITED : p300/CBP interacting transactivator with ED-rich tail	PEG : Poly-ethylene Glycol
Da : Dalton	PEA3 : polyoma enhancer activator-3
DBD : DNA binding domain	PI3K : phosphatidyl inositol 3' kinase
DCIS : ductal carcinoma <i>in situ</i>	PKA : protein kinase A
D.D. : Domaine de dimérisation	Pol II : ARN Polymerase II
D.L.A. : Domaine de Liaison à l'ADN	RA : acide rétinoïque
EGF : epidermal growth factor	Rb : Retinoblastoma protein
EMSA : electrophoretic mobility shift assay	SH2 : Src homology-2
ER : estrogen receptor	SP1 (ou 3) : specificity protein-1 (ou 3)
ETS : erythroid twenty six	SRC : steroid-receptor coactivator
GSH : Glutathion	Stat : Signal Transducers and Activator of Transcription
GST : Glutathion Serine Transferase	SV40 : Simian virus 40
HAT : histone acetyl-transferases	TGFα : transforming growth factor α
HDAC : histone deacetylases	TK : tyrosine kinase
HLH : helix-loop-helix	TNF-α : tumor necrosis factor α
hMt IIa : human metallothionein IIa	UBC9 : ubiquitin conjugating enzyme 9
ICAM-1 : intercellular adhesion molecule	UV : ultra-violet
	VEGF : vascular endothelial factor
	WT : Wild-type (sauvage)
	YB-1 : Y-Box Binding Protein-1
	YY1 : Yin Yang 1
	ZONAB : ZO-1 associated nucleic acid binding protein

Introduction

Avant propos – le cancer

La cancérisation est un processus en étapes multiples, au cours desquelles la cellule acquiert les capacités typiques des cellules cancéreuses. De nombreux travaux sont consacrés à l'identification des altérations moléculaires conférant ces propriétés aux cellules cancéreuses. L'altération de nombreux gènes, proto-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs ont été identifiés dans les cancers expérimentaux et les cancers primaires chez l'homme. Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) ont proposé de classer ces altérations en fonction des voies de signalisation qu'elles dérégulaient. Selon leur hypothèse, une cellule cancéreuse est capable de stimuler sa propre prolifération, de résister aux signaux inhibiteurs de la prolifération et aux signaux apoptotiques, de se diviser indéfiniment, d'induire l'angiogenèse, d'envahir les tissus avoisinants et de former des métastases à distance. En faveur de cette hypothèse, il a été possible de transformer des cellules « normales » de sein humain HMEC en cellules cancéreuses en y exprimant une protéine **ras** activée constitutivement, en inhibant l'activité de la protéine **pRb** (inhibitrice de la prolifération) et de la protéine pro-apoptotique **p53** et en exprimant la télomérase (Hahn et al., 1999). Des travaux ultérieurs ont ensuite démontré l'importance des cellules du microenvironnement dans la cancérisation (Elenbaas et al., 2001).

Des travaux récents ont démontré qu'à côté des altérations des gènes codants, les miRNA et les modifications épigénétiques jouent aussi un rôle important dans le développement des cancers (Iorio et al., 2008).

Tumeurs épithéliales

- Non infiltrantes
 - carcinome intracanaux (ou DCIS)
 - carcinome lobulaire in situ (ou LCIS)
- Infiltrantes
 - carcinome canalaire infiltrant (ou TC)
 - carcinome canalaire infiltrant avec composante intracanaux prédominante
 - carcinome lobulaire infiltrant
 - carcinome médullaire
 - carcinome papillaire
 - carcinome tubuleux
 - carcinome sécrétant (juvénile)
 - carcinome apocrine
 - carcinome métaplasique
 - autres
- Papillome intracanaux
- Adénome du mamelon
- Adénome tubuleux
- Adénome lactant
- Maladie de Paget du mamelon
- Autres

Tumeurs épithéliales et conjonctives mixtes

- Fibroadénome
- Tumeur phyllode
- Carcinosarcome

Tumeurs diverses

- Tumeur des parties molles
- Tumeurs cutanées
- Tumeur des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes

Tableau I. 1. Classification histopathologique des tumeurs du sein, selon l'OMS (1981).

I.1. Le cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme (Boyle and Ferlay, 2005; Ferlay et al., 2007). Même si les traitements sont de plus en plus efficaces, il est responsable d'environ 130 000 décès en Europe. Le traitement du cancer du sein dépend de plusieurs critères comprenant l'aspect histologique, la localisation, la taille, l'agressivité, l'invasivité et le profil moléculaire de la tumeur.

Le risque pour une femme de développer un cancer du sein est lié à son mode de vie mais aussi à son patrimoine génétique. Ainsi, il existe une prédisposition héréditaire à développer un cancer du sein. Les patientes porteuses de certaines altérations génétiques, comme par exemple d'une mutation du gène BRCA1 ou BRCA2, sont ainsi plus susceptibles de développer un cancer du sein. Cette prédisposition concerne entre 5 et 10% des cancers du sein (Thompson and Easton, 2004; Tan et al., 2008)

Le cancer du sein est une maladie complexe et il serait plus correcte de parler « des » cancers du sein. Ces cancers du sein se différencient l'un de l'autre par le type de cellule à l'origine de la tumeur, et par son profil d'expression génique. Ces éléments sont à la base de la classification des cancers du sein. Cette classification devrait permettre d'adapter au mieux le traitement. Ainsi, en 1981, l'Organisation Mondiale pour la Santé (O.M.S.) a proposé une **classification** basée sur l'histologie (Tableau I. 1). A celle-ci, s'ajoute la **classification basée sur des facteurs pronostiques**, comme la taille (T), le nombre de ganglions envahis (N), la présence de métastase(s) (M). L'expression de récepteurs aux hormones stéroïdiennes, oestrogènes (ER) et progestérone (PR) est un élément important du choix thérapeutique. Plus récemment, l'évaluation de la surexpression du gène *ERBB2* (Her2/Neu) est devenue fréquente dans la classification des cancers du sein.

Malgré les progrès certains dans le traitement des cancers du sein, la maladie continue à tuer une proportion de patientes. Dès lors, les méthodes modernes d'analyse du génome et du transcriptome sont utilisées pour mieux comprendre la maladie et identifier plus précisément les facteurs qui pourraient en prévoir l'évolution. C'est ainsi que des cancers ont été groupés en plusieurs catégories sur la base des gènes exprimés (Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2006; Sotiriou et al., 2003; Perreard et al., 2006).

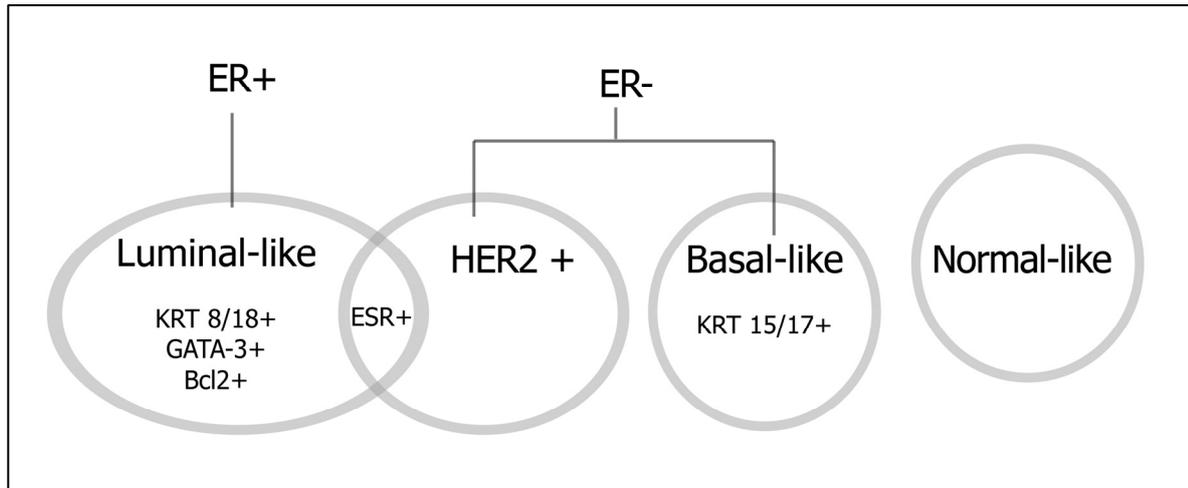


Figure I. 1. Exemple de classification moléculaire des tumeurs primaires selon leur profil d'expression génique. Cette classification est réalisée selon des données d'expression génique de microarrays. 4 catégories (ou groupes) sont ici illustrées. La première est appelée « **Luminal-like** ». Les tumeurs de ce groupe sont positives pour le récepteur aux oestrogènes (ER+), et ont un profil d'expression des kératines (KRT 8 et 18) similaire aux cellules luminales canalaire du sein. Elles expriment également toute une série d'autres gènes, comme Bcl2 et GATA-3. Inversement, les tumeurs ER- peuvent être subdivisées en deux catégories. On y retrouve les tumeurs exprimant **HER2** (HER2+) et celles dites « **Basal-like** ». Ces dernières ont un profil d'expression similaire à celui de l'épithélium basal canalaire du sein, et expriment des kératines spécifiques (KRT 15 et la 17). Enfin, un quatrième groupe, le « **Normal-like** », se distingue par son profil d'expression génique très proche de celui de l'épithélium normal du sein. La classification de ces tumeurs n'est pas stricte. Ainsi, il peut y avoir des intersections entre groupes, dû à l'expression de gènes pouvant se retrouver dans plusieurs groupes à la fois. C'est le cas du gène ESR, souvent corrélé à l'expression d'ER, qui peut se retrouver également dans le groupe HER2+.

La Figure I. 1 tente de représenter ces catégories selon les travaux précédemment cités. Ces catégories peuvent ensuite être à nouveau classifiées en sous-catégories. Cet aspect est en évolution constante et est à mettre en parallèle avec l'évolution des connaissances, non seulement en génomique mais également en protéomique, en épigénétique et en métabolomique.

Dans la suite de cette introduction, nous résumerons d'abord les connaissances sur le rôle de la surexpression du gène *ERBB2* et les mécanismes responsables de cette altération. Nous présenterons ensuite les facteurs de transcription AP-2 et son cofacteur YY1, ainsi que leurs rôles dans la surexpression d'*ERBB2*. Nous terminerons enfin en résumant les connaissances concernant les protéines Ku dont nous proposons l'implication dans l'expression d'*ERBB2*.

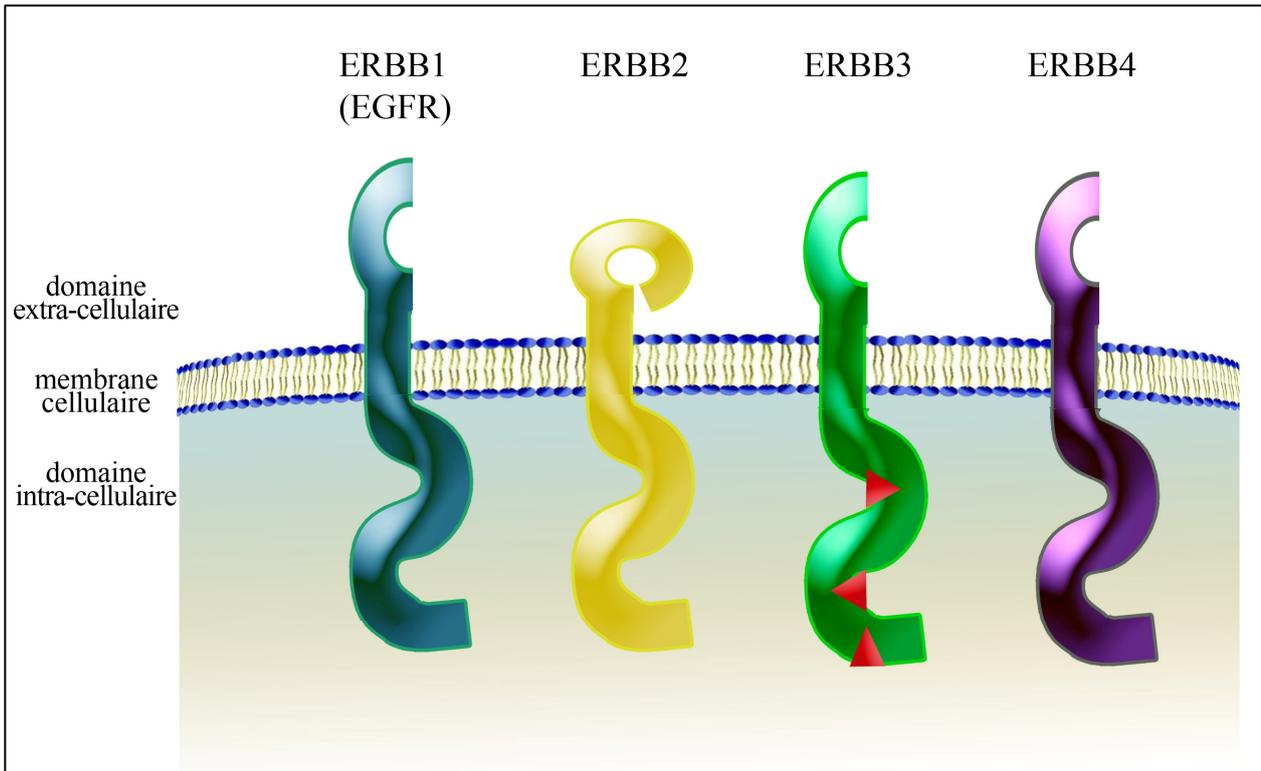


Figure I. 2. Présentation schématique des récepteurs de la famille ERBB. Les 4 récepteurs se situent au niveau de la membrane cytoplasmique. Le domaine extracellulaire sert à fixer des ligands permettant leur activation. Sans ligand, ils sont dits en position « inactif », excepté ERBB2 qui n'a pas de ligand et reste en position « actif ». Le domaine transmembranaire sert d'ancrage dans la membrane. Le domaine intracellulaire (ou intracytoplasmique) contient la partie tyrosine kinase permettant la trans- et l'auto-phosphorylation, excepté pour ERBB3 qui en est dépourvue (triangles rouges).

I.2. ERBB2-Her2

Le gène *ERBB2* (HER2), fait partie de la famille des récepteurs à l'EGF (EGFR). Cette famille comporte quatre membres : EGFR/ERBB1/HER1, ERBB2/HER2, ERBB3/HER3 et ERBB4/HER4 (Figure I. 2). Ces gènes codent pour des récepteurs transmembranaires dont la partie cytoplasmique contient un domaine tyrosine kinase fortement conservé. Le domaine extracellulaire de trois de ces récepteurs, EGFR, ERBB3 et ERBB4 est reconnu par plus de 20 ligands de la famille de l'EGF. La fixation du ligand induit l'homo- ou l'hétéro-dimérisation des récepteurs, leur activation suivie de la trans-phosphorylation de résidus tyrosines des extrémités COOH des protéines. Les résidus tyrosines phosphorylés sont reconnus par diverses protéines de signalisation cytoplasmiques. Ceux-ci déclencheront des cascades de signalisation intra-cellulaire aboutissant à une variété d'effets biologiques comme la prolifération, la différenciation, la survie, la motilité cellulaires

Les récepteurs de la famille EGFR ont un rôle essentiel dans le développement embryonnaire et tout au long de la vie. La dérégulation de ces récepteurs est impliquée dans le développement de nombreux cancers. Des médicaments récents ciblent les récepteurs de la famille EGFR.

I.2.1. Activation des récepteurs ERBB

Les récepteurs de la famille EGFR sont composés de trois régions principales : extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique. La région extracellulaire est responsable de la reconnaissance et de la fixation des ligands. La région transmembranaire sert d'ancrage dans la membrane cytoplasmique. La région cytoplasmique contient le domaine tyrosine kinase (Figure I. 2) (Hynes and Lane, 2005; Yarden, 2001).

Les ligands de la famille à l'EGF peuvent être subdivisés en trois groupes en fonction des récepteurs qu'ils reconnaissent. (Figure I. 3. A) : **1.** EGF, transforming growth factor- α (TGF- α) et l'amphireguline (AR) interagissant uniquement avec EGFR ; **2.** betacellulin (BTC), heparin-binding EGF(HB-EGF) et epiregulin interagissant avec EGFR et ERBB4 ; **3.** les neuregulines (NRGs) interagissant avec ERBB3 et/ou avec ERBB4.

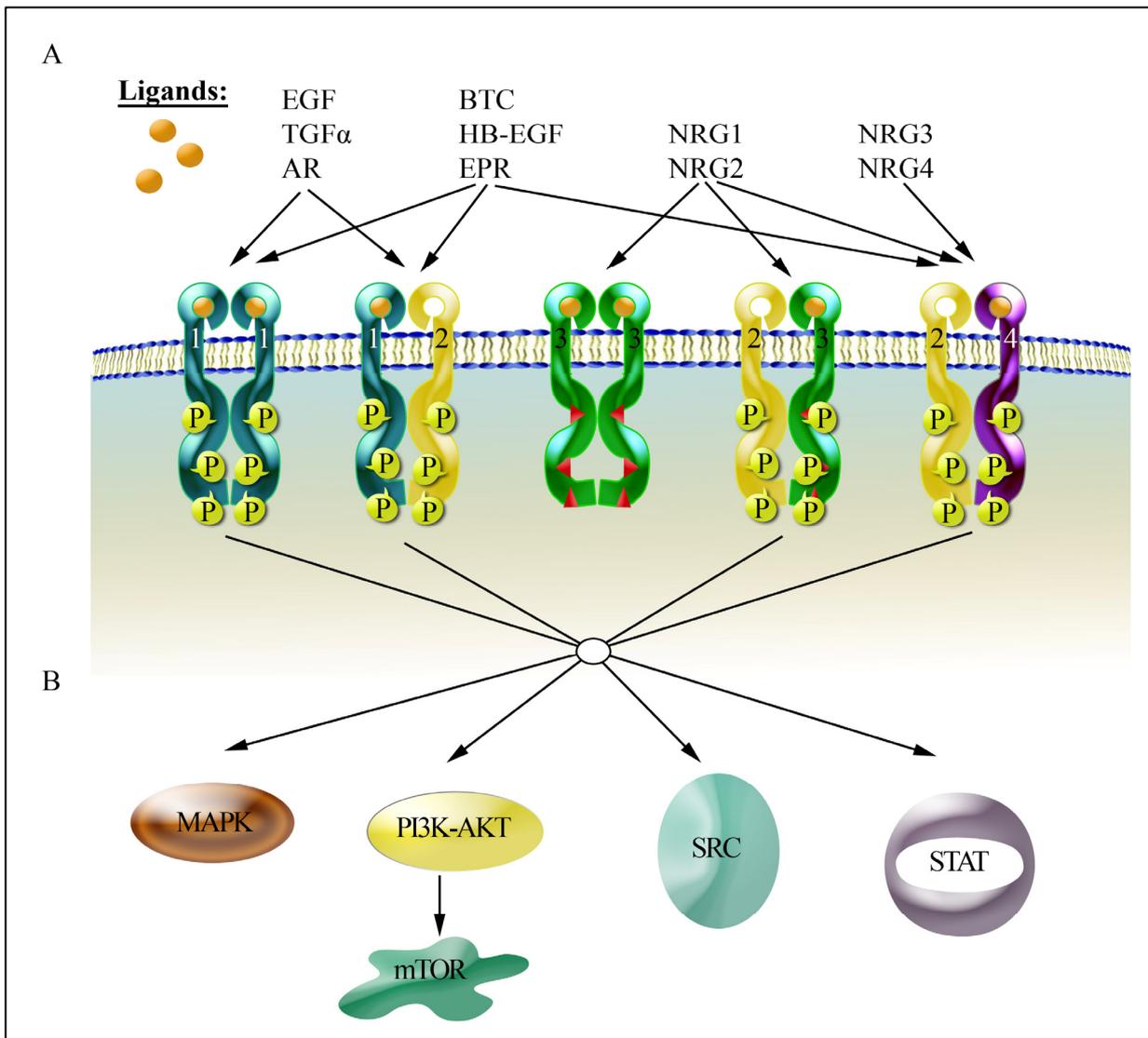


Figure I. 3. Activation des récepteurs ERBB, dimérisation et activation des voies intracellulaires. **A.** Après fixation d'un ligand (boule orange), les récepteurs s'homo ou s'hétérodimérisent. Pour être actif, ERBB2 doit s'hétérodimériser avec un autre récepteur. Cette dimérisation enclenche l'activité tyrosine kinase des récepteurs permettant la trans- et l'auto-phosphorylation (bulle jaune -P). Ligands : EGF, Epifermal Growth Factor; TGF α , transforming growth factor- α ; AR, amphiregulin; BTC, betacellulin; EPR, epiregulin; HB-EGF, heparin-binding EGF; NRGs, neuregulins. **B.** Cette phosphorylation conduit à l'activation de nombreuses voies intracellulaires, dont les principales sont indiquées ici. Ces voies vont conduire à différentes régulations comme la prolifération et la survie cellulaire, ou encore l'angiogénèse.

En l'absence de ligand, la conformation des parties extracellulaires des récepteurs EGFR, ERBB3 et ERBB4 empêche la dimérisation. La fixation du ligand induit un changement de conformation en permettant au domaine extracellulaire de s'associer à un autre récepteur.

Aucun ligand connu ne reconnaît ERBB2. Le domaine extracellulaire de ce récepteur est toujours en position **active**, lui permettant de s'associer à un autre récepteur lié à un ligand. ERBB2 a un rôle central dans l'activité de la famille de récepteurs EGFR, car il est le partenaire préférentiel de dimérisation des autres récepteurs de la famille.

A la suite de la dimérisation, les résidus tyrosine de la partie cytoplasmique seront phosphorylés par trans-phosphorylation. Les tyrosines phosphorylées sont reconnues par des protéines de signalisation intracellulaires par l'intermédiaire de domaines SH2 ou PTP. Ainsi sont déclenchées plusieurs voies de signalisation (Figure I. 3 B) parmi lesquelles les voies ras / **MAPK** (mitogen-activated protein kinase), **PI3K**- (phosphatidylinositol 3-kinase) **AKT** - **mTOR** ont été associées à la progression cancéreuse. L'activation des facteurs de transcription **STAT** ou de la tyrosine kinase **SRC** est aussi importante dans la signalisation induite par EGFR et/ou ERBB2. Signalons que le domaine tyrosine kinase du récepteur ERBB3 est muté et son activité enzymatique est très faible. Ce récepteur est activé par dimérisation avec un autre membre de la famille. ERBB3 joue un rôle important dans la cellule saine et la cellule cancéreuse, puisque c'est le récepteur qui active le plus efficacement la PI3K.

Ces voies de signalisation contrôlent la prolifération la survie, la différenciation cellulaires ainsi que l'adhésion et la migration cellulaire ou encore l'angiogenèse (activation de VEGF par MAPK) (Holbro et al., 2003).

Dans le développement du sein, le signal est **régulé** par différents mécanismes. Ainsi, l'expression des ligands diffère si la personne est à la puberté ou non, ou encore pendant la grossesse. La libération de ces ligands dépend de l'activation d'enzyme. Par exemple, sous l'action d'une métalloprotéase (ADAM-7), la pro-amphireguline va libérer l'amphireguline (AR) de la partie extra-cellulaire (Sternlicht and Sunnarborg, 2008). Celle-ci libérée, elle pourra ensuite interagir avec EGFR. L'activité de ce récepteur actif sera régulée ensuite par

d'autres protéines intracellulaires, comme c-Cbl, qui vont induire son internalisation et sa dégradation (Kirisits et al., 2007).

I.2.2. Implication du réseau ERBB dans le cancer du sein.

Le gène *ERBB2* est surexprimé dans environ 20% des cancers du sein chez la femme (Slamon et al., 1987; Slamon et al., 1989; Witton et al., 2003), et cette surexpression caractérise l'un des groupes de cancers du sein (voir ci-dessus § I.1). De nombreux travaux ont alors été consacrés à l'analyse de son statut dans les cancers du sein. En cumulant les résultats de plusieurs études, 90% d'entre elles démontrent que la surexpression d'ERBB2 est un facteur prédictif de l'évolution de la (Revillion et al., 1998). L'accumulation du récepteur ERBB2 confère donc un mauvais pronostic pour la patiente. De plus, elle est associée à une résistance aux thérapies anticancéreuses conventionnelles. Cette surexpression est un événement précoce de la tumorigenèse mammaire, elle en effet observée dans 70% des carcinomes canaux in situ (DCIS) de type comedo (haute prolifération et nécrose centrée) (Sharma et al., 1999). La surexpression d'ERBB2 n'a aucune incidence sur la progression des DCIS vers un stade invasif. Par contre, à ce stade, elle est associée à un risque élevé de métastases.

I.2.2.a. Conséquences de la surexpression d'ERBB2.

Il a été montré que la surexpression du gène *ERBB2* transforme les cellules en culture et induit des tumeurs dans la glande mammaire de souris transgéniques (Andrechek et al., 2000; Hutchinson and Muller, 2000).

La surexpression d'ERBB2 transforme les cellules en:

- **stimulant la prolifération cellulaire**, via la voie PI3K-AKT, souvent renforcée par l'inhibition de PTEN, un suppresseur de tumeur (Roh et al., 2000).
- **en inhibant l'apoptose**, via AKT en inhibant des facteurs comme p53 (Zhou et al., 2001b; Zhou et al., 2001a), ou encore en activant la voie NF- κ B via le TNF- α (Benoit et al., 2004).
- **augmentant l'angiogenèse et le pouvoir métastatique des cellules**, via la stimulation de l'expression du VEGF, de MMP, et en inhibant l'expression de certaines intégrines (Eccles, 2001; Yu and Hung, 2000). Ces métastases sont même observées dans le cerveau (Palmieri et al., 2007).

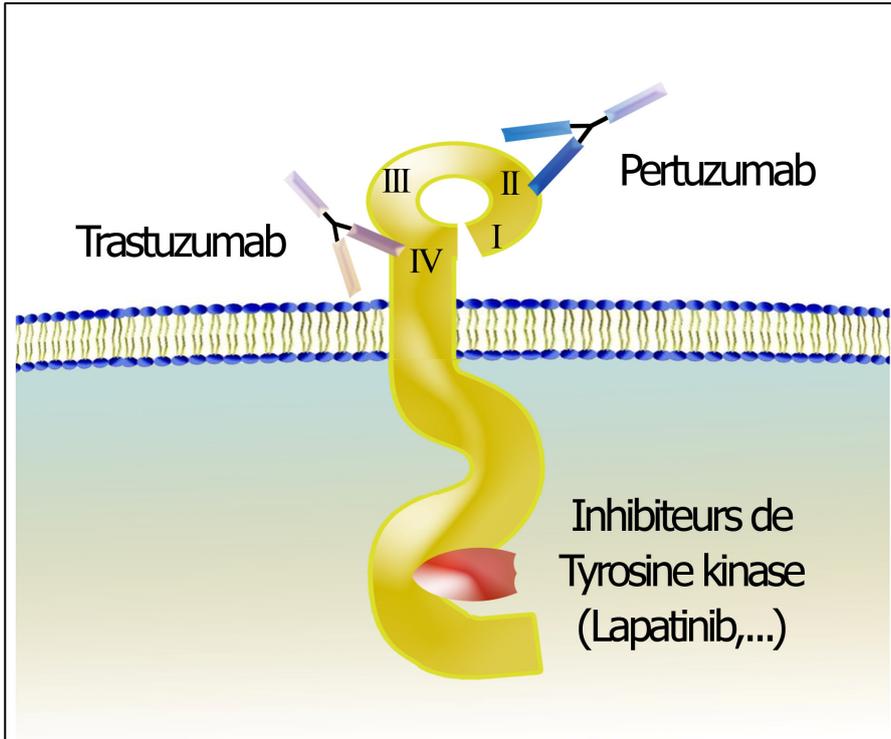


Figure I. 4. Exemples de ciblage thérapeutique sur ERBB2, et les différents sites ciblés. Le site extracellulaire est composé de 4 domaines (I à IV), et les sites I, II et III engagent l'interaction avec d'autres récepteurs. Ces sites sont la cible d'anticorps humanisés (Trastuzumab et Pertuzumab) qui après fixation, vont engendrer une réponse immunitaire. Les séquences peptidiques responsable de l'activité enzymatique tyrosine kinase, sont également ciblées à l'aide de petites molécules inhibitrices, comme le Lapatinib, Gefitinib, et autres à l'essai clinique.

Une idée émerge comme quoi une petite population de « cellules souches tumorales » existerait dans une tumeur, conduisant à la croissance de la tumeur via leur activité proliférative (Rody et al., 2008). La surexpression d'ERBB2 dans des cellules épithéliales normales du sein augmente la proportion de cellules souches (Korkaya et al., 2008). Ceci suggère que l'effet de la surexpression d'ERBB2 observé sur la carcinogénèse, la tumorigénèse et l'invasion cellulaire peut résulter de ces cellules souches.

I.2.2.b. ERBB2 – Cible thérapeutique

Avant l'apparition de traitements ciblés, la surexpression d'ERBB2 était un mauvais pronostic pour la patiente et généralement un signe de résistance aux traitements chimio- et endocrino-thérapeutiques (Ross and Fletcher, 1998; Yu and Hung, 2000). Depuis quelques années, l'apparition d'**anticorps humanisés** reconnaissant le domaine extracellulaire de la protéine ERBB2 permet de prolonger la vie (Hynes and Lane, 2005) (Figure I. 4). De plus, en adjuvant à des chimiothérapies, ces anticorps augmentent près de 50% l'efficacité du traitement, et réduisent la mortalité d'environ 33% (Piccart-Gebhart et al., 2005; Romond et al., 2005). Les anticorps les plus connus sont le Trastuzumab (Herceptin, Genentech) et le Pertuzumab (Omnitarg). D'autres traitements ciblant l'**activité kinase**, comme le Lapatinib (GlaxoSmithKline), semblent également prometteurs. Il existe également d'autres voies de ciblage thérapeutiques dits « indirects » qui ciblent la transcription du gène (par exemple les inhibiteurs d'HDAC) (Scott et al., 2002), ou encore la stabilisation de la protéine (inhibiteur d'Hsp90) (Zsebik et al., 2006; Gee, 2002) qui se révéleront peut-être très efficaces à l'avenir.

Malheureusement, ils existent des résistances et des effets secondaires à ces traitements. Les **effets secondaires** sont liés à la fonction physiologique du récepteur ERBB2. En effet, celui-ci a un rôle dans le développement embryonnaire du cœur, et les cardiomyocytes continuent à exprimer ce récepteur à leur surface membranaire. Dès lors, des cardiomyopathies peuvent apparaître chez environ 3 à 13% des patientes, dépendant du traitement (Seidman et al., 2002). Ce paramètre doit être pris en compte avant le traitement (Yeh et al., 2004). Ces effets semblent heureusement réversibles (Ewer et al., 2005). Cependant, le Lapatinib (inhibiteur de tyrosine kinase), n'a aucun effet secondaire sur le cœur (Crone et al., 2002).

Durant le développement d'un cancer, celui-ci acquiert de multiples mutations, lesquelles sont indispensables pour le caractère malin de la tumeur. C'est pour cela que

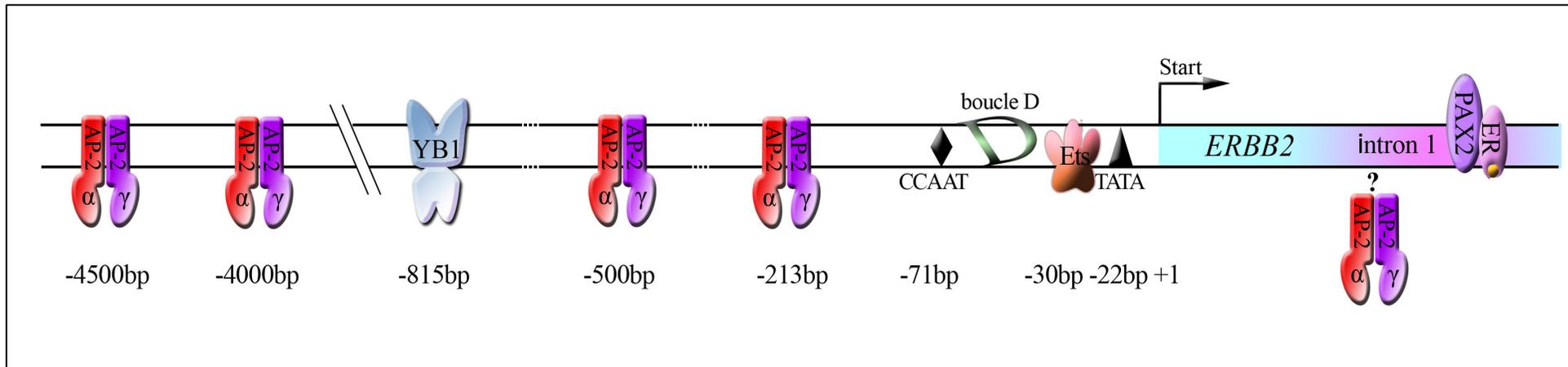


Figure I. 5. Schémas représentant le promoteur du gène *ERBB2* et ses différentes régions régulatrices. Le codon Start est représenté en +1bp. La boîte TATA (triangle noir) se situe en -22bp et la boîte CCAAT (losange noir) en -71bp. Entre les deux se situent une boucle d'ADN en triplex, appelée également boucle D. A côté, en -30bp, se situe un site de fixation pour une protéine Ets (orange), correspond le plus probablement à la protéine PEA3. En -815bp se trouve un site de fixation pour le facteur de transcription YB-1. En -213, -500, -4000 et -4500bp, se trouvent des sites de fixation pour les protéines AP-2 (α, β et γ). Les formes α (rouge) et γ (violet) y formeraient le plus souvent des hétérodimères. Des sites de fixation pour AP-2 existeraient (?) également au niveau de l'intron 1 du gène ERBB2. Il existerait ainsi un lien avec ER (en rose) qui peut également fixer une séquence intronique. ER fixe cette séquence en compagnie de PAX2 (mauve).

cibler une altération dans un cancer avancé sera peu efficace. C'est ainsi que seulement 35% des patients avec un cancer métastatique surexprimant ERBB2 répondront au Trastuzumab seul. Les causes de résistance aux traitements sont nombreuses et d'autant multifactorielles, que le cancer est avancé. Les différents types de résistances sont nombreux et ne seront donc pas discutés. Enfin de nombreuses études prometteuses sont en cours et combinent différents traitements pour remédier à ces résistances, et renforcer les effets du traitement (Gonzalez-Angulo et al., 2006).

De plus, d'autres cibles sont à l'étude. C'est le cas par exemple d'ERBB3. ERBB2 doit interagir avec d'autres membres de la famille ERBB, et le fait préférentiellement avec ERBB1 et ERBB3. ERBB3 semble même indispensable comme partenaire de dimérisation avec ERBB2 pour la prolifération des cellules surexprimant ERBB2, car cette dimérisation enclenche l'activation de PI3K/Akt (Holbro et al., 2003). ERBB3 pourrait donc contribuer à une résistance thérapeutique pré-existante ou acquise et semble ainsi une cible thérapeutique potentielle (Stern, 2008).

I.2.3. Mécanismes moléculaires responsables de la surexpression du gène *ERBB2*.

La forte surexpression d'ERBB2 dans les cancers du sein est la conséquence de l'amplification du gène et de la dérégulation de la transcription (Hurst, 2001; Kraus et al., 1987; Yu and Hung, 2000). En effet, dans les cancers où le gène est surexprimé modérément, l'augmentation de la transcription est seule responsable de l'accumulation des quantités élevées de protéines dans la cellule cancéreuse. De plus, l'augmentation du taux de transcription est beaucoup plus importante que l'augmentation du nombre de copies du gène (Hollywood and Hurst, 1993; Pasleau et al., 1993). Dès lors, plusieurs équipes, dont la nôtre, se sont attachées à l'étude des mécanismes responsables de la surexpression du gène *ERBB2* dans les cancers du sein.

La Figure I. 5 présente les régions importantes pour la régulation de l'expression du gène ERBB2 :

- Les sites d'initiation de la transcription sont les suivants : un site majeur en +1bp (bp = paires de bases), un site mineur à -69bp, et un site lointain -12kb dont le mécanisme reste peu clair (Hurst, 2001; Nezu et al., 1999).

- La partie proximale du promoteur contient les boîtes **TATA** et **CCAAT**, situées respectivement -22 et -71bp en amont du site principal d'initiation de la transcription. Le site d'initiation en -69bp est dépendant de cette boîte TATA, et est préférentiellement régulé dans les cellules surexprimant ERBB2.
- Les séquences TATA et CAAT sont séparées par des séquences GGA répétées en miroir allant de -40 à -66bp. Celles-ci forment une **boucle D** en ADN Triplex. Ces boucles pourraient empêcher la fixation de l'ADN, via les séquences MAR (Matrix attachment region) à la matrice nucléaire (Scott et al., 2000).
- Immédiatement en aval de la boîte TATA, en position -30bp, se situe la séquence GAGGAA qui sert à la fixation pour des facteurs de la famille **Ets**. La mutation de cette séquence conduisant à la diminution de l'activité du promoteur, la fixation d'un facteur ETS a d'abord été considérée comme contribuant à la surexpression du gène (Scott et al., 1994). Par contre, d'autres (Xing et al., 2000) ont observé que la liaison du facteur **PEA3** à cette séquence inhibait l'activité du promoteur. De plus, la surexpression de PEA3 dans les cellules inhibait l'expression d'ERBB2. Ces auteurs ont proposé que la fixation de PEA3 pourrait empêcher l'accès d'autres protéines à la boîte TATA et inhiberait ainsi l'expression du gène. PEA3 permettrait également de déstabiliser la boucle D citée plus haut (Scott et al., 2000). L'expression de PEA3 semblait corrélée avec celle d'ERBB2 dans les cancers du sein (Benz et al., 1997; Myers et al., 2006; Xia et al., 2006b), mais d'autres études montrent qu'il n'en serait rien (Xia et al., 2006a). De plus, l'inhibition de PEA3 augmente l'expression d'ERBB2 dans des cellules résistantes au Tamoxifen (Yang et al., 2008).
- Plusieurs sites de fixation pour les facteurs trans de la famille **AP-2** sont présents dans le promoteur. Deux sites de fixation sont situés sur le promoteur proximal en -213bp (Bosher et al., 1995) et -500bp (Grootclaes et al., 1999; Vernimmen et al., 2003a) en amont du site principal d'initiation et ont un rôle activateur dans la transcription du gène *ERBB2*. Des sites de fixation dans une région distale du promoteur, en -4000 et -4500bp, jouent également un rôle activateur de la transcription (Delacroix et al., 2005). Enfin, des régions de fixation pour ces protéines sont présentes dans le premier intron du gène *ERBB2* (Newman et al., 2000).
- La protéine **YB-1** (Y-Box Binding Protein-1) a été découverte comme corrélée à la surexpression d'ERBB2 dans les cancers du sein. Ce facteur de transcription oncogénique interagit avec le promoteur du gène *ERBB2* en -815bp et augmente l'activité de ce promoteur (Wu et al., 2006). Cette protéine a aussi été montrée comme interagissant avec AP-2 sur le promoteur d'un autre gène (Mertens et al., 1998).

- Les **oestrogènes** répriment l'expression d'ERBB2 dans les lignées mammaires oestrogéno-dépendantes et des anti-oestrogènes augmentent l'expression d'ERBB2 (De et al., 1992; Grunt et al., 1995). De plus, la corrélation inverse d'expression entre le récepteur aux oestrogènes (**ER**) et ERBB2 a été montrée depuis longtemps (Borg et al., 1990; Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001). La régulation d'ERBB2 a été proposée comme indirecte par modification du rapport d'expression AP-2 α /AP-2 γ (Orso et al., 2004). Cependant l'intron 1 d'ERBB2 a été découvert comme important dans cette régulation (Bates and Hurst, 1997; Newman et al., 2000). Et récemment, il a été présenté que la protéine ER avec la protéine **PAX-2** fixerait une séquence intronique du gène ERBB2 et pourrait réguler l'expression de ce gène via cette région dans les lignées cellulaires MCF-7 (Hurtado et al., 2008).

La signalisation d'ERBB2 a aussi un effet sur l'activité et l'expression d'ER α (Stoica et al., 2003; Pietras et al., 1995; Grunt et al., 1995). Cette régulation croisée permet de mieux comprendre la résistance à l'hormonothérapie qui caractérise les tumeurs surexprimant ERBB2.

Comme mentionné plus haut, les facteurs de transcription AP-2 fixant les régions du promoteur d'*ERBB2* jouent un rôle dans la régulation de la transcription de ce gène. Pour certaines études, l'expression d'AP-2 α et AP-2 γ est corrélée avec celle d'ERBB2 dans les cancers du sein (Turner et al., 1998; Allouche A and Nolens G. et al., 2008; Pellikainen et al., 2004). Cependant, ces travaux sont controversés (Friedrichs et al., 2005; Gee et al., 1999b). L'expression d'AP-2 γ est également corrélée avec la résistance des cellules au Tamoxifen ; résistance observée dans les cellules surexprimant ERBB2 (Gee et al., 2009). Notre travail ayant porté sur le mécanisme par lequel AP-2 intervient dans la surexpression d'ERBB2, cette famille de facteurs de transcription est décrite dans la suite de cette introduction.

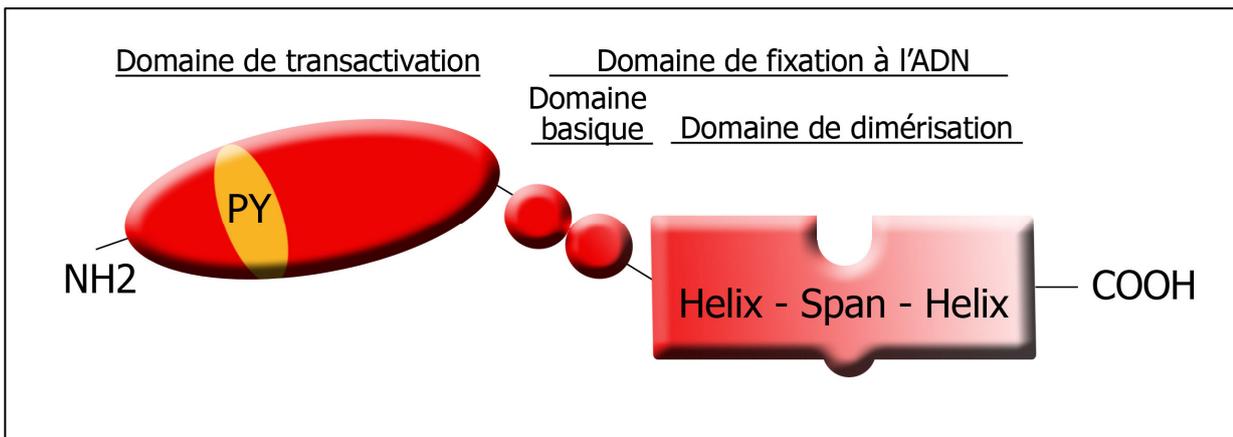


Figure I. 6. Structure schématique des protéines AP-2. Les protéines de la famille AP-2 ont 4 domaines importants. En N-terminal se trouve le domaine de transactivation qui permet la fixation et l'activation d'autres protéines (cofacteurs). Le motif PY est essentiel à cette transactivation. L'autre partie de la protéine fixe l'ADN. Dans ce domaine, se trouve une partie basique, qui procure une bonne fixation à l'ADN; et du côté C-terminal, se trouve le domaine de dimérisation, nécessaire à l'interaction avec une autre protéine de la famille AP-2. Ce domaine est principalement composé d'un motif Helix-Span-Helix (ou Hélice-Etendu-Hélice).

I.3. Les facteurs de transcription AP-2

La famille des facteurs de transcription AP-2 (activator protein-2) comprend cinq membres : **AP-2 α , β , δ , γ et ϵ** (Eckert et al., 2005) codés par des gènes différents. Ces protéines forment des homo- et hétéro-dimères pour se fixer sur des séquences spécifiques riches en GC. Ces facteurs de transcription contrôlent l'expression de nombreux gènes cellulaires et viraux.

Le premier facteur de transcription AP-2 α a été découvert dans les cellules HeLa. Cette protéine γ fixait le promoteur SV40 et hMt IIa (human metallothionein IIa) *in vitro*. Les autres membres de la famille ont été découverts par clonage par différentes équipes.

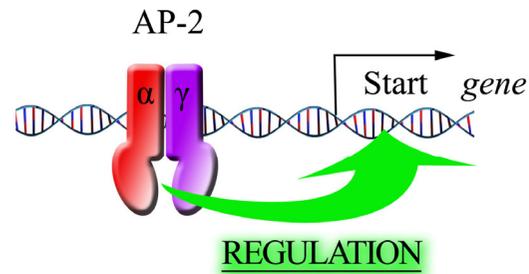
Par après, ces protéines ont été présentées comme importantes dans le développement embryonnaire, ainsi que dans la tumorigenèse de divers cancers, tels que le cancer du sein ou le médulloblastome (Hilger-Eversheim et al., 2000b; Eckert et al., 2005; Orso et al., 2004; Orso et al., 2008).

I. 3.1. Structure des protéines AP-2

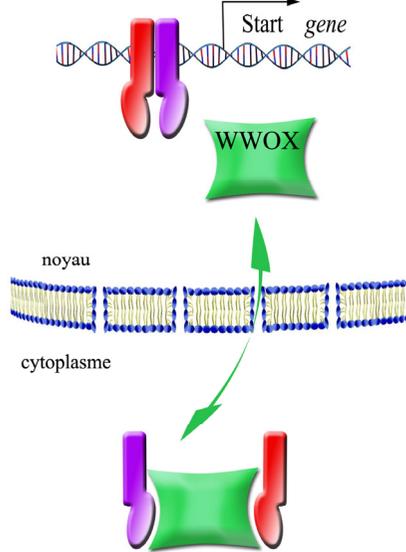
Toutes les protéines partagent un motif bien conservé de type « Helix-Span-Helix » dans leur partie **C-terminale** (Figure I. 6) (Eckert et al., 2005). Ce motif est composé d'hélices α amphipathiques importantes pour l'homo- ou l'hétéro- dimérisation des facteurs AP-2. Ces séquences sont également importantes pour la liaison à l'ADN, en collaboration avec la région basique adjacente. Ces régions confèrent aux protéines AP-2 une bonne affinité à l'ADN. Les dimères AP-2 se fixent sur des régions palindromiques telles que 5'-GCC(N)₃₋₄GGC-3', mais ces séquences peuvent varier un peu.

La moitié **N-terminale** des protéines AP-2 comporte le domaine de transactivation, riche en prolines et en glutamines. Un motif critique pour la transactivation γ est présent : le motif PY (PPYFPPPY).

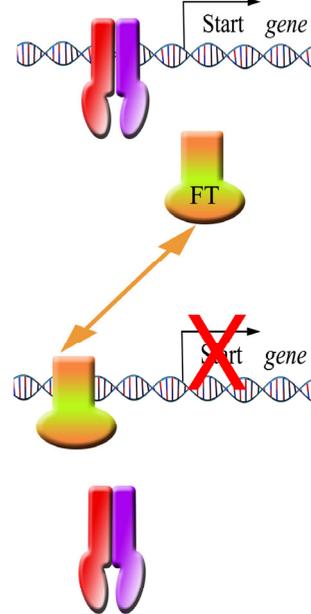
La protéine AP-2 δ se différencie des autres membres de la famille par la séquence du domaine de transactivation dont le motif PY est absent. En outre, l'affinité pour l'ADN d'AP-2 δ est moindre que celle des autres membres de la famille. Cela suggère que pour avoir son activité en tant que facteur de transcription, AP-2 δ doit transactiver les gènes d'une autre



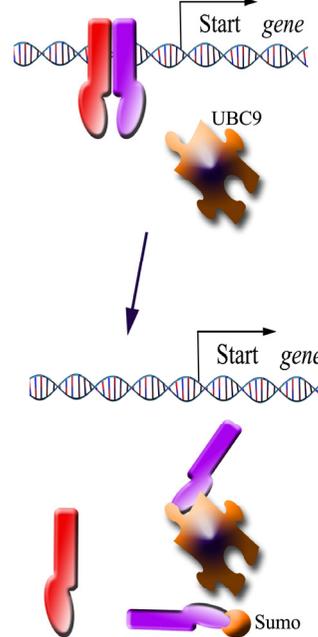
A. Délocalisation



B. Chevauchement



C. Modification



D. Cofacteurs

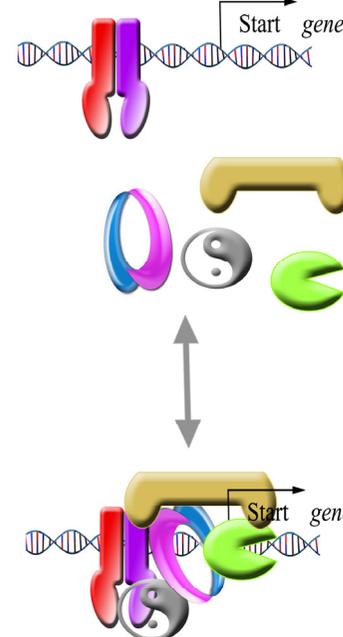


Figure I. 7. Représentation des mécanismes qui peuvent modifier l'activité transcriptionnelle des protéines AP-2. **A.** Les protéines AP-2 peuvent être maintenues dans le cytoplasme par les protéines WWOX. **B.** le site de fixation pour Un autre facteur de transcription (FT) peut chevaucher le site AP-2 et empêcher la fixation d'AP-2. **C.** Les protéines AP-2 peuvent être modifiées post-traductionnellement. Ainsi, la protéine UBC9 peut « sumoyler » la protéine AP-2 γ en N-terminal, empêchant son activité de transactivation. **D.** D'autres protéines, appelées cofacteurs peuvent également réguler l'activité transcriptionnelle d'AP-2 en s'y fixant de manière directe ou indirecte. Il existe encore d'autres moyens de régulation de l'activité d'AP-2, comme simplement sa propre régulation transcriptionnelle (non représentée ici).

façon, probablement en se dimérisant avec un autre membre de la famille AP-2 (Eckert et al., 2005).

I. 3.2. Activité transcriptionnelle d'AP-2 et sa régulation

Les facteurs de transcription AP-2 se fixent sur des séquences d'ADN, en s'homo- ou hétéro- dimérisant. Ensuite elles transactivent la machinerie transcriptionnelle afin de réguler l'expression du gène cible, lié à la séquence fixée.

Cependant, l'activité transcriptionnelle des facteurs AP-2 est modulée par différents mécanismes (Figure I. 7). Ceux-ci sont :

a. **la délocalisation dans le cytoplasme.** Celle-ci a été observée dans des cellules du cancer du sein. Les protéines WWOX peuvent interagir avec la protéine AP-2 γ . Si ces deux protéines sont exprimées, l'expression nucléaire d'AP-2 γ est alors délocalisée dans le cytoplasme (Aqeilan et al., 2004). Les protéines AP-2 ainsi délocalisées ne peuvent plus avoir leur activité transcriptionnelle.

b. **le chevauchement d'un site de fixation à l'ADN d'AP-2** avec celui d'un autre facteur de transcription. Deux sites de fixation pour des facteurs de transcription différents peuvent être très proches. Du fait de cette proximité, un seul des deux facteurs de transcription peut se fixer sur sa séquence et y exercer son activité activatrice ou répressive sur le promoteur. AP-2 α peut entrer en compétition avec un autre facteur de transcription. Elle peut alors, par exemple, agir comme un répresseur en **chevauchant des séquences** d'un facteur de transcription activateur, comme Myc sur le promoteur des gènes de la prothymosin- α (Jiang et al., 1998; Jiang and Lane, 2000; Gaubatz et al., 1995). Par conséquent, AP-2 α agit en « dés-activant » l'activité de ce promoteur en entrant en compétition avec Myc. Le contraire peut également se produire si l'autre facteur de transcription fixe cette séquence.

c. **les modifications post-traductionnelles.** L'activité des protéines AP-2 est modulée par des **modifications post-traductionnelles**. En interagissant avec l'enzyme UBC9 (ubiquitin conjugating enzyme 9), le facteur AP-2 γ est alors inhibé par la **sumolation** du résidu lysine K10, à l'extrémité N-terminale (Eloranta and Hurst, 2002). La **phosphorylation** du résidu sérine S239 des protéines AP-2 par la PKA a été découverte

mais seulement *in vitro* (Garcia et al., 1999). Cette phosphorylation a été suspectée *in vivo*, mais jamais démontrée clairement (Johnson, 1996; Popa et al., 2004; Iwamoto et al., 2007)

d. ***l'interaction avec d'autres facteurs de transcription ou des cofacteurs.***

L'activité transcriptionnelle d'AP-2 dépend de l'interaction avec d'autres facteurs de transcription ou des **cofacteurs**. L'objectif de ce travail étant l'identification de nouveaux cofacteurs, nous décrivons plus en détails les facteurs connus pour interagir avec les protéines AP-2 et pour moduler leur activité transcriptionnelle.

Ces différentes modulations de l'activité transcriptionnelle d'AP-2 diffèrent d'un type cellulaire à l'autre. Par conséquent, malgré la présence de ces protéines dans deux types cellulaires différents, leurs propriétés y seront souvent très différentes.

I. 3.3. Régulation de l'expression des gènes AP-2

Les promoteurs des gènes codant pour AP-2 α , - β et - γ ont été partiellement décrits (Bauer et al., 1994; Hasleton et al., 2003). **La régulation transcriptionnelle** (et post-transcriptionnelle) a surtout été étudiée pour AP-2 α et AP-2 γ . Le promoteur proximal d'AP-2 α est reconnu par les facteurs Oct-1, CTF/NF1 et AP-2 (Creaser et al., 1996). L'activité du promoteur d'AP-2 γ est quant à elle régie par trois sites de fixation pour les facteurs SP1 et SP3. Une séquence ERE consensus est également responsable d'une augmentation de la transcription d'AP-2 γ en réponse aux oestrogènes. L'acide rétinoïque (RA), le TNF- α , ou même encore les UVA et UVB peuvent moduler l'expression des protéines AP-2 α et/ou AP-2 γ (Kannan et al., 1994; Nyormoi et al., 2001; Ariizumi et al., 1996).

La régulation post-traductionnelle est également importante pour AP-2 α . Cette protéine peut être clivée par la caspase-6 puis dégradée par le protéasome (Nyormoi et al., 2001). Cependant, une déficience dans le protéasome induit l'accumulation des protéines AP-2 α dans des cellules du cancer du sein, corrélée à une augmentation de l'expression d'un gène cible, *ERBB2* (Li et al., 2006b).

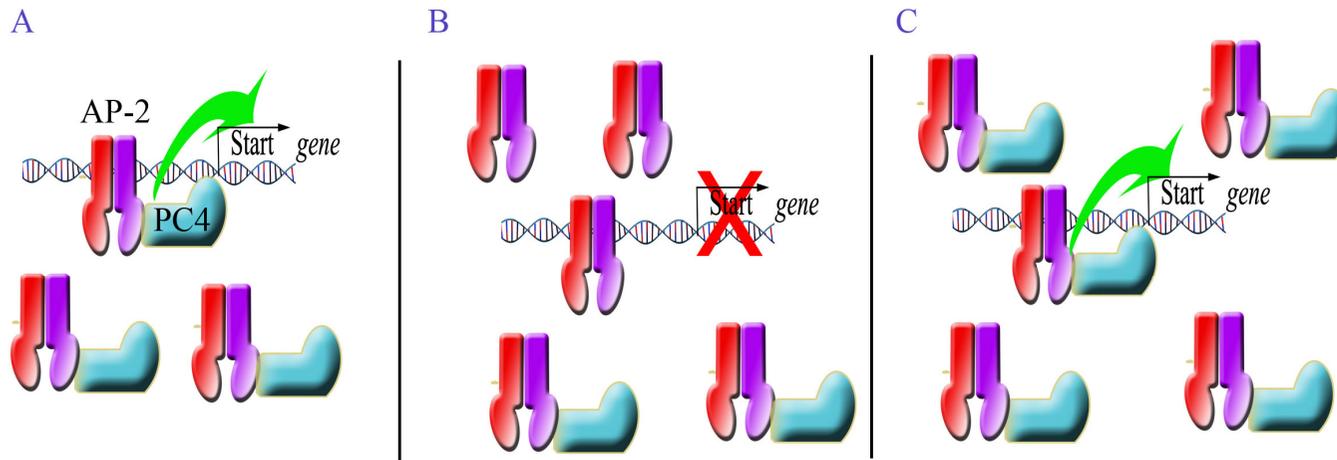
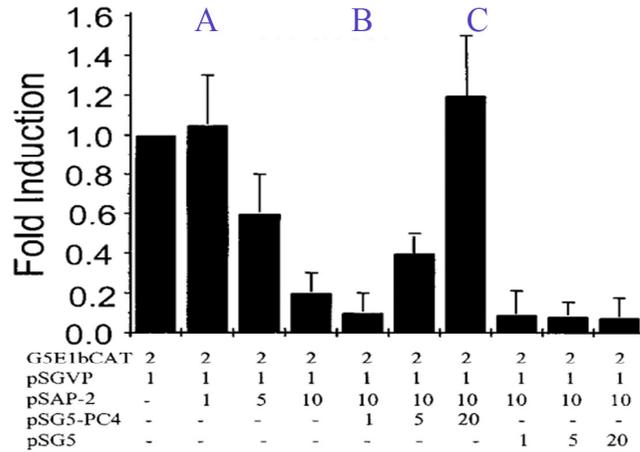


Figure I. 8. Représentation du mécanisme d'auto-interférence d'AP-2, observé par Kannan (Kannan et al. 1994, Kannan et al. 1999). Le graphique est repris des travaux de Kannan (1999). Il montre l'influence de la transfection croissante en AP-2 (pSAP-2), ainsi que de l'ajout de PC4 (pSG5-PC4) sur l'activité transcriptionnelle d'un vecteur rapporteur de la transcription par AP-2 (G5E1bCAT). Les différentes illustrations (A,B,C) schématisent les différentes parties du graphique correspondants. **A.** Le rapport AP-2/PC4 est suffisant pour activer la transcription. **B.** La transfection élevée en AP-2 réduit la proportion du complexe AP-2/PC4. Une forte réduction de la transcription est observée. **C.** La co-transfection de PC4 rétablit le rapport AP-2/PC4, et le niveau de transcription initial.

I. 3.4. Cofacteurs et protéines interagissant avec AP-2.

Comme mentionné plus haut, l'activité transcriptionnelle d'AP-2 peut être modulée via son interaction avec d'autres protéines que l'on appelle « cofacteurs ». Kannan et ses collaborateurs ont montré que la protéine AP-2 α avait besoin de ses cofacteurs pour avoir son activité transcriptionnelle optimale (Kannan et al., 1994; Kannan and Tainsky, 1999; Kannan et al., 1999). Ainsi, ils ont montré que lorsqu'AP-2 α est surexprimée artificiellement, l'activation de son promoteur **décroit** fortement, mais est **rétablie** par l'addition du cofacteur **PC4** (Figure I. 8) (Kannan and Tainsky, 1999). Cette répression transcriptionnelle observée peut être expliquée par une diminution de la proportion de complexe AP-2 α /PC4 lors de l'ajout trop important en AP-2 α . Les protéines AP-2 α n'ayant pas assez de protéines PC4, elles ne peuvent plus activer le promoteur. Ce phénomène est appelé « **auto-interférence** ». Par contre, il peut être levé par l'ajout de quantités suffisantes en PC4, ce qui rétablit la proportion adéquate en complexes AP-2 α /PC4 pour permettre l'activation du promoteur cible.

Ce phénomène d'auto-interférence met bien en évidence la nécessité qu'a le facteur de transcription AP-2 à interagir avec d'autres protéines. Un tableau récapitulatif renseigne les protéines interagissant avec AP-2 (Tableau I. 2). Néanmoins, les protéines identifiées comme cofacteurs importants dans la régulation de l'activité d'AP-2 vont être plus largement décrits :

Les protéines **PARP** et **PC4** (décrite ci-dessus) interagissent avec le facteur AP-2 α et augmentent son activité transcriptionnelle. Dans les cellules PA-1, l'auto-interférence d'AP-2 résultant de sa surexpression ou de l'activation de N-Ras est levée par la surexpression des cofacteurs PARP et PC4 (Kannan and Tainsky, 1999; Kannan et al., 1999; Zhong et al., 2003). Les interactions d'AP-2 avec PC4 et PARP requièrent des domaines différents.

Les coactivateurs de la famille **CITED** (p300/CBP interacting transactivator with ED-rich tail), CITED2 et CITED4, interagissent avec le domaine de dimérisation des membres de la famille AP-2, et augmentent leur activité transcriptionnelle (Bamforth et al., 2001; Braganca et al., 2002; Braganca et al., 2003). Les facteurs **p300** et **CBP** coactivent également AP-2 α en présence de CITED2 (Braganca et al., 2003). Notons que les souris knock-out pour les gènes AP-2 α , CITED2, p300 ou CBP développent toutes des anomalies du tube neural et du coeur.

Tableau I. 2. Protéines qui interagissent physiquement avec des protéines AP-2.

Protéine	Description	Domaine d'interaction d'AP-2	Conséquence de l'interaction	Référence
APC	Adenomatous polyposis coli	Région basique	Inhibition de l'activité transcriptionnelle de la <i>beta-catenin/TCF</i> , via AP-2 α	(Li and Dashwood, 2004)
Ash2l, ALR	Histone méthyltransférase	n.d.	Activation transcriptionnelle d' <i>Hoxc8</i> via AP-2 δ	(Tan et al., 2008)
CITED2	Coactivateur	D.D.	Activation transcriptionnelle via AP-2 α	(Braganca et al., 2003)
CITED4	Coactivateur	n. d.	Activation transcriptionnelle via AP-2 α	(Braganca et al., 2002a)
CDP	Répresseur transcriptionnel (CCAAT displacement protein)	D.L.A., D.D.	Répression du promoteur du gène codant l'histone H3.2 de hamster	(Wu and Lee, 2002)
DEK	oncoprotéine	n.d. , AP-2 α	Activation transcriptionnelle du gène <i>APOE</i> via AP-2 α	(Campillos et al., 2003)
E1A	Protéine transformante d'adenovirus	D.L.A, D.D.	Répression des gènes cibles d'AP-2	(Somasundaram et al., 1996)
Gas41	(co)facteur de transcription (glioma-amplified sequence 41)	C-Term.	Activation transcriptionnelle via AP-2 β	(Ding et al., 2006)
KCTD1	Répresseur Transcriptionnel	n.d.	Répression de la transcription d'AP-2 α	(Ding et al., 2009)
c-Myc	Facteur de transcription	C-Term.	Inhibition transactivation par AP-2	(Gaubatz et al., 1995)
PARP	PolyADP-ribose polymerase	C-Term.	Activation transcriptionnelle via AP-2 α	(Kannan et al., 1999)
PAX-6	Facteur de transcription	n.d.	Stimulation de l'activation de la gelatinase B, via AP-2 α	(Sivak et al., 2004)
PC4	Coactivator	Dom. transactivation (N-Term)	Activation transcriptionnelle	(Kannan and Tainsky, 1999)
P300/CBP	Histone acetyl-transférases	N-Term.	Activation transcriptionnelle via AP-2 α	(Braganca et al., 2002b)
p53	Facteur de transcription	n.d.	AP-2 α augmente la transcription dépendante de p53	(McPherson et al., 2002)
RAP74	Sous-unité du facteur de transcription TFIIIF	D.L.A.	inconnu	(Kannan et al., 1999)
Rb	Retinoblastoma – inhibiteur du cycle cellulaire	N-Term.	Répression du promoteur de l'hamster histone H3.2 via AP-2 α ; Activation transcriptionnelle du gène <i>E-cadherin</i>	(Wu and Lee, 1998; Batsche et al., 1998)
SP1	Facteur de transcription	Région basique	Activation transcriptionnelle du gène <i>CYP11A1</i> via AP-2 α	(Pena et al., 1999)
SV40T	Protéine transformante du virus SV40	n.d.	Bloque la liaison d'AP-2 à l'ADN	(Mitchell et al., 1987)
YB-1	Facteur de transcription	n.d.	Stimulation de la transcription de la <i>gelatinase A</i>	(Mertens et al., 1998)
YY1	(co)facteur de transcription	D.L.A., D.D.	Activation transcriptionnelle du gène <i>H3.2</i> et <i>ERBB2</i> via AP-2 α	(Wu and Lee, 2001; Begon et al., 2005)
WWOX	Suppresseur de tumeur	N-Term, région PY	Localisation cytoplasmique d'AP-2 γ	(Aqeilan et al., 2004)

Abbreviations : D.D. pour Domaine de dimérisation, D.L.A. pour Domaine de Liaison à l'ADN, C- ou N-Term. Pour Carboxy- ou Amino-Terminal, n.d. pour non-déterminé.

La protéine virale **E1A** réprime la transcription de certains gènes cellulaires en inhibant l'activité transcriptionnelle d'AP-2 (Somasundaram et al. 1996). Cette inhibition se produirait par l'interaction d'E1A avec le domaine de dimérisation et de fixation à l'ADN d'AP-2.

Notre équipe a montré que le facteur de transcription **YY1** (Yin Yang 1) augmente l'activité transcriptionnelle d'AP-2 α sur le promoteur du gène *ERBB2* (Begon et al., 2005). L'interaction implique la région N-terminale d'AP-2 α (Wu and Lee, 2001). De plus, nous avons prouvé que les protéines YY1 et AP-2 (α et γ) sont recrutées sur le promoteur d'*ERBB2*, et YY1 ne peut être recruté sur ce promoteur qu'en présence de ces protéines AP-2. Enfin, lorsque l'expression de YY1 est réduite dans les cellules BT-474 par transfection d'ARN antisens, l'activité transcriptionnelle d'AP-2 est réduite.

AP-2 α interagit avec le facteur de transcription **c-Myc**, et réprime l'activité de c-Myc sur les promoteurs des gènes de la prothymosine α et de l'ornithine décarboxylase du rat (Gaubatz et al., 1995). L'existence d'un site AP-2 chevauchant le site de fixation pour c-Myc engendre une compétition pour la fixation des deux facteurs sur le promoteur. Ce phénomène a été décrit plus haut. Cependant, l'interaction physique entre les deux protéines empêche également l'hétérodimère Myc/Max de fixer l'ADN. D'autres études, basées sur le promoteur de l'E-Cadhérine, montrent que l'activité du facteur de transcription AP-2 sur ce promoteur est modifiée par différentes quantités en c-Myc1 et c-Myc2 (Batsche et al., 1998; Batsche and Cremisi, 1999). Dans ce travail, les auteurs identifient également **Rb** comme un coactivateur d'AP-2.

AP-2 α interagit et modifie l'activité du facteur de transcription **Sp1**. Par exemple, Sp1 est un facteur de transcription pour le gène SYP11A1, mais nécessite l'interaction avec AP-2 α pour activer la transcription du gène dans les cellules trophoblastiques (Pena et al., 1999). Cependant, ce mécanisme diffère selon le type cellulaire. En effet, dans les glandes surrénales ou encore les ovaires, Sp1 interagira plutôt avec SF-1 pour activer la transcription de SYP11A1.

AP-2 α et AP-2 γ interagissent *in vitro* et *in vivo* avec la protéine **p53**, et cette interaction augmente l'expression du gène p21/CIP par p53 (McPherson et al., 2002;

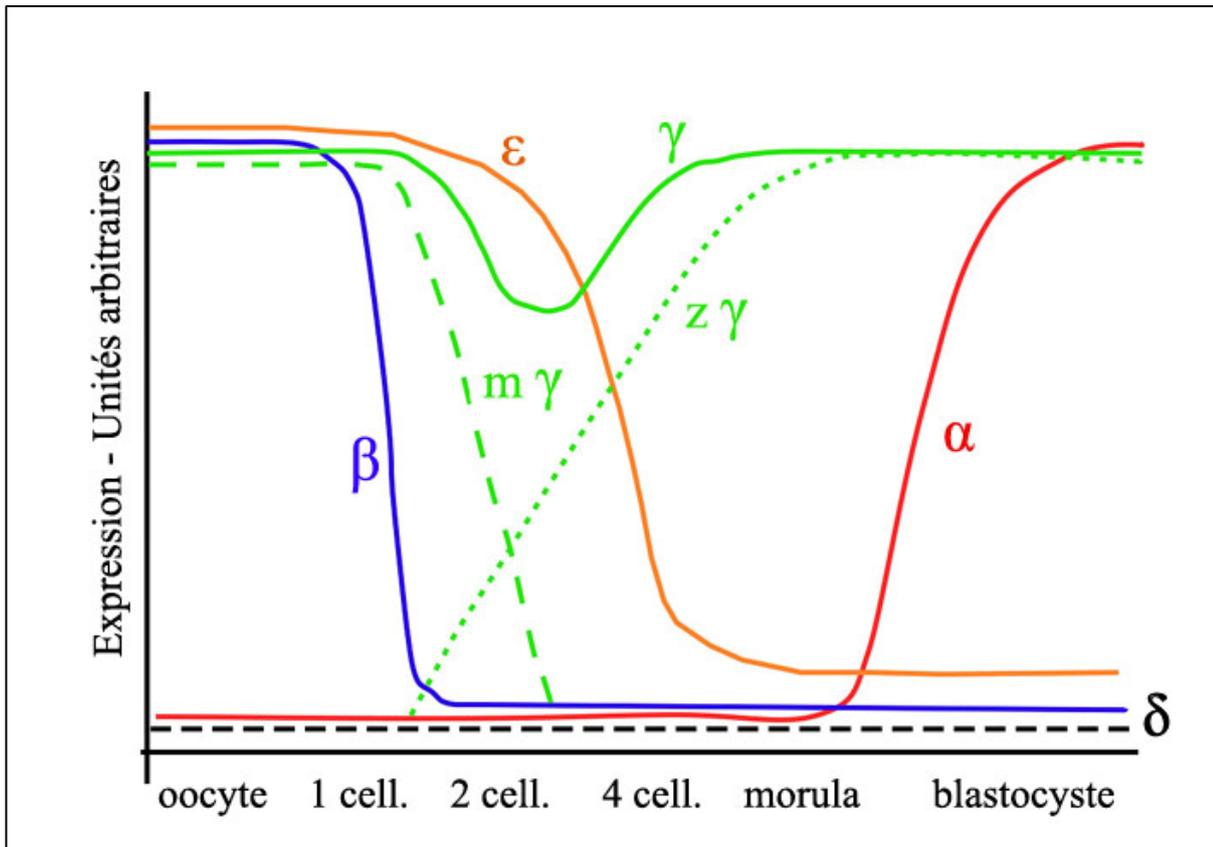


Figure I. 9. Ligne du temps de l'expression des gènes AP-2 durant le développement préimplantatoire chez la souris. selon Winger (Winger et al., 2006). Les profils des transcrits sont montrés pour les gènes codant pour AP-2 α (rouge), AP-2 β (bleu), AP-2 γ (vert), AP-2 δ (noir) et AP-2 ϵ (orange). Les résultats pour AP-2 γ sont divisés avec le composant maternel (m γ) et le composant du zygote (z γ).

Wajapeyee and Somasundaram, 2003). Cependant p53 augmente aussi l'expression des protéines AP-2 α et AP-2 γ dans des cellules de cancer sein (Li et al., 2006a).

I. 3.5. Rôles biologiques d'AP-2

I.3.5.a. AP-2 dans l'embryogenèse

Les protéines AP-2 contrôlent positivement ou négativement la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et dans l'apoptose. De plus, elles jouent un rôle important au cours du développement embryonnaire.

Différentes études ont montré l'importance des protéines AP-2 dans le développement embryonnaire de plusieurs espèces animales. Les protéines AP-2 sont d'abord impliquées dans le stade préimplantatoire chez la souris (Figure I. 9) (Winger et al., 2006). Ensuite, chez l'embryon, AP-2 α est exprimée principalement dans les cellules migratrices de la crête neurale chez la (Mitchell et al., 1991). De plus, la protéine AP-2 α est impliquée dans la différenciation du trophoblaste (Cheng and Handwerger, 2002). Plus tard dans l'embryogenèse, les protéines AP-2 α et AP-2 γ jouent un rôle important dans le développement de différents tissus nerveux périphériques mais également centraux, ainsi que le mésenchyme, l'épiderme, les tissus cardiaques, rénaux et urogénitaux, et encore les « fondations » de la glande mammaire (Hilger-Eversheim et al., 2000b; Friedrichs et al., 2007). Les souris knock-out pour AP-2 α , AP-2 β et AP-2 γ ne sont pas viables et meurent à la naissance suite à de nombreuses malformations (Pellikainen and Kosma, 2007). Un autre exemple de l'importance d'AP-2 dans l'embryogenèse est une mutation d'un site de fixation d'AP-2 α dans une séquence enhancer d'IRF6. Cette rupture de site de fixation est responsable de la formation d'un bec de lièvre (Rahimov et al., 2008).

I.3.5.b. AP-2 chez l'adulte

AP-2 est exprimé dans de nombreux tissus chez l'adulte. Ces protéines y sont essentielles pour maintenir une homeostasie cellulaire et jouer un rôle en tant que régulateur génique dans un équilibre entre la croissance normale et néoplasique (Eckert et al., 2005; Pellikainen and Kosma, 2007).

Dans les tissus adultes, l'expression des gènes de la famille AP-2 a été décrite, entre autres, dans l'épithélium de la glande mammaire, l'épithélium prostatique, les adipocytes et

les kératinocytes. Dans ces dernières, l'expression d'AP-2 α est associée à la **prolifération**, et serait perdue lors de la différenciation cellulaire (Mazina et al., 2001; Oyama et al., 2002; Popa et al., 2004; Zhang et al., 2003).

Par exemple, dans l'épiderme, AP-2 α réprime l'expression C/EBP α . AP-2 α est ainsi présent dans les couches profondes (répression de C/EBP α) alors qu'il est absent dans les couches superficielles et plus différenciées de l'épiderme (dépression/activation de C/EBP α) (Hilger-Eversheim et al., 2000a). Cette effet AP-2 α dépendant joue ainsi un rôle dans l'expression de kératines cibles (K3 et K10) de C/EBP α dans différentes régions de la peau.

I.3.5.c. AP-2 dans la régulation de la prolifération et de l'apoptose

Comme vu précédemment, **AP-2 α** est impliqué dans la différenciation cellulaire (p.e. dans la différenciation du trophoblaste) mais son expression peut également être corrélée à la prolifération cellulaire (p.e. dans les couches profondes de l'épiderme). D'autres exemples peuvent être cités dans le contexte de cellules cancéreuses. Ainsi, la surexpression d'AP-2 α n'augmente pas la tumorigenèse mais augmenterait la mort cellulaire dans les glandes mammaires de souris transgéniques (Zhang et al., 2003). Des études *in vitro* et même des études cliniques montrent AP-2 α plutôt comme un suppresseur de tumeur (Pellikainen and Kosma, 2007). Une voie possible dans ce rôle et son implication dans l'arrêt de la croissance, ainsi que dans l'apoptose, se ferait via l'induction du gène p21^{-waf} en interagissant avec p53 (Wajapeyee and Somasundaram, 2003), et/ou en réprimant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Wajapeyee et al., 2006). La surexpression d'AP-2 α est également corrélée à une meilleure réponse aux agents chimiothérapeutiques (ciblant la prolifération cellulaire) dans des lignées de cancer du sein et du poumon (Wajapeyee et al., 2005). Néanmoins, la plupart de ces résultats ont été obtenus dans des lignées où l'expression d'AP-2 a été induite artificiellement, et ne reflètent peut-être pas ce qui se passe dans des cellules surexprimant naturellement AP-2 α . Le clivage d'AP-2 α par la Caspase-6 (voir plus haut), semble aussi jouer un rôle critique dans l'apoptose induite par le TNF- α (Nyormoi et al., 2001). Plus récemment, l'extinction de la protéine AP-2 α par interférence à l'ARN (siRNA) a montré une dérégulation de p21, mais ne montre pas d'effet sur la croissance tumorale (Woodfield et al., 2007). Même si AP-2 α semble impliquée dans l'apoptose, les mécanismes exacts semblent encore peu clairs.

En opposition à la forme AP-2 α , la protéine **AP-2 γ** a plutôt été présentée comme diminuant la différenciation du trophoblaste et des cellules germinales, durant

l'embryogenèse (Pellikainen and Kosma, 2007). Cette protéine est préférentiellement exprimée dans les cellules germinales immatures en prolifération, lui suggérant un rôle oncogénique dans la cellule. Dans des souris transgéniques, AP-2 γ altère la différenciation cellulaire et augmente la prolifération cellulaire. Dans d'autres souris transgéniques surexprimant ERBB2 (Her2), l'expression d'AP-2 γ retarde l'apparition de tumeurs du sein, mais accélère la progression tumorale. A coté de cette observation, AP-2 γ induirait l'arrêt de la croissance cellulaire via p21-waf, à l'instar d'AP-2 α (Pellikainen and Kosma, 2007). L'extinction de la protéine AP-2 γ par siRNA, contrôle l'activité mitogène dans une lignée cellulaire mammaire MCF-7, et diminue également la croissance tumorale (Woodfield et al., 2007). Cependant le gène d'AP-2 γ est souvent amplifié dans les cancers du sein, et l'expression élevée qui en découle a été associée avec un pronostic pessimiste, lui suggérant un rôle dans la carcinogenèse mammaire.

En conclusion, des études se contredisent pour déterminer si les protéines AP-2 sont impliquées dans la prolifération cellulaire, ou plutôt dans l'apoptose ou encore dans la différenciation cellulaire (Pellikainen and Kosma, 2007). Leur rôle dans le cancer du sein est également controversé (Turner et al., 1998; Friedrichs et al., 2005).

Il est donc difficile d'attribuer un rôle précis des protéines AP-2 α et AP-2 γ dans la prolifération ou la différenciation cellulaire. Il faut également avoir à l'esprit qu'un cancer, dans un même tissu, sera différent d'un(e) patient(e) à l'autre, et le cancer du sein en est un bon exemple. C'est une des raisons pour laquelle de gros efforts sont réalisés dans la classification des cancers du sein (voir § I.2). De plus, il apparaît que les protéines AP-2 jouent un rôle dans la régulation de deux facteurs importants dans le traitement du cancer du sein : la réponse aux oestrogènes et l'expression d'ERBB2 (ou Her2).

I. 3.6. AP-2 dans le cancer du sein

Nous avons vu que les facteurs de transcription AP-2 peuvent réguler les promoteurs de nombreux gènes ayant un rôle central dans la croissance et la différenciation cellulaire. Cependant ces protéines peuvent jouer des rôles différents selon les gènes ciblés et le type cellulaire dans lesquelles elles sont exprimées. Le rôle suppresseur de tumeur ou, à l'inverse, oncogène de ces protéines dans le cancer du sein ou autres cancers, a été et est encore beaucoup discuté.

I.3.6.a. AP-2 dans la régulation oestrogénique

Les protéines AP-2 sont impliquées dans la régulation oestrogénique. Premièrement, la protéine AP-2 γ a été identifiée comme le facteur de transcription ERF-1 (estrogen receptor factor 1), impliqué dans l'expression du récepteur aux œstrogènes (McPherson et al., 1997). De plus, les protéines AP-2 α et AP-2 γ peuvent modifier la structure de la chromatine associée à la transcription d'ER α (Estrogen Receptor α), ainsi que transactiver son promoteur dans des cellules ER-négative (MDA-MB-231) (McPherson and Weigel, 1999). L'extinction de la protéine AP-2 γ induit également une répression d'ER, montrant le rôle essentiel qu'a cette protéine dans la régulation oestrogénique (Woodfield et al., 2007).

De plus, il existe une **boucle de régulation** entre les protéines AP-2 et les oestrogènes (via ER) (deConinck et al., 1995; Orso et al., 2004). Ainsi, les oestrogènes diminuent l'expression d'AP-2 α et augmentent celle d'AP-2 γ dans des cellules de cancers mammaires exprimant ER (ER+) (Orso et al., 2004). Cependant le mécanisme moléculaire reste encore à éclaircir.

La relation entre les protéines AP-2 et ER n'est pas encore bien claire dans les tumeurs primaires du sein. Différents travaux tendent à montrer une corrélation positive entre l'expression d'AP-2 α et ER, et aucune pour celle entre AP-2 γ et ER (Turner et al., 1998; Pellikainen et al., 2002; Gee, 2002; Friedrichs et al., 2005). En conclusion, il est encore trop tôt pour déterminer le rôle exact qu'ont les protéines AP-2 dans la régulation oestrogénique.

I.3.6.b. AP-2 dans la régulation du gène *ERBB2*

Comme mentionné au paragraphe I.2.3, les protéines AP-2 jouent un rôle important dans la surexpression du gène *ERBB2* dans les cancers du sein. Les protéines AP-2 jouent également un rôle dans l'expression d'ERBB1/EGFR (Johnson, 1996) et de ERBB3/Her3 (Skinner and Hurst, 1993).

L'implication des protéines AP-2 dans la surexpression d'ERBB2 a été montrée dans plusieurs lignées cellulaires (Bosher et al., 1995; Bosher et al., 1996; Grootclaes et al., 1999; Vernimmen et al., 2003a; Vernimmen et al., 2003b; Delacroix et al., 2005; Li et al., 2006b). Comme cité précédemment, le promoteur ERBB2 contient plusieurs **sites de fixation** pour les protéines AP-2 (Figure I.5).

Les protéines AP-2 α et AP-2 γ sont surexprimées dans les lignées de cancers du sein surexprimant ERBB2 (Bosher et al., 1996; Grootclaes et al., 1999). Les mécanismes responsables de l'accumulation de quantités élevées de protéines AP-2 reste peu clairs. Selon Kannan et ses collaborateurs, ce serait surtout le déficit de la dégradation des protéines AP-2 qui conduirait à l'accumulation des facteurs et induit la surexpression d'ERBB2 (Li et al., 2006b). Cependant un autre paramètre important pour la surexpression d'ERBB2, serait qu'il existe des cofacteurs de transcription spécifiques pour AP-2, comme PC4, décrits précédemment. La stabilité de la protéine AP-2 pourrait être en partie expliquée par la présence de ces cofacteurs. En effet, des cofacteurs peuvent stabiliser leur facteur de transcription cible et empêcher sa dégradation (Vervoorts et al., 2003; Xenaki et al., 2008). Ces cofacteurs pourraient ainsi stabiliser les dimères AP-2 sur le promoteur d'*ERBB2*, et contribuer à la surexpression d'*ERBB2*.

Dans des séries d'études cliniques, la relation entre l'expression des protéines AP-2 et ERBB2/Her2 a été reportée à plusieurs reprises. Une association positive entre l'expression nucléaire d'AP-2 α et celle d'ERBB2 a été mise en évidence, alors qu'il n'y en avait pas avec l'isoforme AP-2 γ (Turner et al., 1998; Friedrichs et al., 2005). Cette association a également pu être observée dans différents sous-groupes de cancers du sein (Pellikainen et al., 2004). Cependant, une étude contradictoire a montré une corrélation inverse d'AP-2 α et AP-2 β avec l'expression d'ERBB2, ainsi qu'avec ERBB3, dans les tumeurs ERBB2 positives (Gee, 2002). En parallèle aux études *in vitro*, la plupart des études cliniques montrent une association entre les hauts niveaux d'expression d'AP-2, plus souvent AP-2 α , et la surexpression d'ERBB2 dans les cancers du sein (Pellikainen and Kosma, 2007).

Outre le gène ERBB2, les gènes **IGF-II**, **IGF-1R**, **ECAD** et **ERBB3**, impliqués dans la croissance et la différenciation des cellules épithéliales mammaires, seraient également régulés par les facteurs de la famille AP-2 (Batsche and Cremisi, 1999; Skinner and Hurst, 1993; Zhang et al., 2003; Turner et al., 1998). Il faut rappeler que le récepteur ERBB3 est le partenaire préférentiel de dimérisation d'ERBB2. À eux deux, ces hétérodimères transduisent un signal mitogénique puissant. L'inactivation d'AP-2, par l'utilisation d'un dominant négatif dans une lignée de cancer mammaire inhibe l'expression du gène *ERBB3*, et diminue la prolifération cellulaire ainsi que la formation de colonies (Zhu and Domann, 2002). L'ensemble de ces données a ainsi conduit à l'association d'AP-2 avec la néoplasie mammaire.

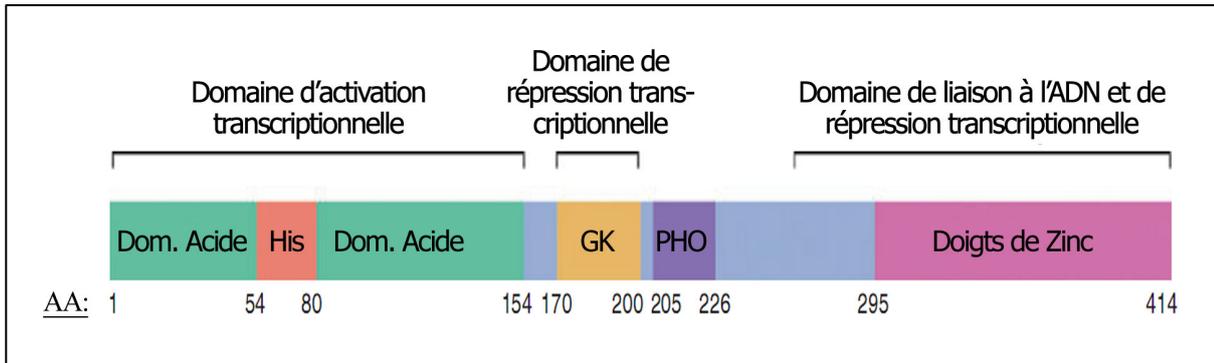


Figure I. 10. Illustration schématique des différents domaines situés dans la protéine YY1. Dérivé du modèle de He et Bonnefi (He and Casaccia-Bonnefil, 2008). Du côté N-terminal (acide aminés 1-154), se trouve un domaine acide responsable de son rôle d'activation transcriptionnelle. Celui-ci contient également un domaine riche en Histidine (His) (acide aminés 54-80). Au centre se situe un domaine riche en Glycine en Lysine (GK) (acide aminés 170-200), qui permet l'interaction avec les HDAC. Ce domaine ainsi que celui en C-terminal constitue le domaine répresseur de la protéine. Entre ces deux domaines (acide aminés 205-226), se situe une région appelée PHO qui permet l'interaction avec les protéines Hox homeobox. Enfin, 4 motifs en doigt de Zinc (acide aminés 295-414) permettent à la protéine de se lier à l'ADN.

I.4. Les protéines YY1

Comme cité précédemment, la protéine « **Yin Yang1** » (YY1) est un des cofacteurs connus pour AP-2. Cette protéine nucléaire et ubiquitaire doit son nom à ses rôles multiples, YY1 pouvant agir comme **répresseur** ou comme **activateur** et comme initiateur de la transcription.

Une partie du travail présenté dans ce manuscrit met en évidence une corrélation entre l'expression des protéines YY1, AP-2 α et p185-ERBB2 dans des tumeurs primaires du sein. Nous y rapportons également une contribution de la protéine YY1 avec les protéines AP-2 α et AP-2 γ sur l'expression d'ERBB2 endogène. Un résumé sur cette protéine est décrit dans cette introduction.

I.4.1. Structure de la protéine YY1

Cette protéine d'environ 44kDa, comporte différentes régions responsables de ses différentes propriétés répressives ou activatrices (Figure I. 10) (He and Casaccia-Bonnel, 2008; Gordon et al., 2006). En **C-terminal**, se trouvent 4 motifs en doigt de Zinc de type C2H2 responsables de la liaison d'YY1 à des motifs d'ADN assez peu spécifiques : 5'-(C/g/a)(G/t)(C/t/a)CATN(T/a)(T/g/c)-3'. La partie **N-terminale** contient une région riche en histidines, et un domaine acide, formant le domaine de **transactivation**. Cette région constitue le domaine activateur de la protéine. Le **centre** de la protéine est riche en glycines et en lysines, et correspond aux domaines d'interaction avec les histones deacetylase (HDAC). Ce domaine et la région C-terminale forment le domaine de **répression** transcriptionnelle. Une courte région dans le domaine central, appelée PHO (pleiohomeotic homology region) permet l'interaction avec les protéines Hox.

YY1 module la transcription par différents mécanismes :

- YY1 est un **facteur de transcription** qui peut se fixer sur une séquence activatrice, ou juxtaposant celle d'un autre facteur de transcription (activateur ou répresseur) (Figure I. 11.A). Ce phénomène a été observé sur le promoteur du gène *s-fos* ou encore sur un motif MRE de l' α -actin (Gordon et al., 2006).
- YY1 peut agir comme un **facteur de transcription** avec un rôle de **cofacteurs**. Il interagit avec une séquence d'ADN et également avec un autre facteur de transcription dont il module l'activité sur le promoteur cible (Figure I. 10. B). Le

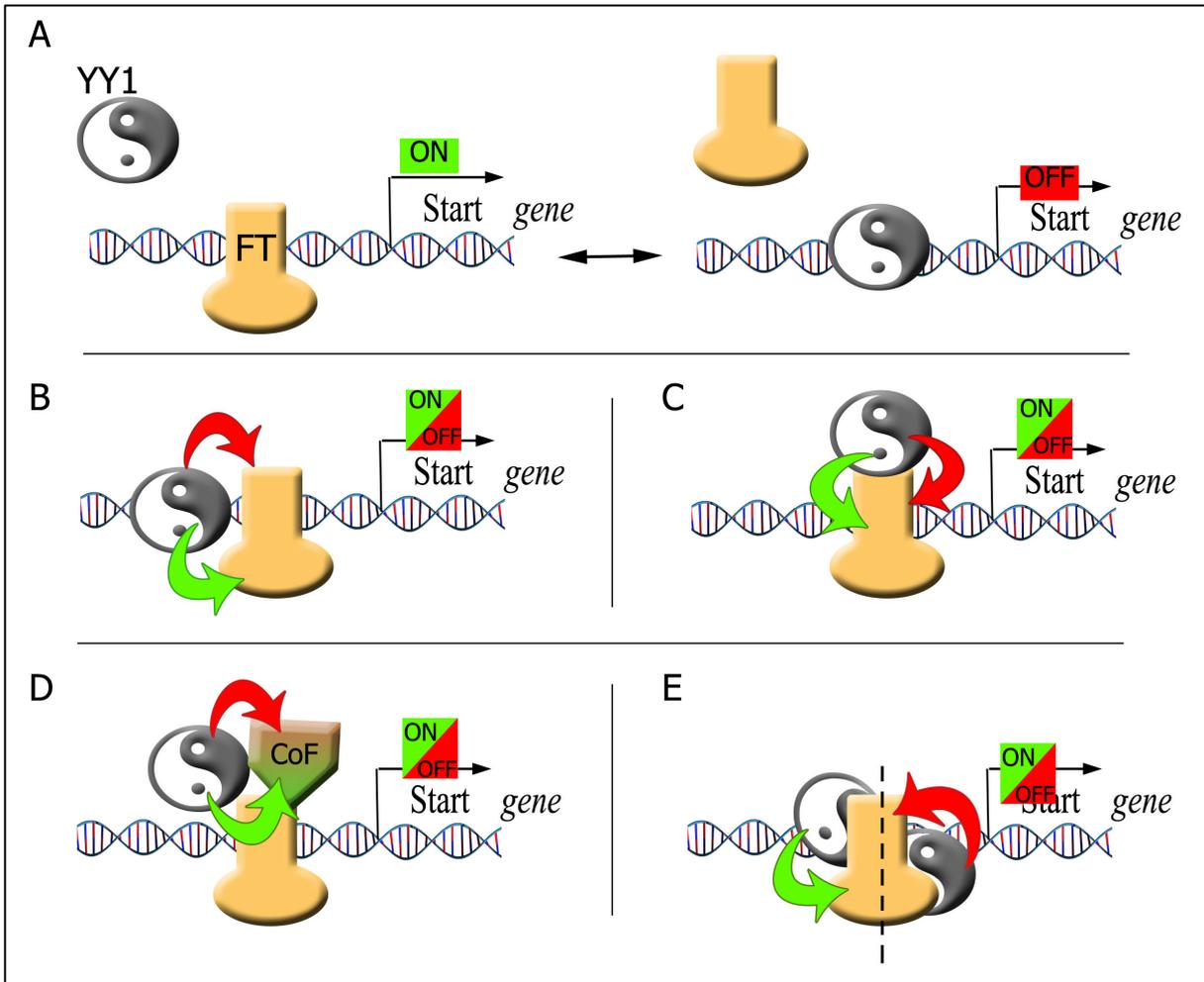


Figure I. 11. Représentation de différents mécanismes par lesquels YY1 va influencer, positivement ou négativement, la transcription d'un gène via son promoteur. A. Ying-Yang-1 (YY1) peut inhiber la transcription d'un gène en chevauchant un site de fixation d'un facteur de transcription (FT) activateur dans ce cas (ON). Après fixation d'YY1, le gène sera réprimé (OFF). **B.** YY1 peut également se fixer sur le promoteur du gène, et interagir avec un facteur de transcription. YY1 pourra avoir soit un effet positif (flèche verte) ou négatif (flèche rouge) sur l'activité activatrice ou répressive du facteur de transcription ciblé. **C.** Même chose que le point B, mais YY1 interagit directement avec le facteur de transcription, et non avec l'ADN. **D.** Même chose que le point B et C, à l'exception que l'effet d'YY1 passe d'abord par un autre cofacteur (CoF), avant d'avoir un effet sur le facteur de transcription. **E.** Un modèle supplémentaire a également été proposé. Le FT pourrait masquer le domaine C- ou N-Terminal d'YY1, ce qui aurait un effet activateur ou répresseur sur le facteur de transcription cible.

gène *c-fos* contient ainsi une séquence de fixation pour YY1 et ce dernier interagit avec CREB qui se fixe ailleurs sur ce promoteur (Guo et al., 1997).

- YY1 peut agir comme **cofacteur** pour un facteur de transcription. Il va interagir directement avec un facteur de transcription pour moduler son activité transcriptionnelle sur un gène cible (Figure I. 10. C). Ainsi, YY1 active le facteur de transcription AP-2 α sur le promoteur d'*ERBB2* (Begon et al., 2005).
- Le cofacteur YY1 peut voir son activité modulée par son interaction avec un **co-activateur** ou un **co-répresseur** (Figure I. 10. D). GATA1 augmente l'activité répressive d'YY1 sur le gène e-globin (Raich et al., 1995), tandis que GATA4 augmente l'activité activatrice d'YY1 sur le promoteur du peptide Natriuretic de type B (BNP) cardiaque (Bhalla et al., 2001). Certaines HAT (Histone Acetyl Transferase) comme CBP et p300, sont connues aussi connues comme co-activatrices importantes d'YY1. Rappelons que ces dernières sont également connues comme co-activatrices d'AP-2 (voir § I.3.4)
- L'activité répressive ou activatrice d'YY1 peut être modulée en **masquant** ou démasquant son domaine activateur (N-Terminal) ou répresseur (C-Terminal) (Figure I. 10. E). Ce modèle propose que la protéine avec laquelle YY1 interagit peut masquer tel ou tel domaine d'YY1, conduisant à une activation ou à une répression d'YY1 sur sa cible (Thomas and Seto, 1999; Gordon et al., 2006).

La séquence d'YY1 est bien conservée entre les espèces. Cette protéine est exprimée de manière ubiquitaire dans différents tissus comprenant le cerveau, le cœur, les membres ou encore le système immunitaire (He and Casaccia-Bonnel, 2008; Gordon et al., 2006). Son promoteur contient beaucoup de similarités avec ceux des gènes domestiques et des gènes relatifs à la croissance cellulaire. Ceci suggère qu'YY1 est important dans le développement. En effet l'ablation génétique d'*Yy1* chez les souris conduit à une mort précoce de l'embryon après l'implantation.

I.4.2. Rôles biologiques d'YY1

Cette protéine, comme facteur de transcription, peut réguler une grande variété de gènes cellulaires et viraux (Gordon et al., 2006).

Un exemple de la complexité du fonctionnement d'YY1 est celui de son rôle dans la **prolifération cellulaire**. La fonction d'YY1 dans la prolifération cellulaire est en effet

controversée (He and Casaccia-Bonnel, 2008). YY1 a d'abord été suggéré comme favorisant la prolifération cellulaire, à l'aide de cellules déficientes en YY1 (Sui et al., 2004). Cette hypothèse a été soutenue par des études montrant des hauts niveaux d'YY1 dans des tissus de cancer de la prostate. Ensuite, YY1 fut montré comme inhibiteur de la prolifération dans des cellules de cancer du sein, MCF-7 et ZR75.1, parce qu'il réprime l'expression de la cycline D1, un régulateur essentiel du cycle cellulaire (Cicatiello et al., 2004). Enfin, des études *in vivo* dans des souris, ont montré que le rôle qu'a YY1 dans des cellules progénitrices d'oligodendrocytes est indépendant du cycle cellulaire (He et al., 2007). Ces différentes études laissent donc penser que le rôle d'YY1 dans la prolifération dépend du type cellulaire.

Pour renforcer cette idée, il semblerait que le rôle d'YY1 dans la **différenciation** dépend également du type cellulaire (He and Casaccia-Bonnel, 2008). Dans des cellules myoblastique, C2C12, l'inhibition d'YY1 conduit à l'expression de gènes spécifiques de la différenciation musculaire, comme l'actine- α squelettique. YY1 réprime la différenciation des kératinocyte, alors qu'il joue un rôle opposé dans le système lymphoïde et dans les oligodendrocytes.

Cette diversité est également remarquée dans l'**apoptose** cellulaire (He and Casaccia-Bonnel, 2008) YY1 exerce des fonctions anti-apoptotique en dérégulant la dégradation de p53 dans des cellules lymphoïdes, alors que l'extinction d'YY1 augmente p53, et donc induit l'apoptose dans des cellules de carcinome embryonnaire (Sui et al., 2004). Par contre, YY1 n'a aucun effet sur l'expression de p53 dans les oligodendrocytes (He et al., 2007).

Outre sa capacité à réguler la transcription de nombreux gènes, YY1 a également été présentée comme jouant un rôle dans la **réparation de l'ADN**. Des études ont montré une stimulation accrue de la PARP-1 (poly-(ADP-ribose) polymerase-1) dans les cellules HeLa surexprimant YY1. La PARP-1 module la réparation de l'ADN et YY1 stimule son activité catalytique (Oei and Shi, 2001).

Comme décrit précédemment, YY1 est également connu comme **cofacteur** de transcription. Il interagit avec d'autres facteurs de transcription et peut réguler leur activité, positivement ou négativement (Gordon et al., 2006). De par cette propriété, il peut modifier l'activité de nombreux gènes importants dans l'homéostasie cellulaire. YY1 est ainsi connu comme co-activateur pour la protéine E1A sur le promoteur P5, ou encore pour la protéine

AP-2 α sur le promoteur d'ERBB2 (voir § I.3.4). Il peut également être co-répresseur, comme pour les protéines CREB et Sp1 en les empêchant d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle, ou encore en interagissant avec les protéines Ku (Ku70 et Ku80) et inhibant l'expression du gène de la chaîne lourde de l' *α -myosin* (Sucharov et al., 2004).

I.4.3. YY1 dans les cellules de cancer du sein

Cette protéine ubiquiste a été rapportée comme ayant un rôle dans de nombreux cancers (Gordon et al., 2006). Dans des lignées de cancers du sein, il a déjà été mentionné qu'YY1 est un cofacteur d'AP-2 α . Celui-ci interagit comme cofacteur avec le facteur de transcription AP-2 α sur le promoteur du gène *ERBB2*, dans les cellules BT-474 (Begon et al., 2005). La co-expression d'YY1 et d'AP-2 α augmente l'activité de ce promoteur. YY1 joue aussi un rôle dans la prolifération de cellules dérivées de cancer du sein, en interagissant avec HDAC1 (Cicatiello et al., 2004) et HDAC2 (Sun et al., 2007). Elle serait également importante dans la migration cellulaire via la régulation du gène CXCR4, impliqué dans la formation de métastases (Lee et al., 2005). Rappelons que la protéine YY1 a été identifiée comme répresseur de l'expression de la cycline D1 dans les lignées de cancers du sein, ZR-75.1 et MCF-7.

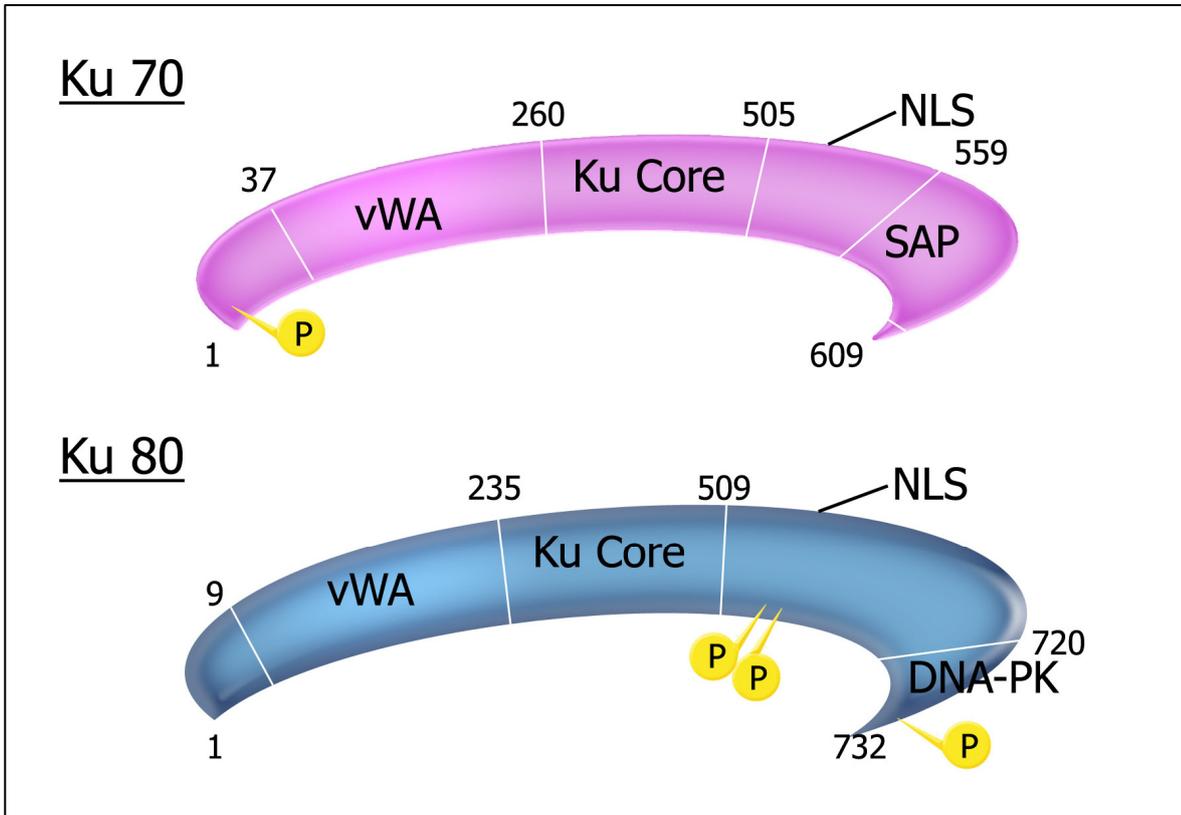


Figure I. 12. Illustration schématique de la structure des protéines Ku70 et Ku80, (dérivé de Lees-Miller and Meek, 2003). Les chiffres indiquent les acides aminés. Les lettres **P** indiquent les sites de phosphorylation : serine 6 dans Ku70; sérines 577 et 580, thréonine 715 dans Ku80. Les domaines "**Ku-core**", sont conservés. Ce sont les domaines de liaison à l'ADN. Le domaine **SAP** en C-terminal de Ku70 est impliqué dans le remodelage de la chromatine. Des domaines de von Willebrand (**vWA**) ont été identifiés dans Ku70 et Ku80. Les régions C-Terminals sont importantes pour leur propriété hélicase. L'extrémité C-terminale de Ku80 est requise pour l'interaction avec les **DNA-PKs**. La séquence **NLS** est nécessaire à localisation nucléaire des deux protéines.

I.5. Les protéines Ku

Sous le nom de « protéines Ku » nous entendons les protéines Ku70 et Ku80 (ou Ku86). Les deux protéines Ku ont été identifiées comme des auto-antigènes chez des patients souffrant de lupus érythémateux, et présents en grande quantité chez ces patients (Mimori et al., 1981; Yaneva and Arnett, 1989). Le nom de « Ku » correspond aux deux premières lettres du nom du patient à l'origine du sérum de référence (Mimori et al., 1981; Francoeur et al., 1986). Pour fonctionner, elles forment des hétérodimères Ku70/Ku80, et s'associent en général à la protéine DNA-PK.

Le gène codant **Ku80** est identique au gène ***XRCC5*** (x-ray-sensitive group 5 complementing), découvert dans une lignée de cancer de l'ovaire du hamster déficiente dans les processus de réparation des cassures double brins d'ADN. Plus tard le gène codant **Ku70** a été identifié comme étant le gène ***XRCC6***, et **DNA-PK** comme ***XRCC7***.

Les protéines Ku se fixent aux extrémités libres de l'ADN (Reeves, 1985; Mimori and Hardin, 1986) et le déroule, ce qui leur a valu le nom d'hélicase II ATP dépendante (Tuteja et al., 1994). Les protéines Ku fixées à l'ADN recrutent la DNA PK, ainsi que d'autres protéines impliquées dans la **réparation de l'ADN**, et dans les recombinaisons **V(D)J** (Featherstone and Jackson, 1999c; Lee et al., 1996; Lees-Miller and Meek, 2003).

Les protéines Ku jouent un rôle dans la **stabilisation des télomères**. Elles interagissent avec la télomérase avec laquelle elles collaborent dans le processus d'élongation des télomères. Elles ont également un rôle dans la **réplication de l'ADN et le cycle cellulaire**. Les protéines Ku ont plus récemment été décrites comme pouvant agir sur la **transcription** de gènes en interagissant avec des facteurs et cofacteurs de transcription. Ces différents rôles sont décrits plus loin.

Bien que leurs expressions soient principalement nucléaires, Ku70 et Ku80 sont également exprimées dans le cytoplasme ainsi qu'à la surface membranaire, et y ont un rôle dans l'**adhésion cellulaire** et la protéolyse de la matrice extracellulaire (Muller et al., 2005). Leur localisation dépend également de la phase du cycle cellulaire, et il semblerait que selon le stade du cycle, ces protéines ne soient pas toujours associées entre elles (Koike, 2002).

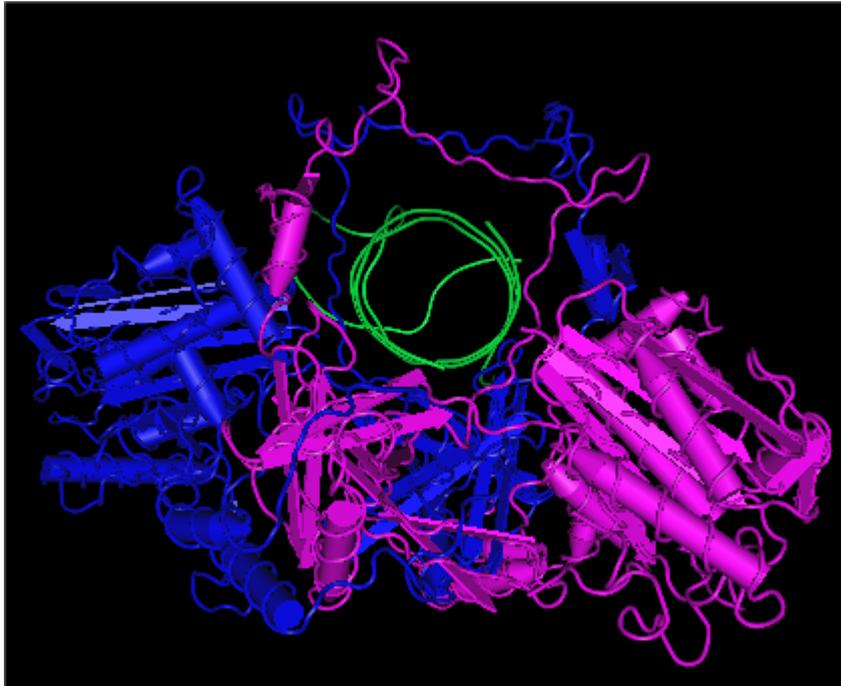


Figure I. 13. Structure cristallographique des protéines Ku fixant l'ADN. Ku80 est illustré en bleu, Ku70 en rose, et l'ADN en vert. Cette structure permet de visualiser la formation la boucle formée par le dimère Ku70-Ku80 autour de l'ADN. (Image dérivée de (Walker et al., 2001).

Enfin, ces informations sur les protéines Ku ont conduit à des études sur leurs implications dans les cancers (Gullo et al., 2006).

I.5.1. Structure des protéines Ku

L'hétérodimère Ku se compose d'une sous-unité de 73kDa (Ku70) et d'une sous-unité de 86kDa (Ku80) (Figure I. 12). Les 2 protéines Ku lient l'ADN par l'intermédiaire du domaine **Ku core**. Ce domaine a une organisation structurale proche dans les 2 protéines Ku. Proche de l'extrémité N-terminale, les deux protéines possèdent un domaine von Willebrand (**vWA**) nécessaire aux interactions protéine-protéine, par exemple avec HP1 α (Song et al., 2001) ou Runx3 (Tanaka et al., 2007)(voir plus loin).

La région C-terminale de Ku80 permet l'interaction de l'hétérodimère avec la DNA-PK, importante dans la réparation de l'ADN. Le domaine **SAP** C-terminal de Ku70 contient un motif de liaison à l'ADN qui serait impliqué dans l'organisation chromosomique et le remodelage de la chromatine (Barlev et al., 1998; Featherstone and Jackson, 1999b) .

La sérine 6 de Ku70, les sérines 577 et 580 ainsi que la thréonine 715 peuvent être phosphorylées par les DNA-PK. La phosphorylation est impliquée dans le détachement des protéines Ku de l'ADN (voir § I.5.2).

Les deux protéines contiennent également une séquence **NLS** leur permettant d'être transportées dans le noyau via des récepteurs nucléaires.

Les protéines Ku se fixent à l'ADN sous la forme d'hétérodimère Ku. Elles vont former une boucle qui encercle l'hélice d'ADN (Figure I. 13). Le point isoélectrique des protéines Ku est plus bas (6,2 pour Ku70 et 5,5 pour Ku80) que celui de la plupart des protéines interagissant avec l'ADN. Plusieurs auteurs, sur base de différents travaux, de la structure des protéines Ku et de leurs propriétés chimiques, proposent que ces protéines interagiraient, mais faiblement, avec l'ADN via le domaine SAP de Ku70, puis « glisseraient » sur l'ADN (Doherty and Jackson, 2001; Downs and Jackson, 2004). Ces protéines serviraient ainsi de « guide » dans leurs différents rôles impliquant l'ADN.

I.5.2. Les protéines Ku dans la réparation de l'ADN

Les protéines Ku sont impliquées dans la réparation des cassures double-brins de l'ADN par le processus de jonction non homologue de brins d'ADN, **NHEJ** (Non-homologous end

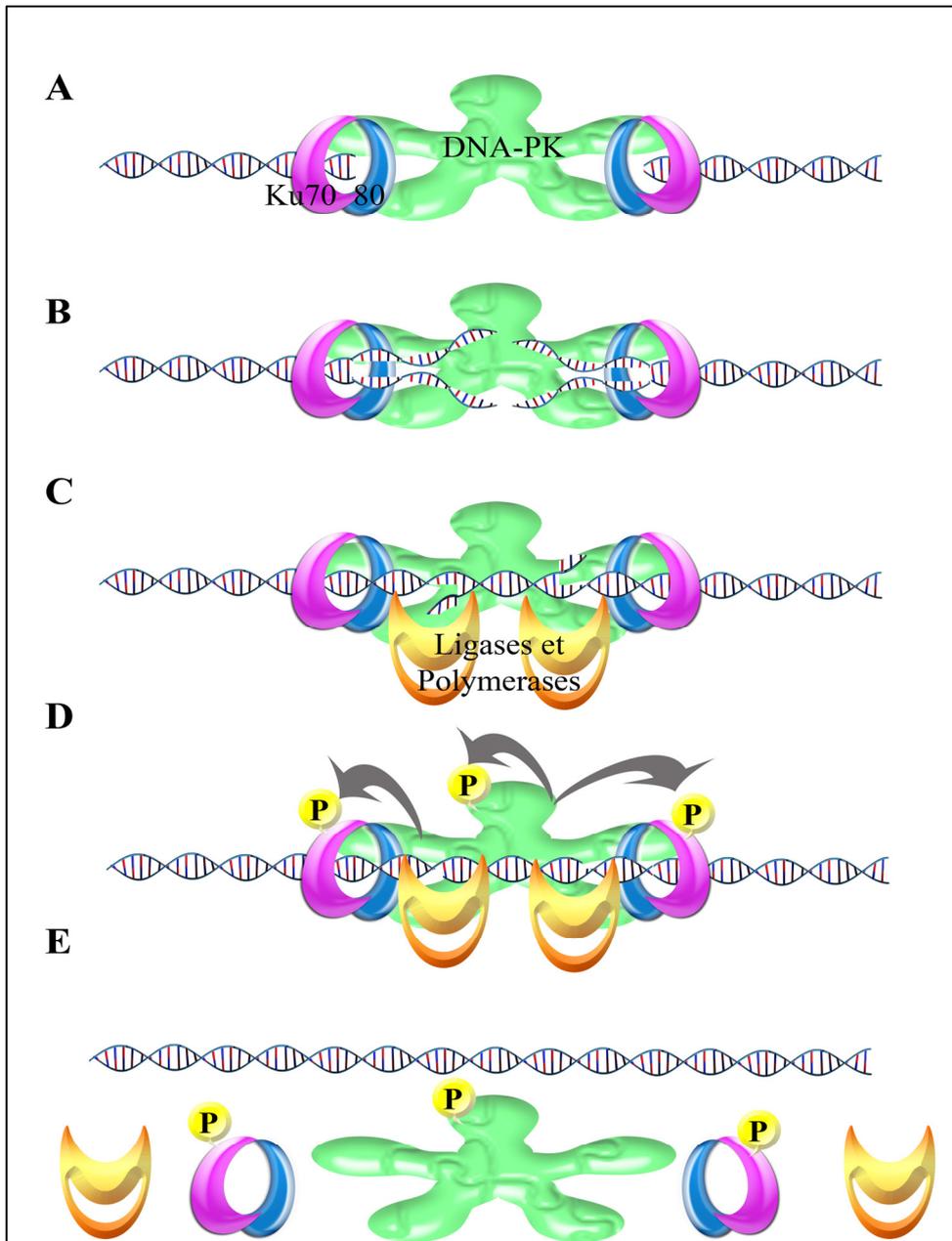


Figure I. 14. Les protéines Ku sont impliquées dans la réparation de l'ADN par le processus de jonction non homologue de brins d'ADN, NHEJ. (Dérivé de (Collis et al., 2005; Featherstone and Jackson, 1999)). En rose et bleus sont respectivement les protéines Ku70 et Ku80; et le complexe DNA-PK en vert. Comme son nom l'indique, ces réparations non-homologues ne nécessitent pas d'avoir deux séquences homologues d'ADN pour réparer les cassures, mais le mécanisme va rechercher et utiliser des micro-homologies dans les brins pour ainsi guider la réparation, via les enzymes de réparation faisant partie du complexe. **A.** Après une cassure de l'ADN, les sous-unités DNA-PKs font le pont entre les extrémités des brins d'ADN, et les protéines Ku interagissant avec la DNA-PK commencent à dérouler localement l'ADN à l'aide de leur activité hélicase. **B.** Ce pont permet la recombinaison des brins cassés aux sites des microhomologies. **C.** Les terminaisons d'ADN non combinées sont alors rognées partiellement par une exonuclease, et les « trous » (gap) sont remplis et fixés par une DNA polymérase et une DNA ligase IV. **D.** Une fois l'ADN réparé, les DNA-PK peuvent s'auto-phosphoryler, et phosphoryler également les protéines Ku **E.** provoquant une dissociation de l'ADN et du complexe protéique.

joining). Un modèle expliquant le processus de réparation NHEJ est présenté à la Figure I. 14 (Barnes, 2001; Collis et al., 2005; Featherstone and Jackson, 1999a). Les protéines Ku, à l'aide de leur propriété hélicase, **déroulent** localement **les hélices d'ADN** pour rendre accessibles les brins cassés aux protéines de réparation. De plus, l'hétérodimère Ku augmente d'environ 100 fois l'affinité des DNA-PKs pour l'ADN.

Le rôle crucial des protéines Ku dans le maintien de la stabilité génomique a été éclairé par le travail effectué sur des souris chez lesquelles les gènes codant Ku70 ou Ku80 a été inactivé. Une forte augmentation des translocations chromosomiques a été observée dans les cellules de ces souris après irradiation aux rayons X (Featherstone and Jackson, 1999c). De plus, l'exposition à des radiations ionisantes induit le recrutement de l'hétérodimère Ku sur la chromatine (Lee et al., 1996; Park et al., 2004).

I.5.3. Les protéines Ku dans l'immunité

Les protéines Ku interviennent également dans un processus physiologique impliquant des cassures d'ADN : les recombinaisons **V(D)J** lors de la maturation des gènes codant pour les immunoglobulines dans les lymphocytes B matures (Cortes et al., 1996). Ce mécanisme de réarrangement de l'ADN aidé par les protéines Ku est également responsable de l'intégration de génomes viraux, comme par exemple celui de rétrovirus dans le génome de l'hôte (Li et al., 2001).

I.5.4. Les protéines Ku dans la prolifération et la survie cellulaires

Les protéines Ku sont impliquées dans la réplication de l'ADN et dans la prolifération (Matheos et al., 2003; Sibani et al., 2005b; Sibani et al., 2005a; Rampakakis et al., 2008).

Un exemple de l'importance des protéines Ku sur la croissance cellulaire a été montré dans la lignée cellulaire Hct-116 dans laquelle un allèle Ku80 a été inactivée (appelée lignée 70/32, ou Hct116 Ku80+/-). L'expression de la protéine Ku80 est réduite dans ces lignées et une diminution de la prolifération est observée par rapport à la lignée cellulaire Hct116 sauvage. De plus, dans les souris Knock-out Ku80 -/-, des retards de croissance et des taux d'apoptose élevés sont également observés (Nussenzweig et al., 1996; Nussenzweig et al.,

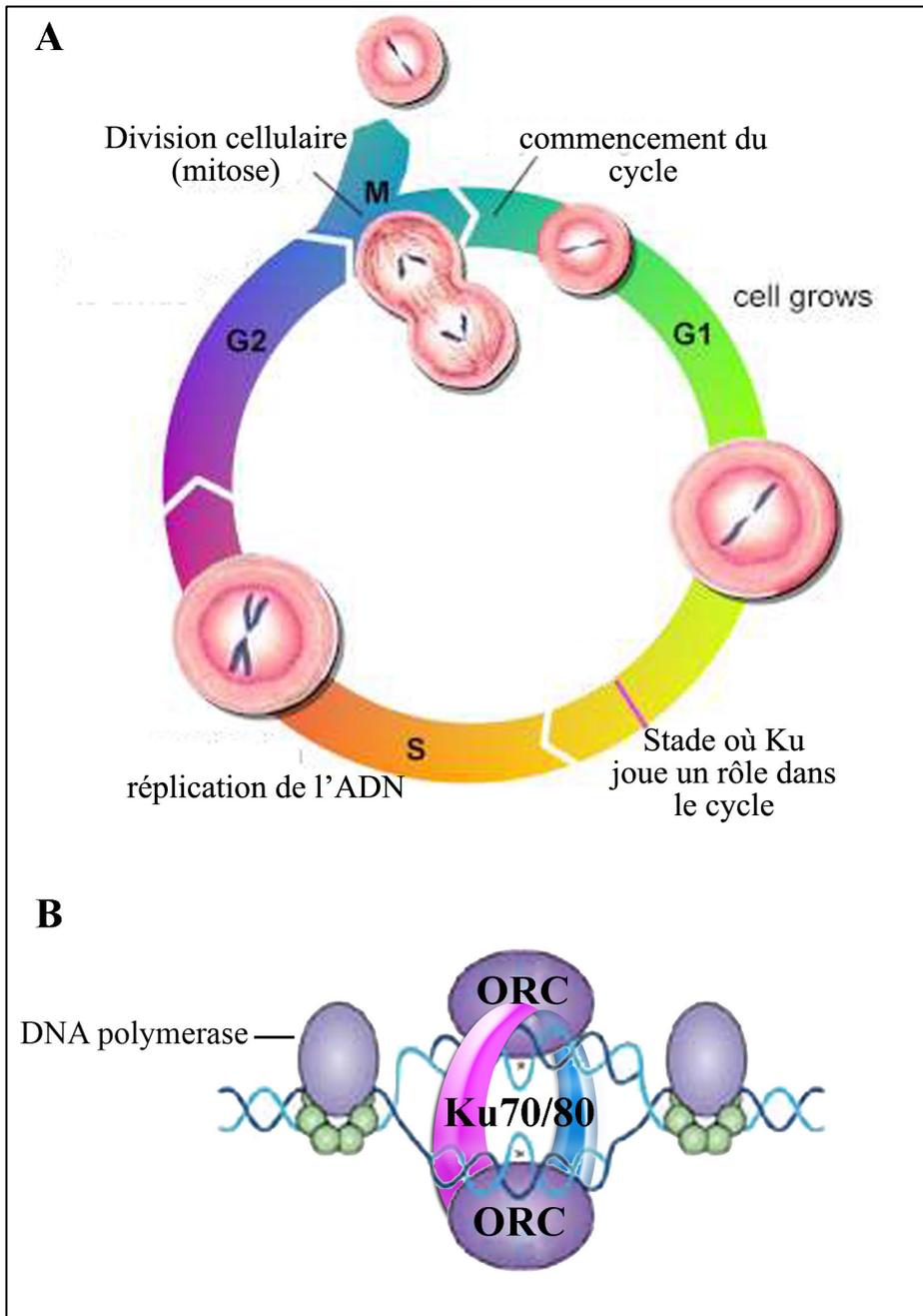


Figure I. 15. Implication des protéines Ku dans le cycle cellulaire et dans la réplication de l'ADN. A. Schémas du cycle cellulaire avec le stade entre G1-S où les protéines Ku commencent leurs rôles dans la réplication de l'ADN. **B.** Illustration du rôle des protéines Ku70 et Ku80 dans la stabilisation des protéines ORC pour la réplication de l'ADN (hélice bleue).

1997). Cela peut s'expliquer en partie par l'intervention de Ku dans le cycle cellulaire, en **fin de phase G1** (proche de la transition G1-S) où va commencer la réplication de l'ADN.

En effet, à la fin de la phase G1 du cycle cellulaire, Ku80 interagit avec les sites d'origine de réplication de l'ADN (Sibani et al., 2005b; Sibani et al., 2005a; Rampakakis et al., 2008). Ceux-ci se situent à proximité de la protéine Orc2, membre du complexe de protéines de reconnaissance des origines de réplication, **ORC** (Figure I. 15). Les protéines Ku contribuent à l'assemblage du complexe ORC en stabilisant ses sous-unités et en modifiant l'environnement autour de l'ADN. L'activité hélicase des protéines Ku pourrait également aider l'ouverture des sites de réplication.

I.5.5. Les protéines Ku dans la stabilité des télomères

Les télomères sont des séquences d'ADN (TTAGGG) répétées de nombreuses fois aux extrémités des chromosomes, et essentielles à la stabilisation de ceux-ci. Ces séquences sont reconnues par un complexe protéique qui les protège et les stabilise. Chez la majorité des eucaryotes multi-cellulaires, les télomères se raccourcissent à chaque cycle de prolifération. Lorsque la longueur des télomères est en dessous d'une taille critique, la cellule rentre en sénescence et meurt. Le raccourcissement des télomères provoque des jonctions entre les chromosomes, via les systèmes de réparation, parce que les extrémités sont alors reconnues comme des cassures.

Ku70 et Ku80 **protègent** les extrémités de **l'ADN d'attaques nucléolytiques**, et ce mécanisme est spécialement observé au niveau des télomères (Gullo et al., 2006)(Riha ARG 2006). Les protéines Ku n'y ont pas le même rôle que dans le système de réparation des cassures double brins. Pour la réparation des télomères, des jonctions d'extrémités d'ADN ne doivent pas arriver. Les mécanismes par lesquels les protéines Ku interviennent sur ces télomères sont décrits dans la Figure I. 16.

Des mutations ou des répressions des protéines Ku70 et/ou Ku80 empêchent la réparation des télomères à différents stades de développement. Il en résulte alors des télomères raccourcis et des recombinaisons simples brins au niveau des télomères, ainsi que des aberrations chromosomiques (Samper et al., 2000; dda di et al., 2001; Featherstone and Jackson, 1999c) (Figure I. 17).

La **DNA-PK** joue également un rôle avec ces protéines, car elles permettent la localisation des protéines Ku70 et Ku80 aux télomères, mais les autres protéines du NHEJ ne

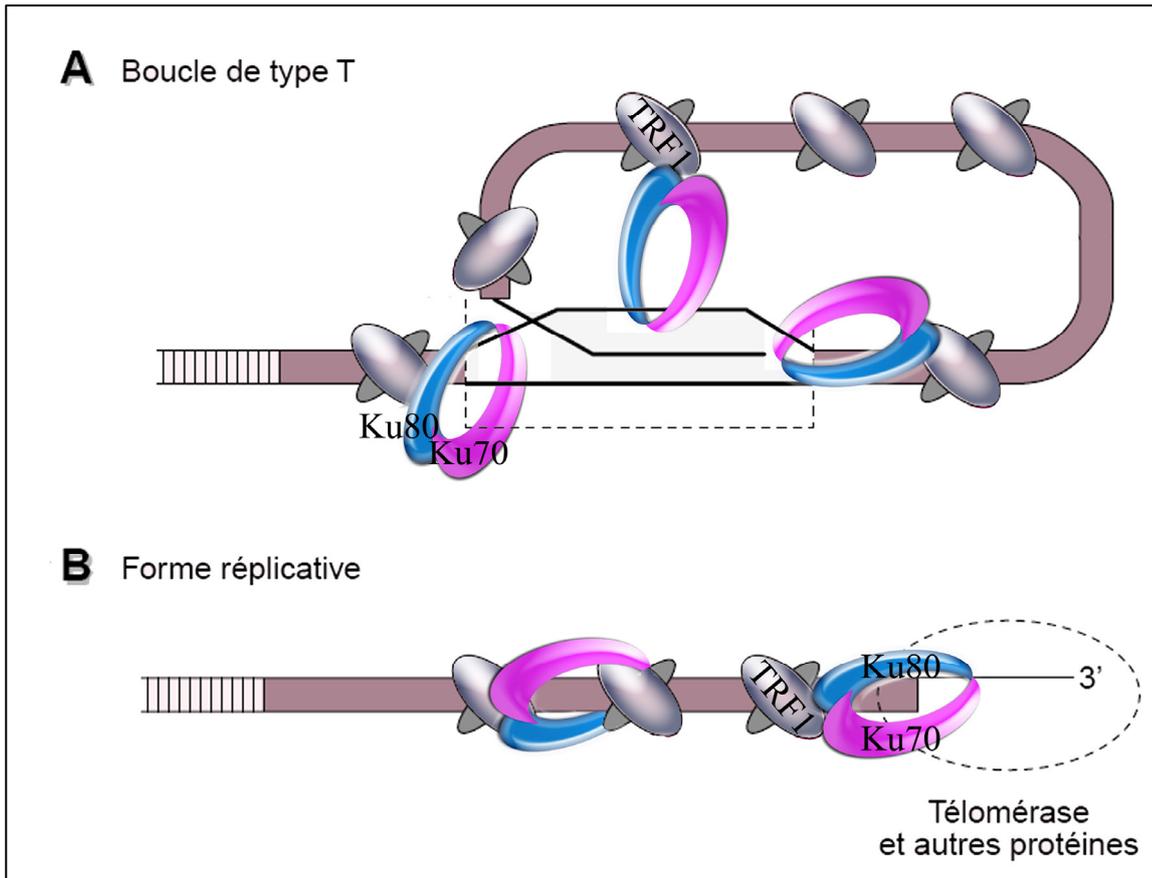


Figure I. 16. Les protéines Ku sont impliquées dans le maintien des télomères. Les protéines Ku70 et Ku80 interagissent avec les protéines TRF1. Celles-ci interagissent avec les séquences télomériques répétées du télomère. **A.** Lors de l'interphase, les télomères forment une boucle de type T, protégeant l'extrémité du télomère (Riha et al., 2006; Song et al., 2000). Le modèle proposé ici, montre Ku70 et Ku80 qui stabilisent les extrémités de l'ADN télomérique, et feraient le pont entre celles-ci et TRF1 (D'autres protéines sont également impliquées mais ne sont pas indiquées). **B.** Lors de la mitose et de la duplication de l'ADN, la boucle se défait, et les protéines Ku attirent la Télomérase avec d'autres protéines, pour maintenir le télomère prolongé (Hsu et al., 2000; Riha et al., 2006)

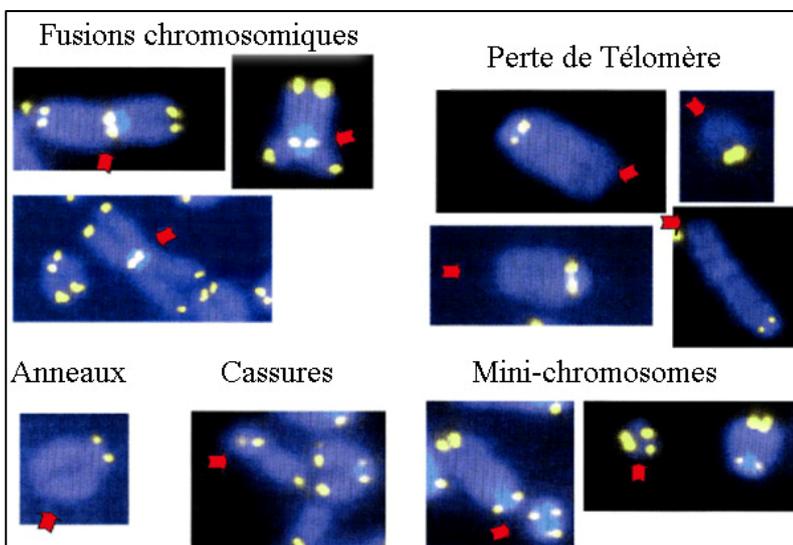


Figure I. 17. Les protéines Ku empêchent des aberrations chromosomiques. (Samper EMBO 2000). Images d'aberrations chromosomiques dans des cellules Ku80^{-/-}. En bleu, les chromosomes, en jaune, les télomères. Les flèches rouges indiquent les aberrations liées au titre (Fusions, Anneaux, cassures,...).

semblent pas essentielles dans le mécanisme de stabilité des télomères. L'absence de ces protéines sur les télomères pourrait partiellement expliquer que les terminaisons chromosomiques n'activent pas la réparation d'ADN via le complexe protéique Ku.

Les protéines Ku agissent dans les télomères ainsi que dans la réparation double brin NHEJ, mais n'y ont pas le même rôle. Quand ces protéines sont absentes ou mutées, ces systèmes de réparation par micro-homologies ne sont pas efficaces, et les télomères se dégradent. Les extrémités d'ADN ne sont plus protégées, et d'autres systèmes de réparation, comme la réparation simple brin, interviennent et créent des aberrations chromosomiques en fixant ces extrémités entre chromosomes, ou encore avec d'autres cassures.

I.5.6. Activité transcriptionnelle de Ku

Plusieurs travaux mentionnent l'implication des protéines Ku dans la transcription, soit comme facteurs de transcription ou comme cofacteurs transcriptionnels. Certaines études ont identifié des sites de fixation spécifiques pour les protéines Ku dans le promoteur de certains gènes. Parmi ceux-ci, citons NRE (Negative Regulatory Element) (Giffin et al., 1996) ou encore MRE (Metallic Response Element) sur le promoteur du gène de Wilson (*ATP7B*) (Oh et al., 2002). La spécificité de la fixation est controversée car la liaison semble incompatible avec la structure circulaire de l'hétérodimère Ku. Néanmoins, le domaine SAP de Ku70 pourrait être responsable de liaisons spécifiques au promoteur (Downs and Jackson, 2004).

En revanche, plusieurs observations indiquent que les protéines Ku pourraient réguler la transcription de gènes, sans se fixer à l'ADN. Ainsi, Ku peut s'associer avec l'ARN Polymérase II (Pol II) sur certains sites d'élongation (Mo and Dynan, 2002; Downs and Jackson, 2004). De plus, cette fonction serait distincte de celle de réparation de l'ADN (Woodard et al., 2001). Les protéines Ku peuvent interagir avec des **facteurs de transcription**, ou encore d'autres cofacteurs. Ainsi, Ku peut réguler leur activité et avoir des effets sur la transcription de gènes cibles (Tableau I. 3).

L'identification des protéines Ku comme cofacteurs dans ces études, a souvent été menée via la recherche de protéines interagissant avec le facteur de transcription étudié, afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce dernier. Par exemple, le récepteur aux androgènes est connu pour transactiver des gènes cibles après son activation hormonale et sa translocation dans le noyau. Mais Mayeur et ses collaborateurs ont voulu connaître les protéines qui permettent à ce récepteur d'agir sur un promoteur comme facteur de

Tableau I. 3. Facteurs ou cofacteurs de transcription qui interagissent avec les protéines Ku et qui modulent l'activité transcriptionnelle de gènes cibles.

Protéine	Description	Protéine(s) d'interaction	Fonction de l'interaction avec les protéines Ku	Référence
AIRE	autoimmune regulator	Ku70, Ku80 & DNA-PK	Réduisent la capacité transcriptionnelle d'AIRE en le phosphorylant	(Liiv et al., 2008)
AR	Récepteur aux androgènes	Ku70 et Ku80	Augmentent la capacité transcriptionnelle d'AR, important dans le cancer de la prostate	(Mayeur et al., 2005)
C/EBP α	CCAAT enhancer binding protein alpha	Ku70 et Ku80	Rôle dans la réparation de l'ADN, mais pas encore de rôle clair sur l'activité transcriptionnelle de C/EBP α	(Yin and Glass, 2006)
ESE1	Epithelium-specific ETS-1	Ku70 et Ku80	Réduisent la capacité transcriptionnelle d'ESE1	(Wang et al., 2004)
HSF1	Heat shock factor 1	Ku70	Réduit la capacité transcriptionnelle d'HSF1 sur la transcription du gène <i>HSP70</i> (codant pour Heat Shock Protein 70)	(Tang et al., 2001)
NF90	Nuclear Factor 90	Ku70 et Ku80	Avec NF90, les protéines Ku modulent d'une manière dynamique la transcription du gène <i>IL2</i> , dans les lymphocytes T	(Shi et al., 2007)
PARP-1	PolyADP-ribose polymerase	Ku70 et Ku80	Avec la PARP-1, ils ont des régulateurs transcriptionnel du gène <i>S100A9</i> , important dans des processus inflammatoires	(Grote et al., 2006)
Runx3	Runt-related transcription factor 3	Ku70 (N-Term.)	Réduit la capacité transcriptionnelle de Runx3 sur la transcription de <i>p21</i>	(Tanaka et al., 2007)
SAFB1	Scaffold Attachment Factor-B1	Ku80	Régule la transcription du gène <i>XOR</i> (Xanthine Oxydoreductase), important dans le stress oxydatif	(Lin et al., 2008)
YY1	Ying Yang 1	Ku70 et Ku80	Augmentent la répression du gène de l' α -MyHC (Myosin Heavy Chain), dans des myocytes	(Sucharov et al., 2004)

transcription (Mayeur et al., 2005). Pour cela, ils ont employé une méthode de purification utilisant des protéines hybrides, le GST-pull-down. Après purification, ils ont analysé les protéines interagissant à l'aide d'électrophorèse sur gel et de spectrométrie de masse. Ku70 et Ku80 ont fait partie des protéines identifiées, et l'influence de celles-ci sur AR a été étudiée. D'autres études ont également utiliser la méthode de GST-pull-down (pour AIRE, ESE1, HSF1 et SAFB1), mais d'autres méthodes de purification ont également été utilisées, comme l'immunoprécipitation (pour Runx3), ou la chromatographie d'affinité sur ADN (pour YY1, NF90 et PARP-1).

En regardant le tableau, on constate que les protéines Ku peuvent avoir un rôle positif ou négatif sur la transcription de gènes, et semble même parfois avoir ces rôles en compagnie de la DNA-PK.

1.5.7. Implications des protéines Ku dans le cancer.

Au vu des différentes propriétés des protéines Ku, ainsi que les différents mécanismes cellulaire dans lesquels elles interviennent, les rôles des protéines Ku sont très variés dans le cancer.

Les protéines Ku jouent un rôle important dans la réparation des cassures double brin l'ADN. Et comme la plupart de ces mécanismes de réparation, leur implication dans la carcinogenèse dépend du type cellulaire étudié. En effet, dans une cellule normale, si une cassure de l'ADN survient, elle peut être réparée, mais si les cassures sont trop nombreuses, des protéines comme **p53** active la mort cellulaire, pour empêcher la création d'aberrations génétiques. Ainsi, il a été observé que la délétion de Ku80 dans des souris conduisait à l'activation de p53 et de l'apoptose (Holcomb CR 2008).

Cependant, il n'est pas rare que p53 soit mutée ou absente dans des cellules cancéreuses. La cellule ne rentre dès lors plus en apoptose et les réparations d'ADN continuent à se faire, induisant parfois des mutations et des aberrations chromosomiques, mais provoquant également des résistances aux radiations ionisantes et aux agents endommageant l'ADN (Gullo et al., 2006; Downs and Jackson, 2004). Cependant, lorsque les protéines Ku et DNA-PK sont délétées en plus de p53 dans des souris, les cellules sont de nouveau sensibles aux radiations (Gurley et al., 2009). Voilà ainsi un exemple comment Ku

interviendrait soit comme gardien de la cellule et de son génome (caretaker, quand p53 est fonctionnel), soit comme facteur de résistance aux radio- et chimio-thérapies (oncogénique, quand p53 est inactif).

Voici d'autres exemples où Ku pourrait jouer un rôle dans la carcinogénèse cellulaire.

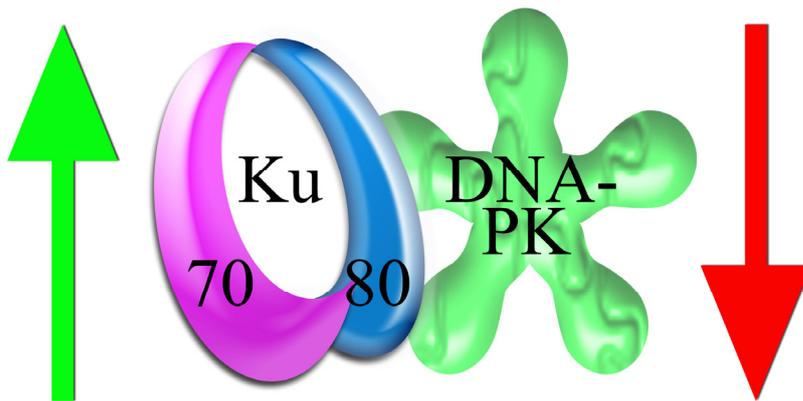
Dans certaines lignées cellulaires cancéreuses (HL60, Multiple Myeloma cells,...)(Gullo et al., 2006), il existe également une **forme tronquée** de la protéine Ku80, d'une masse moléculaire de 69kDa, et appelée **Ku80v** (ou Ku86v). Celle-ci est tronquée en C-terminal et ne possède pas le domaine dépendant d'ATP (ATP-dependent helicase domain) entre les acides aminés 677–689. Sa propriété hélicase et sa fixation à l'ADN sont par conséquent moins fortes, voire déficientes. Avec cette forme, l'ADN serait également plus susceptible à la DNase I. L'affinité aux DNA-Pks est également moindre, avec de plus grandes sensibilités des cellules aux radiations ionisantes (comme les rayons γ des gamma-thérapie), par son déficit en réparation de l'ADN. Ainsi, certains patients ayant un **Myélome Multiple** (MM) présentaient une meilleure réponse à des agents endommageant l'ADN parce que la protéine Ku80v était exprimée dans leur cancer.

Ku80 pourrait également fonctionner comme molécule d'adhésion dans les myélomes multiples. Celle-ci serait mobilisée dans le cytoplasme jusqu'à la membrane cytoplasmique en utilisant le ligand du CD40 (Gullo et al., 2006). Combinée à l'**TI6**, Ku80 jouerait un rôle important dans la croissance et la survie cellulaire dans ces cancers.

Ku80 interagit aussi avec la protéine **PARP-1** (Poly (ADP-ribose) polymerase-1). Cette interaction est importante dans la prévention de la tumorigénèse dans les cancers du foie (Tong et al., 2002), et maintient la stabilité des télomères, comme montré plus haut (Slijepcevic, 2006). PARP-1 jouerait également un rôle avec Ku dans le système de réparation NHEJ, et préviendraient des aberrations chromosomiques. Néanmoins, Les protéines Ku70 et Ku80 interagissent également avec la PARP-1 pour participer à la tumorigénèse et à un désordre inflammatoire, en régulant l'expression de S100 (Grote et al., 2006). PARP-1 pourrait aussi entrer en compétition avec TCF-4 pour interagir avec Ku70, dans les cancers du colon. L'interaction avec l'une ou l'autre changerait selon le profil de la cellule (Idogawa et al., 2007).

Gain de fonction (oncogénique)

Hyperprolifération des tumeurs
Résistance à l'apoptose
Résistance à la radio- et chimio-thérapie



Perte de sa fonction (protectrice)

Instabilité génomique
Translocation et aberration chromosomique
accrues
Tumorigenèse et déficience immunitaire

Figure I. 18. Les protéines Ku sont impliquées dans la carcinogénèse. Schémas dérivé d'une publication de Gullo et ses collaborateurs (Gullo et al., 2006), dans le rôle que joueraient les protéines Ku et DNA-PK dans le cancer. Le gain de fonction et/ou l'augmentation de son expression (flèche verte), peut avoir des propriétés oncogéniques (en haut). Sa perte de fonction et/ou la diminution de son expression (flèche rouge) peut altérer sa fonction protectrice dans la cellule (en bas).

Il a également été montré que l'hyperprolifération de cellules gastrique pouvaient être associées à de hautes expressions et de hautes concentrations en protéines Ku70 et Ku80 dans le noyau cellulaire par un mécanisme dépendant de **COX2**, par l'activation d'**NFκB** (Lim et al., 2002). De plus, dans les cancers du sein agressifs, l'expression de Ku70 et Ku80 est plus élevée, par rapport au tissu normal (Pucci et al., 2001).

En conclusion, les protéines Ku peuvent avoir des rôles différents dans la tumorigenèse. Cela dépendrait du **type cellulaire**, de l'avancement dans les différents **stades de tumorigenèse**, la **dérégulation** d'expression d'autres protéines, le niveau d'expression et la **localisation** cellulaires des protéines Ku. Gullo et ses collaborateurs proposent ainsi plusieurs manières par lesquelles les protéines Ku et DNA-PK jouerait un rôle dans le cancer (Figure I. 18) (Gullo et al., 2006).

Travaux antérieurs et objectifs du travail

L'étude des facteurs responsable de la surexpression du gène *ERBB2* dans les cancers du sein est le thème principal de recherche du laboratoire d'oncologie moléculaire.

Notre laboratoire, a étudié les mécanismes moléculaires responsables de la surexpression du gène *ERBB2* dans les cancers du sein. Nous avons montré que la surexpression est la conséquence d'une stimulation de la transcription et non de la stabilisation de l'ARN (Pasleau et al., 1993).

Pour étudier la régulation de la transcription un fragment de 6 kb du promoteur du gène *ERBB2* a été cloné et séquencé. Différentes régions régulatrices ont été identifiées (Grootclaes et al., 1994). Plusieurs sites de liaison pour des facteurs AP-2 ont été identifiés (Delacroix et al., 2005; Grootclaes et al., 1999; Vernimmen et al., 2003a). La fixation des facteurs au promoteur a été vérifiée par Chromatin Immunoprecipitation (ChIP assay) (Begon et al., 2005; Delacroix et al., 2005).

Afin de mieux comprendre le fonctionnement des facteurs de transcription AP-2, nous avons cherché les protéines interagissant avec ce facteur et contribuant à la surexpression d'*ERBB2* dans des lignées de cancer du sein. Précédemment, Dominique Begon a montré l'interaction de la protéine YY1 avec le facteur de transcription AP-2 α et leur implication sur le promoteur du gène *ERBB2* (Begon et al., 2005).

La première partie de mon travail a été de mettre en corrélation par immunohistochimie l'expression des protéines YY1 et AP-2 α avec la surexpression d'*ERBB2* dans des tumeurs primaires. Nous avons également voulu étudier l'effet d'une diminution des protéines YY1 et AP-2 sur l'expression d'*ERBB2*, à l'aide de siRNAs (Voir article 1 en annexe, (Allouche A and Nolens G. et al., 2008).

La deuxième partie de ce travail a porté sur l'identification d'autres protéines pouvant interagir avec les protéines AP-2. Après purification, les protéines Ku70 et Ku80 furent identifiées. Nous avons voulu étudier l'effet de cette interaction sur l'activité des protéines AP-2 (α et γ) et sur l'expression d'*ERBB2* (voir article 2 en annexe).

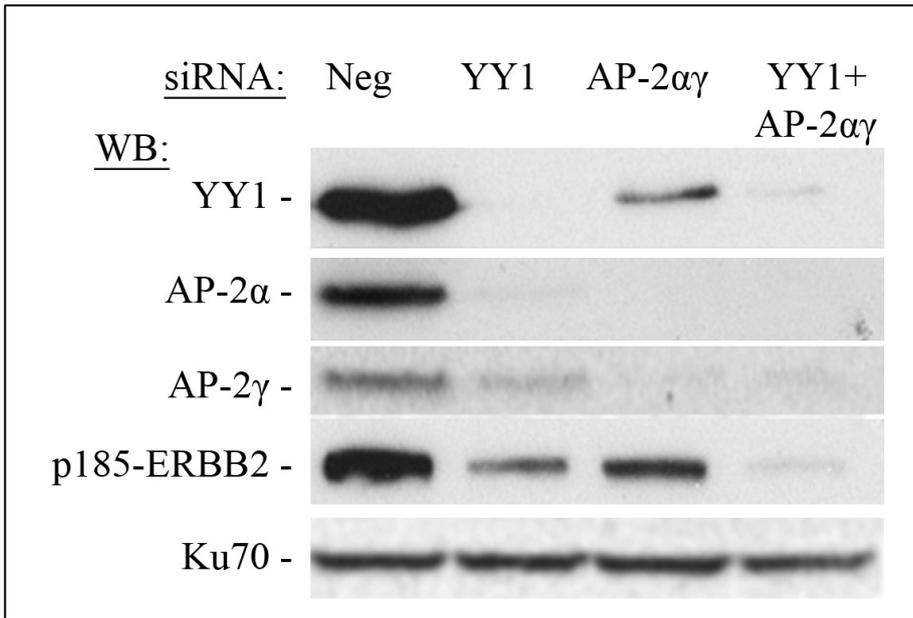


Figure R. 1. Expression protéique après traitement aux siRNAs dirigés contre YY1 avec ou sans siRNAs AP-2 α et AP-2 γ dans les BT-474, après 36h. Western blot (WB) avec différents anticorps (à gauche). Les différents siRNAs utilisés sont représentés en haut, avec une combinaison du siRNA YY1 avec les siRNAs AP-2 α et AP-2 γ (AP-2 α) pour la dernière condition (YY1+AP-2 α). Ku70 sert de contrôle à la charge protéique.

Résultats

R.1. Rôle combiné des protéines YY1 et AP-2 dans l'expression d'ERBB2.

R.1.1 Rôle combiné des protéines AP-2 α et YY1 dans l'expression d'ERBB2 endogène

La protéine YY1 est un facteur transcriptionnel multifonction qui peut agir comme facteur de transcription répressif ou activateur selon sa cible et le type cellulaire dans lequel il est exprimé (voir § I.4). Cependant, elle peut également jouer un rôle de cofacteur pour certains facteurs de transcription comme AP-2 α (Begon et al., 2005; Wu and Lee, 2001). Nos précédents travaux ont montré qu'YY1 avait un rôle activateur dans l'activité transcriptionnelle d'AP-2 α sur le promoteur du gène *ERBB2*. L'étude sur l'activation de la transcription d'*ERBB2* par YY1 avec AP-2 α a été montrée en utilisant des vecteurs rapporteurs contenant une partie du promoteur proximal d'*ERBB2* (Begon et al., 2005). Le recrutement d'YY1 sur le promoteur d'*ERBB2* endogène a également été montré par immuno-précipitation de la chromatine (ChIP assay). Cependant, le rôle d'YY1 dans la surexpression du gène *ERBB2* dans des cellules de cancer du sein ERBB2+ (ou Her2+) n'a pas pu être mis en évidence. En effet, la protéine YY1 est exprimée de manière ubiquitaire dans les lignées cellulaires cancéreuses que nous possédons (Begon et al., 2005). L'utilisation de vecteurs d'expression de la protéine YY1 semble dès lors inutile.

Une façon d'étudier l'implication de la protéine YY1 sur la surexpression d'ERBB2 est d'utiliser l'interférence à l'ARN pour éteindre l'expression ciblée de cette protéine. Cette technique utilise de courts brins d'ARN (20bp) dimérisés, appelés **siRNA**. Ces séquences spécifiques vont alors fixer l'ARNm cible, et le complexe formé sera reconnu et détruit par la cellule hôte. La transfection de siRNA peut ainsi éteindre l'expression d'un gène presque totalement.

De précédents résultats ont déjà montré que des siRNAs dirigés contre les protéines AP-2 α et AP-2 γ réduisent les taux d'ARNm d'ERBB2 (thèse de Laurence Delacroix, 2006), et sont repris dans l'article 1 en annexe (Allouche A and Nolens G. et al., 2008). En complément à ces résultats, nous montrons ici que les siRNAs AP-2 α et AP-2 γ (AP-2 $\alpha\gamma$) réduisent l'expression de la protéine p185-ERBB2 dans la lignée cellulaire BT-474 (Figure R.1).

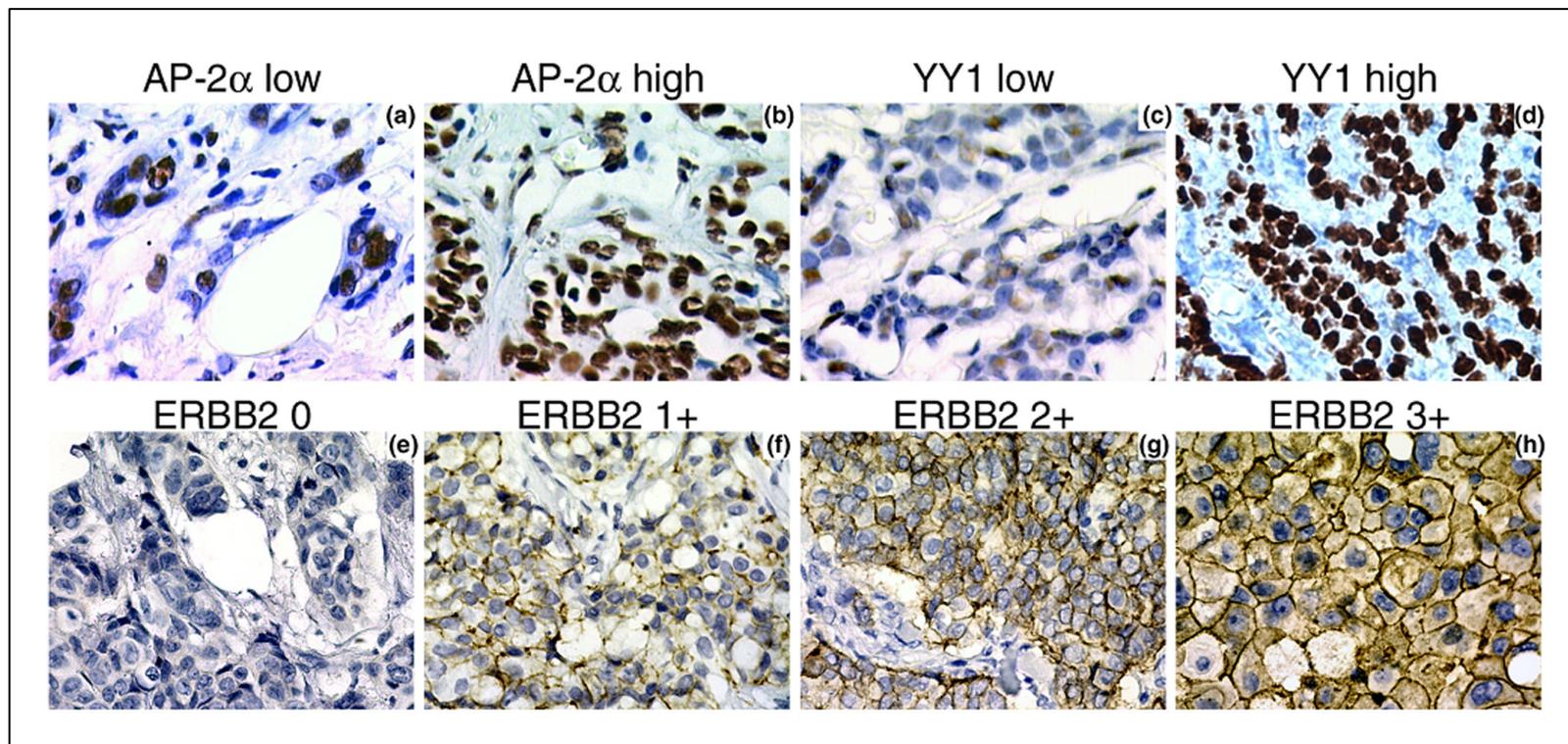


Figure R. 2 Exemples de marquage des protéines AP-2 α , YY1 et p185-ERBB2 (ERBB2) par immunohistochimie dans des tumeurs du sein. (a). Cas avec une faible immuno-réactivité (marquage) pour AP-2 α . **(b).** échantillon tumoral exprimant un haut niveau de la protéine AP-2 α à plus de 80% dans le noyau. **(c).** Tumeur avec une faible immuno-réactivité pour YY1. **(d).** Echantillon exprimant un haut niveau de la protéine YY1 à plus de 80% dans le noyau. **(e).** Echantillon sans marquage membranaire pour ERBB2. Identifié comme 0 dans le score IHC. **(f).** Tumeur avec une coloration membranaire faible pour ERBB2, identifiée comme IHC 1+. **(g)** Cas avec un score de 2+ pour ERBB2. **(h).** Tumeur avec un marquage ERBB2 d'une circonférence épaisse, identifiée comme IHC 3+.

Après avoir contrôlé que les siRNAs dirigés contre la protéine YY1 montrent une bonne efficacité d'extinction de la protéine cible, nous avons analysé l'impact de cette extinction sur l'expression de la protéine p185-ERBB2. De façon notable, l'extinction de la protéine YY1 réduit l'expression du récepteur ERBB2. De plus, la combinaison d'un siRNA dirigé contre YY1 avec ceux dirigés contre AP-2 (α et γ) réduisent encore plus l'expression de p185-ERBB2. Ces résultats portent donc à croire que les protéines AP-2 α , AP-2 γ et YY1 ont un **rôle combiné** dans l'expression d'ERBB2.

R.1.2 Immunodetection combinée d'AP-2 α et YY1 associée avec la surexpression d'ERBB2.

Après avoir montré une collaboration des protéines AP-2 α et YY1 sur l'expression d'ERBB2 dans une lignée de cancer du sein, nous avons également voulu étudier l'expression combinée de ces protéines en corrélation avec la protéine p185-erbB2 dans des tumeurs de cancer du sein par immuno-histochimie (article 1 en annexe) (Allouche A and Nolens G. et al., 2008).

Tout d'abord, nous avons analysé les niveaux des protéines ERBB2, AP-2 α et YY1 par immunohistochimie (IHC) dans des échantillons tumoraux provenant de 55 sujets atteints d'un cancer du sein (Tableau R. 1). Des exemples représentatifs du marquage d'échantillons obtenus pour le récepteur ERBB2 et les facteurs de transcription AP-2 α et YY1 sont montrés en Figure R.2. Les protéines AP-2 α et YY1 ont été détectées principalement dans le compartiment nucléaire alors qu'un marquage cytoplasmique était rare et faible (Figure R.2). Les niveaux d'expression en AP-2 α et YY1 ont été notés comme faible ou élevé selon le pourcentage de marquage nucléaire, conformément au travail de Pellikainen et ses collègues (Pellikainen et al., 2004). De hauts niveaux d'expression des protéines AP - 2 α et YY1 ont été respectivement observés dans 42 et 45 % des carcinomes mammaires. Pour la protéine ERBB2, le marquage membranaire a seulement été pris en compte lors de l'analyse immunohistochimique.

Tableau R.1. Associations entre les niveaux d'expression des protéines ERBB2 et AP-2α et/ou YY1 déterminés par immunohistochimie (IHC). Les niveaux d'expression d'ERBB2 sont classés en 3 catégories croissantes d'expression (0/1+ < 2+ < 3+). La P-value est calculée entre les niveaux d'expression d'ERBB2 2+ et 3+, et les niveaux High de l'expression d'AP-2α, YY1, ou les 2 combinées.

	n	Expression d'ERBB2 (pourcentage)			P-value
		0/1+	2+	3+	
Expression d'AP-2α					0.003
Low	32	19 (59)	5 (16)	8 (25)	
High	23	4 (17)	12 (52)	7 (31)	
Expression d'YY1					0.318
Low	30	15 (50)	7 (23)	8 (27)	
High	25	8 (32)	10 (40)	7 (28)	
Combinaison					0.016
AP-2α lo/YY1 lo	26	14 (54)	4 (15)	8 (31)	
AP-2α lo/YY1 hi or AP-2α hi/YY1 lo	10	6 (60)	4 (40)	0 (0)	
AP-2α hi/YY1 hi	19	3 (16)	9 (47)	7 (37)	

High ou hi = haute expression; Low ou lo = faible expression ; n = nombre d'échantillons. ;

Ensuite nous avons analysé les corrélations entre les niveaux d'expression des protéines ERBB2, AP-2α et YY1 dans les échantillons tumoraux. Nos analyses statistiques ont montré que l'expression d'ERBB2 était significativement associée avec un haut niveau d'expression du facteur de transcription AP-2α ($p=0,003$) (Tableau R. 1). En conséquence, 83% des tumeurs avec un haut niveau d'AP-2α avaient un score de marquage IHC pour la protéine ERBB2 de 2+ ou 3+, et seulement 17 % avaient un faible niveau (0 à 1+) d'expression d'ERBB2 (voir tableau R.1). Cependant, il n'y avait pas d'association entre les protéines ERBB2 et YY1.

Cependant, une forte association entre les niveaux d'expression des protéines AP-2α et YY1 a été observées dans les échantillons tumoraux. En effet, la majorité des tumeurs exprimaient les 2 protéines couplées soit à un faible niveau (26 cas) soit à un haut niveau (19 cas). Au contraire, il n'y avait seulement que 10 cas (18 %) avec un haut niveau en AP-2α ou YY1 exprimées seules. De plus, il y avait une association significative entre la surexpression de la protéine ERBB2 et celle combinée d'AP-2α et YY1 (ERBB2 2+/3+ avec AP-2α hi/YY1 hi : $p\text{-value}<0,02\%$). En effet, parmi les 19 cas présentant des hauts niveaux en AP-2α et YY1, 84% avaient un score pour ERBB2 2+ ou 3+.

En parallèle, les tumeurs avaient été classées selon l'amplification du gène *ERBB2*, à l'aide de la technique FISH (Hybridation fluorescente in situ). Celle-ci a mis en évidence une corrélation inverse entre les niveaux d'amplification du gène *ERBB2* et l'expression des protéines YY1 et AP-2α (résultats dans l'article 1 en annexe)(Allouche A and Nolens G. et al., 2008). Combinés avec ceux obtenus plus haut, ces résultats suggèrent que quand le gène *ERBB2* n'est pas amplifié, l'expression d'*ERBB2* est liée partiellement aux niveaux d'expression des facteurs de transcription AP-2α et YY1.

En conclusion, les données obtenues par immunohistochimie (*in vivo*) et celles observées à l'aide des siRNAs (*in vitro*) montrent un lien entre l'expression des facteurs de transcription AP-2 et YY1 et celle du récepteur *ERBB2*. Le but de cette étude était de mieux caractériser la relation entre les surexpressions de *ERBB2* et d'AP-2α dans des tumeurs de seins et d'analyser l'implication de la protéine YY1 comme cofacteur d'AP-2α. Bien que le nombre d'échantillons analysés dans cette étude soit relativement restreint, on notera que nos observations dans les échantillons tumoraux corroborent les données obtenues *in vitro*. En effet, ces dernières ont montré que les protéines YY1 ont un rôle combiné avec AP-2α dans la surexpression d'*ERBB2* dans une lignée de cancer mammaire, et les études *in vivo* montrent une corrélation entre l'expression combinées des protéines YY1 et AP-2α et celle d'*ERBB2* dans des tumeurs primaires de cancer du sein.

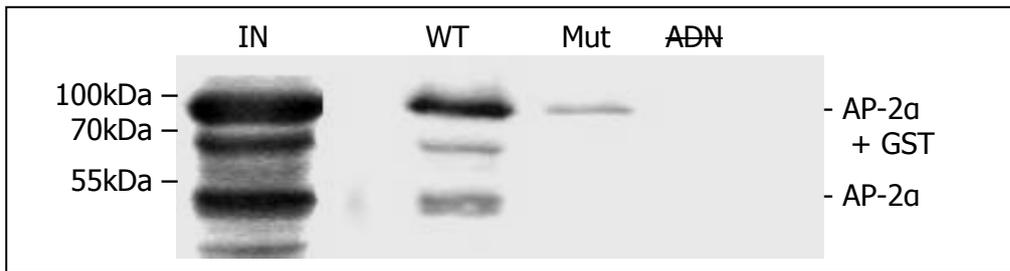


Figure R. 3. Test de liaison à l'ADN, par Chromatographie d'affinité, de la GST-AP2. Vérification par Western Blot AP-2 α . Des extraits de la protéine chimérique GST+ AP-2 alpha (GST-AP2) (IN), ont été incubés avec de l'ADN contenant des séquences de fixation pour AP-2 (WT) ou de l'ADN contenant cette séquence mutée et ne fixant pas AP-2 (Mut), ou encore sans ADN (ADN). La forme GST-AP2 migre à +/- 90kDa, et la forme AP-2 α migre seule à +/- 50kDa.

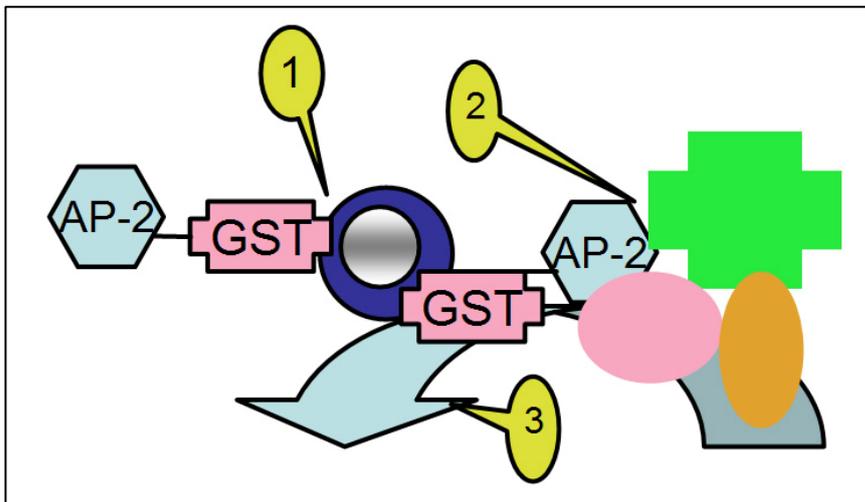


Figure R. 4. Schémas représentant la technique de GST-pull-down (GST-PD). 1. Fixation et purification de la protéine chimérique, ici AP-2 α couplée à la Glutathion Serine Transférase (GST). Celle-ci va fixer des billes magnétiques enrobées de Glutathion. 2. Le complexe formé est ensuite incubé avec des extraits nucléaires de cellules surexprimant AP-2 et ERBB2 (BT-474). Cela permet l'interaction de protéines nucléaires avec AP-2 α . 3. Après lavage, les protéines sont éluées des billes, analysées et identifiées.

R.2. Identification de nouvelles protéines interagissant avec AP-2 et étude de leur implication dans l'expression d'ERBB2.

Afin d'approfondir l'étude du promoteur d'*ERBB2* et des mécanismes responsables de la surexpression de cet oncogène, nous avons voulu identifier de nouvelles protéines interagissant avec AP-2 et pouvant influencer son activité sur l'expression du gène *ERBB2*. Pour cela, nous avons mis au point deux techniques de purification de protéines. La première, la chromatographie d'affinité sur ADN (CAA) ou encore DNA-pull-down, est décrite en annexe (voir R.3. Annexe I). Certains résultats se sont montrés intéressants mais parfois peu reproductibles. La deuxième, la GST-pull-down, s'est montrée plus robuste.

R.2.1 Identification de protéines interagissant avec AP-2 α

La technique de GST-pull-down utilise des protéines chimérique « taggées » avec la **Glutathion-Serine-Transferase** (GST). Celle-ci a une grande affinité pour le glutathion (GSH). La protéine AP-2 α couplée à la GST (AP2-GST) a été ainsi produite en bactérie.

Afin de vérifier sa capacité à fixer une séquence d'ADN, confirmant une bonne conformation de la protéine, nous avons utilisé la technique d'affinité sur ADN (Figure R. 3) (description de la technique en Annexe I). A l'aide d'un western-blot, on peut constater qu'**AP2-GST** s'est fixée et a été éluée de la séquence d'ADN fixant AP-2 α et AP-2 γ .

Ensuite, nous avons procédé à la purification des protéines interagissant avec AP-2 α (Figure R.4). La protéine GST-AP2 a d'abord été fixée sur des billes magnétiques enrobées de glutathion (GSH). La manipulation des billes magnétiques a été réalisée à l'aide d'un robot. Après purification des protéines chimériques sur les billes, le complexe ainsi formé a été incubé avec des protéines nucléaires de la lignée cellulaire BT-474. Cette lignée cellulaire surexprime AP-2 α et AP-2 γ , ainsi que le récepteur ERBB2. Après lavage, les protéines sont alors éluées à l'aide d'urée, et séparées sur des gels de polyacrylamide en 2 dimensions, ou **2D-GE** (two dimensional gel electrophoresis) (Figure R. 5). Après coloration, les différences ont également été identifiées par spectrométrie de masse. A plusieurs reprises, les protéines GST ou AP-2 α ont été identifiées (points 3 et 4), ou encore des protéines dites contaminantes (actine, kératines). Cependant, 2 autres protéines ont également été

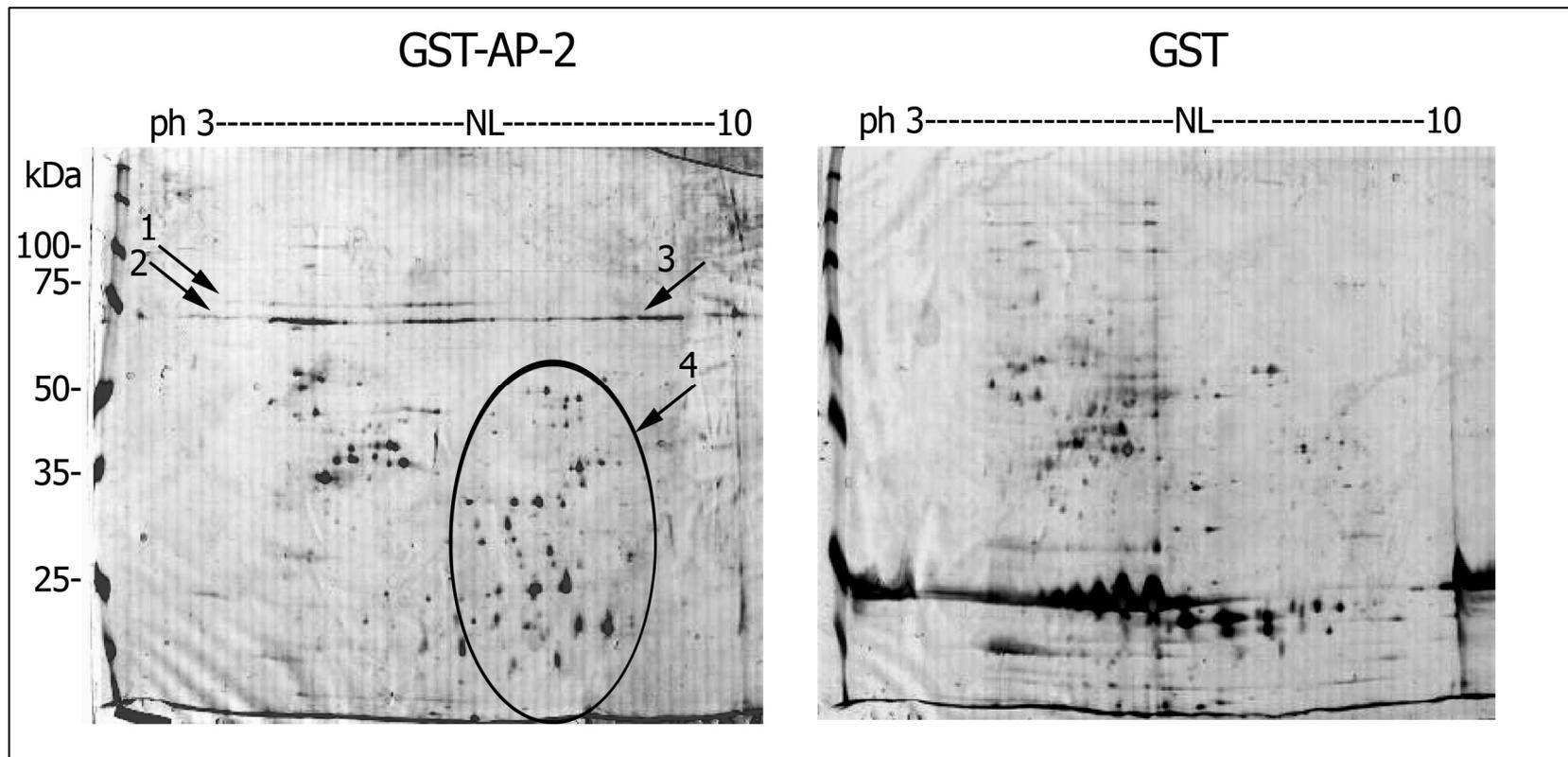


Figure R. 5. Gels de polyacrylamide en deux dimension (2D-GE) des protéines éluées de la technique de GST-pull down, utilisant la forme GST-AP2 (à gauche) et GST seul (à droite). La première dimension a séparé les protéines selon leur point isoélectrique, du pH 3 à 10 de manière non-linéaire (NL). La seconde a séparé les protéines selon leur masse moléculaire apparente (marqueur de poids moléculaire à gauche du gel). Les numéros 1 et 2 correspondent à des protéines identifiées par spectrométrie de masse et décrites comme étant Ku70 et Ku80 (voir **Tableau R.2.**). Les autres (3 et 4) étant la forme GST et AP-2 alpha ainsi que des formes dégradées de celle-ci.

identifiées, Ku70 et Ku80 (Tableau R. 2). Ces protéines sont connues comme ayant différents rôles dans la cellule (voir Introduction § I.5). Un de ces rôles est d'interagir avec des facteurs de transcription afin de réguler leur activité transcriptionnelle.

Tableau R. 2. Protéines interagissant avec AP-2 α , isolées par la technique de GST-pull-down et identifiées par spectrométrie de masse. Les numéros (#) correspondent à ceux décrits Figure R.10.

#	Numéro d'accès ^a	Nom de la protéine	Masse ^b	Peptides trouvés ^c	Score total ^d
1	P13010	ATP-dependent DNA helicase II, 80 kDa subunit	83091	13	499
2	P12956	ATP-dependent DNA helicase II, 70 kDa subunit	69953	7	209

a Numéros d'accès des protéines identifiées dans la base de données UniProtKB/Swiss-Prot.

b Masse moléculaire prédite des protéines identifiées.

c Nombre de peptides identifiés provenant des séquences en acides aminés des protéines décrites.

d TScore de probabilité totale de la recherche Mascot pour les protéines identifiées. La limite de score était >37.

L'identification des protéines Ku a été vérifiée à l'aide de western-blots réalisés sur les éluas de la technique de GST-pull-down (Figure R. 6). Afin de vérifier l'interaction des protéines Ku70 et Ku80 avec AP-2 α , nous avons réalisé une **co-immunoprécipitation** de ces protéines (Figure R. 7). L'immunoprécipitation dirigée contre AP-2 a été réalisée à l'aide d'un anticorps reconnaissant à la fois AP-2 α et AP-2 γ (voir § Materials and methods dans l'article 2 en annexe). Des anticorps dirigés contre Ku70 et Ku80 ont également été utilisés. Ces anticorps, préalablement fixés sur des billes magnétiques, ont été incubés avec des extraits cellulaires de BT-474. Après western-blot dirigé contre les protéines AP-2 α , Ku70 et Ku80, on peut constater que les protéines Ku interagissent bien avec les protéines AP-2.

R.2.2 Expression des protéines Ku dans les lignées de cancer du sein

Les protéines Ku sont présentes majoritairement dans le noyau. Cependant, une fraction peut se retrouver dans le cytoplasme (Choi et al., 2002). Nous avons estimé le taux d'expression des 2 protéines par western-blot dans le cytoplasme et le noyau de 5 lignées de cancers du sein (BT-474, ZR75.1, SKBR3, MCF-7 et MDA-MB-231), en comparaison avec des cellules dérivées de cancers du colon (Hct116) ou du foie (HepG2) (Figure R. 8). Les taux des protéines Ku70 et Ku80 nucléaires sont similaires dans toutes les lignées que nous avons

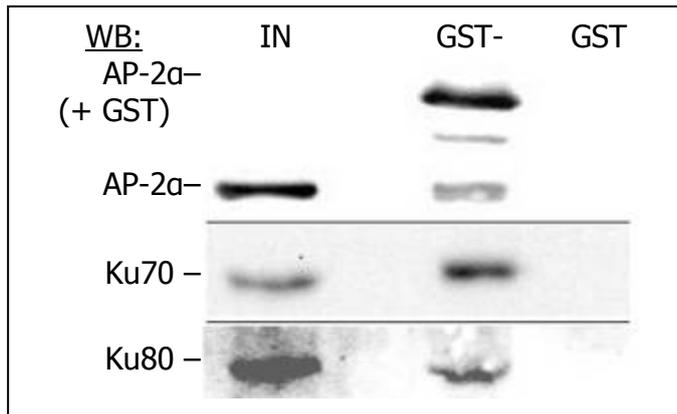


Figure R. 6. Western blot sur les protéines éluées du GST-pull-down. IN : Extrait nucléaire utilisé (50% de la quantité originale). GST-AP2 : Protéines éluées de la forme GST combinée à AP-2α. GST : Protéines éluées de la forme GST seule. Les anticorps utilisés sont AP-2α, Ku70 et Ku80 (à gauche).

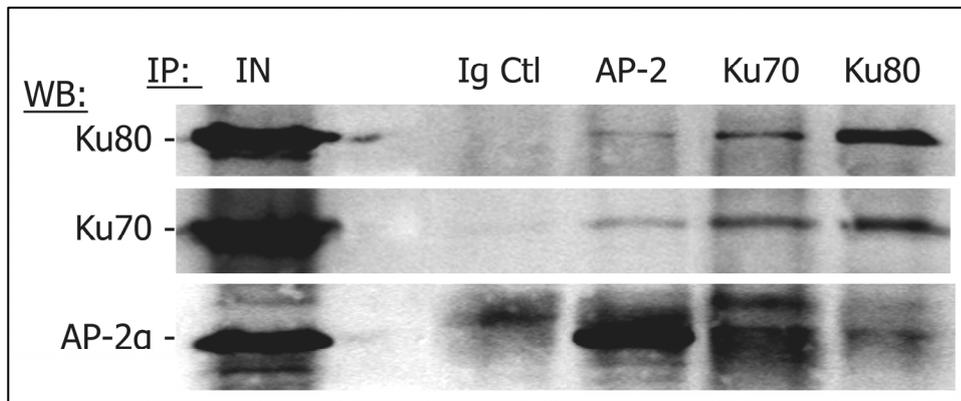


Figure R. 7. Western blot sur une co-immunoprécipitation des protéines AP-2 (α et γ), Ku70 et Ku80 dans des extraits cellulaires de BT-474. L'anticorps AP-2 reconnaît les forme α et γ. Les immunoprécipitations (IP) sont comparées à un anticorps contrôle (Ig CTL) et une partie (10%) des extraits protéiques de BT-474 utilisés (IN). Les anticorps utilisés pour le blot sont à gauche (WB).

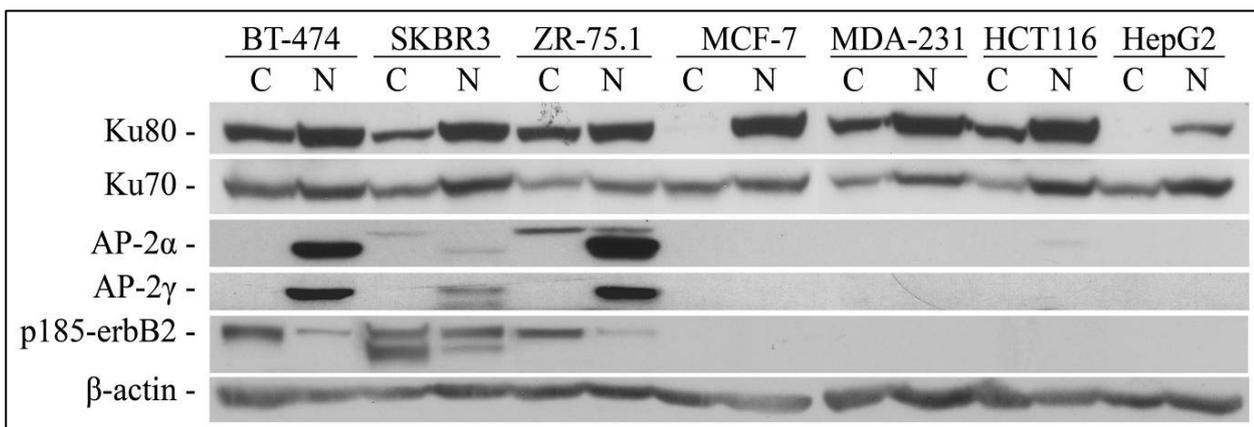


Figure R. 8. Expression de Ku70 et Ku80 dans différentes lignées de cancer, en comparaison avec les protéines AP-2-α, AP-2γ et p185-erbB2. Les cellules dérivées de cancer du sein vont des BT-474 aux MDA-MB-231 (MDA-231). Les Hct116 sont des cellules du colon, et les HepG2, du foie. La β-actin sert de contrôle à la charge protéique. (Ndlr : Il faudra noter que pour des raisons inconnues, les niveaux d'expression d'AP-2α était anormalement bas pour les SKBR3 par rapport à ce qui a été montré dans la littérature (Begon et al., 2005)).

analysées. Cependant, il existe une différence d'expression dans leur cytoplasme. Cette différence de répartition dans le cytoplasme peut être expliquée par le fait que les protéines Ku jouent un rôle différent si elles sont présentes dans le cytoplasme (interaction avec le cytosquelette, implication dans le cycle cellulaire,...) ou dans le noyau (réparation de l'ADN, effet transcriptionnel,...). Dès lors, ce profil peut changer d'une cellule à l'autre.

De plus, en analysant l'expression d'AP-2 α , AP-2 γ et p185-erbB2, nous n'observons pas de corrélation d'expression de ces protéines avec celles de Ku70 ou de Ku80 (Figure R.8). Cela n'indique pas que les protéines Ku ne sont pas impliquées dans l'expression d'ERBB2 *in vivo*, mais suggère qu'il n'existe peut-être pas de corrélation d'expression entre ces protéines dans les cancers du sein.

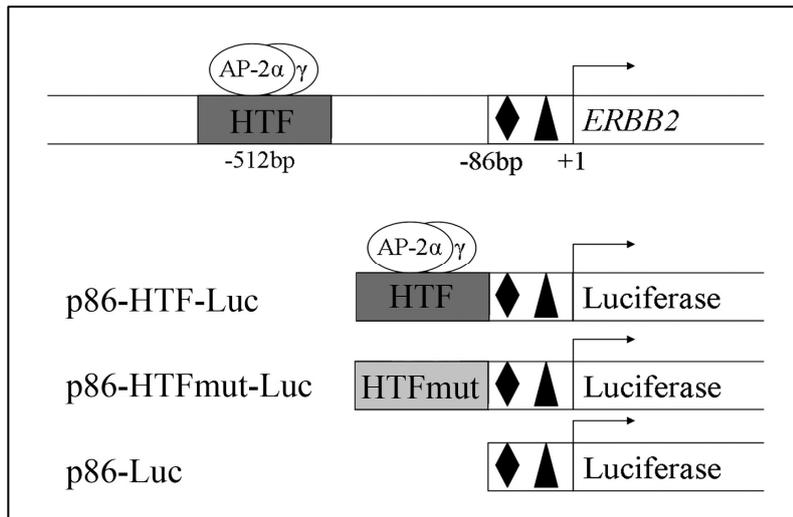


Figure R. 9. Schémas illustrant les différents vecteurs rapporteurs utilisés pour des transfections transitoires. Ces vecteurs se composent tous de la région du promoteur « core » du gène *ERBB2*, composée de 86bp contenant les boîtes TATA (triangle) et CAAT (losange) nécessaires à la transcription (p86-Luc). Le vecteur appelé **p86-HTF-Luc** contient en plus une séquence fixant AP-2, appelée HTF et située en -512bp du gène. Le vecteur **p86-HTFmut-Luc** contient cette région HTF mais avec 3 paires de bases mutées qui ne permettent plus à AP-2 de s'y fixer.

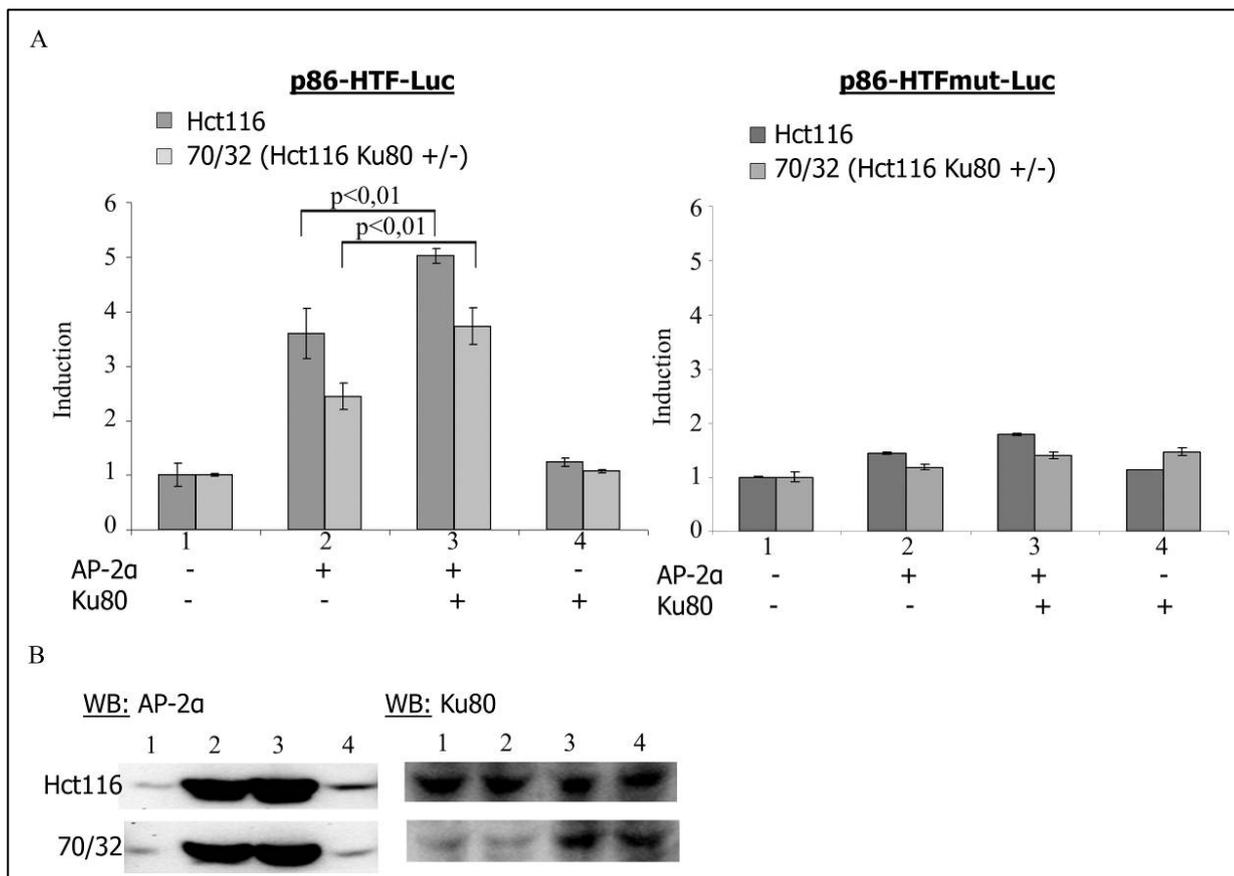


Figure R. 10. Activation de la transcription du promoteur d'*ERBB2* par AP-2α en combinaison avec Ku80. **A.** Les cellules Hct116 normales ou déficientes pour un allèle de Ku80 (70/32) ont été transfectées avec le vecteur rapporteur p86-HTF-Luc (gauche) ou p86-3PM-Luc (droite), ainsi qu'avec (+) un vecteur d'expression AP-2α ou Ku80 ou leur vecteur vide (-). L'induction de l'activité Luciferase des différentes conditions est rapportée à la condition avec les vecteurs d'expression vides. **B.** L'efficacité de transfection des différentes conditions (1 à 4) a été évaluée par western blot dirigé contre AP-2α et Ku80.

R.2.3 Rôle de la protéine Ku80 dans l'activité transcriptionnelle d'AP-2 α sur le promoteur d'*ERBB2*

Nous avons voulu ensuite étudier le rôle des protéines Ku dans l'expression d'*ERBB2*. Les protéines Ku interagissent avec la protéine AP-2 α , et nous avons voulu savoir si cette interaction avait un effet sur l'activité transcriptionnelle qu'a AP-2 α sur le promoteur d'*ERBB2*. Pour cela, nous avons utilisé des **vecteurs rapporteurs** codant pour la Luciférase (Luc) sous le contrôle du **promoteur « core » d'*ERBB2*** et d'une séquence fixant AP-2 (Figure R. 9). La séquence du promoteur « core » est composée des 86 paires de bases (-86bp) et contient la boîte TATA et la boîte CAAT. Ces deux séquences sont essentielles pour la fixation de la machinerie transcriptionnelle. Ces vecteurs ont été montrés précédemment comme activés par AP-2 α et AP-2 γ (Vernimmen et al., 2003a).

Pour cette étude, nous avons utilisé la lignée cellulaire Hct116, exprimant peu la protéine AP-2 α . En parallèle, nous avons utilisé la même lignée avec un allèle du gène Ku80 en moins (Ku80 +/-) et exprimant environ 40-60% la quantité normale de Ku80. Ces cellules, appelées **70/32** (ou Hct116 80+/-), ont été obtenues par l'équipe d'Hendrickson (Li et al., 2002).

En plus de la transfection des vecteurs rapporteurs codant pour la Luciférase, des vecteurs d'expression pour AP-2 α ou Ku80 ont été ajoutés, en comparaison à leur vecteur vide. La Figure R. 10 montre que l'activité transcriptionnelle du vecteur p86-HTF-Luc dans les cellules Hct116 est augmentée de 3,5 fois par l'ajout d'AP-2 α . Cette augmentation est moins forte (2,5 fois) dans les cellules 70/32. De même, quand on rajoute la protéine Ku80, cette activité augmente significativement (+40 à +50%) dans les deux types cellulaires. Lors de l'ajout de la protéine Ku80, l'activité transcriptionnelle d'AP-2 α sur le promoteur d'*ERBB2* est ainsi rétablie dans les cellules 70/32 par rapport aux Hct116. Par contre, les transfections d'AP-2 α et Ku80 ont peu d'effet sur le vecteur rapporteur avec le site AP-2 muté, p86-HTFmut-Luc.

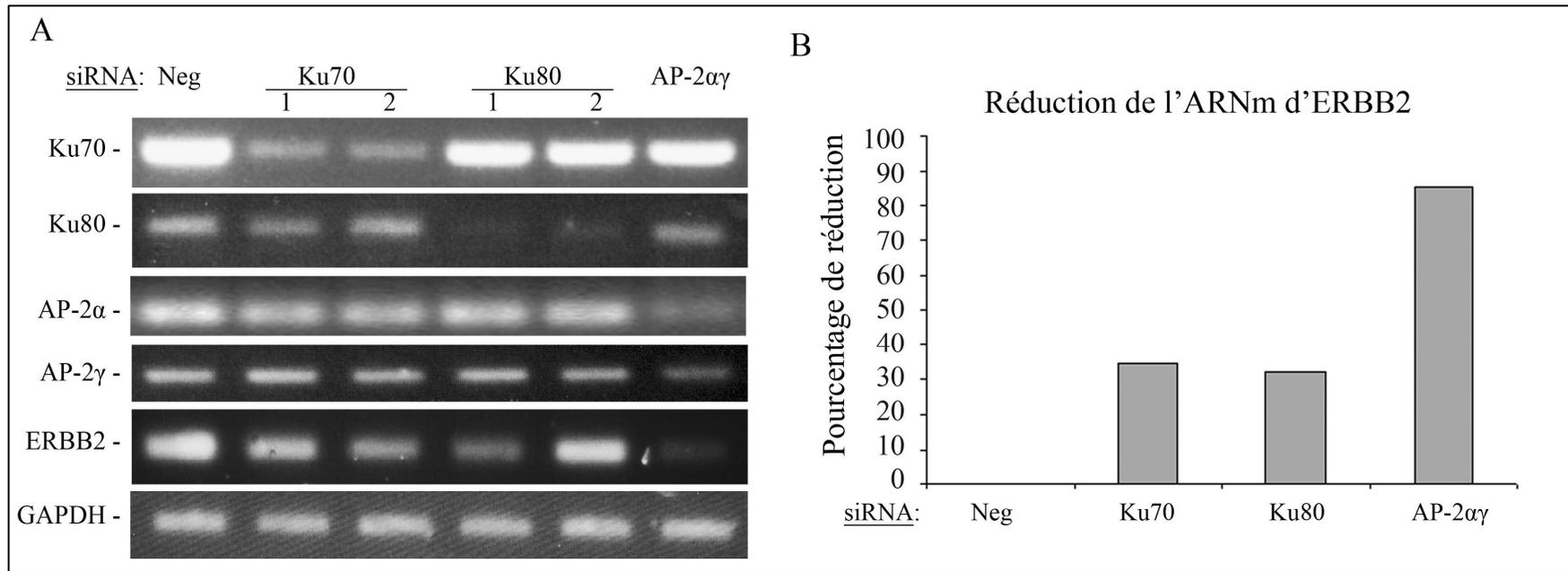


Figure R. 11. Expression des ARNm (RT-PCR) après traitement aux siRNAs pendant 90h, dans les BT-474. **A.** Les différents siRNAs sont représentés en haut, avec 2 séquences différentes pour les siRNA Ku70 et Ku80 (1 et 2). Les différents ARNm cibles pour la PCR sont indiqués à gauche. L'ARNm GAPDH sert de contrôle à la semi-quantification de l'ARNm. **B.** Illustration en pourcentage de réduction de l'expression de l'ARNm d'ERBB2 selon la densité relative du point A. Les valeurs pour Ku70 et Ku80 correspondent aux moyennes des résultats obtenus pour les deux siRNAs différents. Les niveaux ont été corrigés par rapport à ceux de la GAPDH.

R.2.4 Rôle des protéines Ku dans l'expression d'ERBB2.

R.2.4.a Rôle des protéines Ku dans l'expression de l'ARNm du gène *ERBB2*

Afin d'évaluer si les protéines Ku ont une influence sur l'expression d'ERBB2 endogène, nous avons diminué l'expression de Ku70 et de Ku80 à l'aide de la technique d'interférence à l'ARN (**siRNA**), décrite précédemment (voir § R.1.1). Cette technique utilise de courts brins d'ARN (20bp) dimérisés, appelés **siRNA**. Les transfections utilisées dans le cadre de ce travail sont transitoires et doivent être répétées en cas d'études plus prolongées.

Les lignées cellulaires **BT-474** et **SKBR3** ont été choisies pour leur surexpression d'ERBB2, d'AP-2 α et AP-2 γ . Deux séquences différentes pour chaque protéine Ku furent utilisées (Ku70-1, Ku70-2 et Ku80-1, Ku80-2). Après 90h de transfection de ces siRNAs, nous avons vérifié que **l'expression de l'ARNm** ciblé était bien éteinte, et spécifique pour chaque ARNm par PCR classique (end-point PCR après une transcription inverse des ARNm en cDNA) (Figure R. 11.A). Une combinaison de siRNAs dirigés contre AP-2 α et AP-2 γ (AP-2 $\alpha\gamma$) fut également utilisée pour cibler ces deux formes d'AP-2. Les différents siRNAs ont ainsi montré une bonne spécificité de ciblage et une bonne efficacité dans l'extinction des ARNm cibles.

De plus, l'expression de l'ARNm d'ERBB2 fut étudiée par RT-PCR (Figure R.11). La combinaison des siRNAs AP-2 $\alpha\gamma$ diminue fortement l'expression de l'ARNm du gène *ERBB2*, de 80-90% (Figure R.11.B). Cet effet avait déjà été montré par L. Delacroix dans sa thèse de doctorat, puis publié avec d'autres travaux (Article 1 en annexe) (Allouche A and Nolens G. et al., 2008). De manière intéressante, les siRNAs dirigés contre Ku70 et Ku80 montrent également une diminution de l'expression de l'ARNm d'ERBB2 entre 30 et 50%. Cela peut signifier qu'une réduction des niveaux des protéines Ku70 ou Ku80 engendre une réduction de la transcription du gène *ERBB2*.

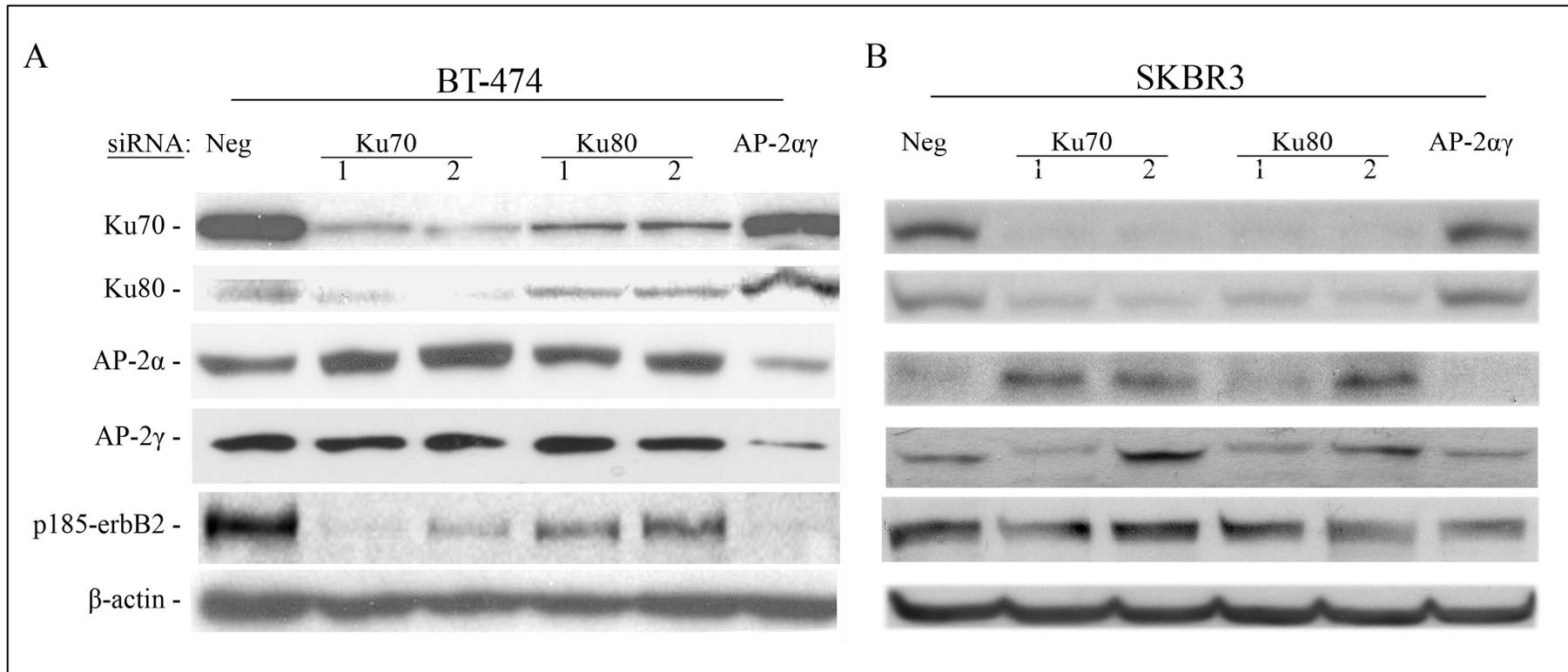


Figure R. 12. Expression des protéines (Western blot) après traitement aux siRNAs pendant 96h, A, dans les BT-474, **B** dans les SKBR3. Les différents siRNAs sont représentés en haut, avec 2 séquences différentes pour les siRNA Ku70 et Ku80 (1 et 2). Les différents anticorps utilisés sont indiqués à gauche. La β -actin sert de contrôle à la charge protéique.

R.2.4.b Rôle des protéines Ku dans l'expression de la protéine p185-erbB2.

Afin de se rendre compte que la réduction d'expression de l'ARNm d'ERBB2 résulte bien d'une diminution des protéines Ku70 et Ku80, nous avons analysé l'expression des **protéines** par western-blot dans les BT-474 et SKBR3, après 96h de transfection des siRNAs (Figure R. 12).

La première constatation est que les siRNAs dirigés contre Ku70 altèrent non seulement l'expression de la protéine Ku70, mais également celle de Ku80. Et c'est également le cas pour les siRNAs Ku80. Cet effet a déjà été montré par de précédentes études (Belenkov et al., 2002; Bertolini et al., 2007; Mayeur et al., 2005). Cependant, ces études n'avaient pas regardé le niveau de l'expression de l'ARNm. Dans ce travail, nous avons montré à la Figure 11.A, que les siRNAs Ku70 et Ku80 n'avaient une influence que sur leur ARNm cible.

De plus, la figure R.12 montre que l'expression de la protéine **p185-erbB2** est modifiée sous l'effet des différents siRNAs Ku et AP-2. Cependant, ces effets varient d'une cellule à l'autre. Dans les cellules BT-474, les siRNAs AP-2 α ont un effet important sur la réduction de la protéine p185-erbB2 (Figure R.12.A). Ces résultats combinés avec ceux obtenus pour l'expression de l'ARNm d'ERBB2 renforcent l'hypothèse que les facteurs de transcription AP-2 α et AP-2 γ influencent fortement la l'expression d'ERBB2, tant au niveau de son ARNm que de sa protéine.

Les siRNAs dirigés contre les protéines Ku ont également un effet de réduction sur l'expression de p185-erbB2 dans les BT-474. Néanmoins, les siRNAs Ku70 ont plus d'effet que les siRNAs Ku80. Cette différence peut être mise en corrélation avec l'efficacité d'extinction des protéines Ku par les siRNAs. En effet, les siRNAs Ku70 sont plus efficaces à éteindre les protéines Ku que les siRNAs Ku80, dans les BT-474. Cependant, la réduction d'expression de p185-erbB2 est plus importante que celle de l'ARNm ERBB2 pour les siRNAs Ku70 ou Ku80. Cette différence laisse à penser qu'un autre mécanisme pourrait intervenir dans la réduction de p185-erbB2 (voir § R.2.5. Discussion).

Les résultats obtenus dans les cellules SKBR3 diffèrent de ceux obtenus dans la lignée BT-474 (Figure R.17.B). Tout d'abord, les siRNAs Ku70 ou Ku80 ont le même effet sur le niveau d'extinction des deux protéines Ku. Ensuite, l'effet de la réduction des protéines Ku a peu d'effet sur l'expression de la protéine p185-erbB2. Cette réduction se situe entre 10-20% de réduction (quantification non montrée, voir article 2 en annexe). La même constatation

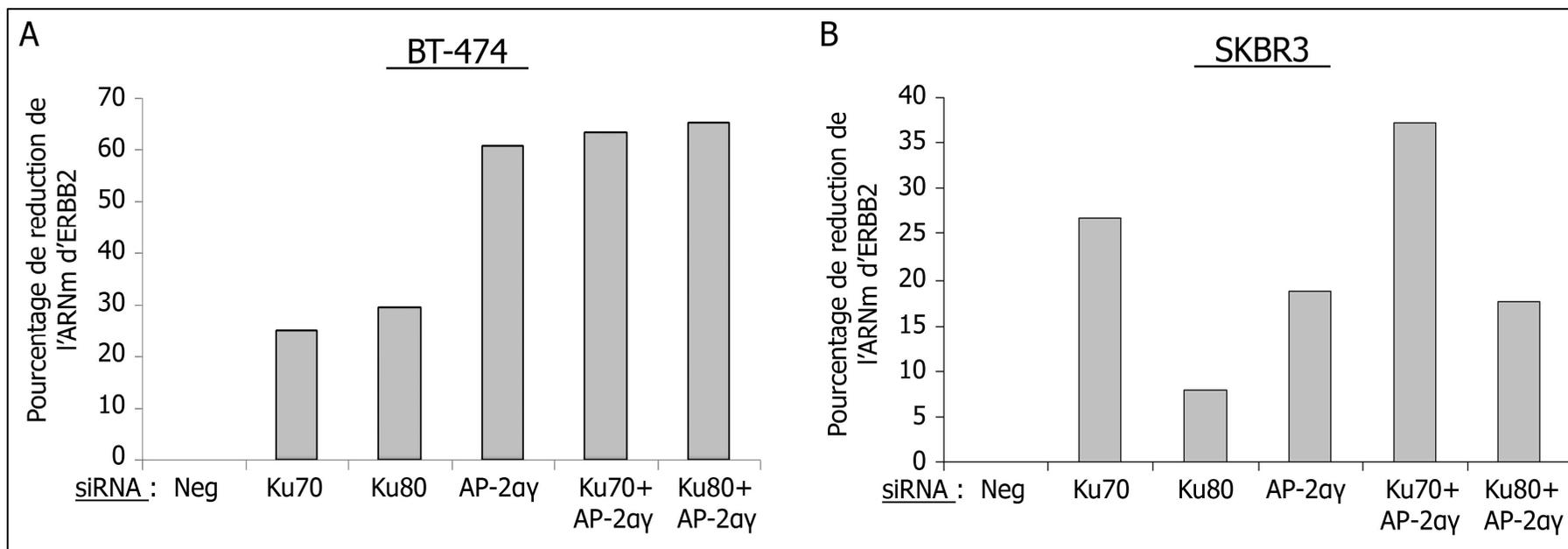


Figure R. 13. Pourcentage d'inhibition de l'ARNm d'ERBB2 après traitement aux siRNAs pendant 90h, A. dans les BT-474, **B.** et dans les SKBR3. Les différentes combinaisons de siRNAs sont représentées en bas. La quantification et la normalisation ont été réalisées à l'aide de la β -2 microglobuline.

est faite pour les siRNAs AP-2 α , avec environ 20% de réduction sur l'expression de p185-erbB2. Ainsi, même si les cellules SKBR3 surexpriment ERBB2, il semble y avoir un mécanisme différent, voire supplémentaire, influençant cette surexpression par rapport aux cellules BT-474.

R.2.4.c Rôle des protéines Ku avec AP-2 α et AP-2 γ dans l'expression de l'ARNm d'ERBB2.

Les résultats obtenus avec les siRNAs suggèrent que les protéines Ku sont impliquées dans l'expression d'ERBB2, à l'instar des protéines AP-2 α et AP-2 γ . De plus, quand la réduction d'AP-2 α et AP-2 γ a un effet prononcé sur l'expression d'ERBB2 dans les BT-474, la réduction des protéines Ku en a un aussi. Par contre, quand cet effet est plus faible, dans les SKBR3, il l'est pour les deux familles de protéines. Il semble donc que les implications mutuelles soient corrélées. Cela laisse à penser qu'il existe une **collaboration** des protéines Ku avec AP-2 dans l'expression d'ERBB2. Afin d'approfondir cette hypothèse, les cellules BT-474 et SKBR3 ont été transfectées à l'aide de combinaisons de siRNAs. L'ARNm du gène *ERBB2* a ensuite été quantifié par real-time PCR (Figure R. 13). Les siRNAs Ku70-1 et Ku80-2 ont été choisis comme unique siRNA Ku70 et Ku80.

Dans les cellules BT-474 (Figure R.13.A), les pourcentages de réduction de l'ARNm ERBB2 pour les conditions siRNA Ku70, Ku80 et AP-2 α sont un peu plus faibles que celles observées Figure R.13.B., mais ont le même profil de réduction. Cependant la combinaison des siRNAs AP-2 α avec un siRNA Ku70 ou Ku80 n'augmente pas la réduction d'expression de l'ARNm ERBB2 par rapport à la condition avec les siRNAs AP-2 α seuls, dans cette lignée cellulaire.

Dans les cellules SKBR3 (Figure R.13.B), la réduction de l'expression de l'ARNm d'ERBB2 est globalement plus faible pour les siRNAs Ku et/ou AP-2 α par rapport aux cellules BT-474. Ces résultats sont proches de ceux obtenus précédemment (voir § R.2.4.a). Le siRNA Ku70 réduit de 25% l'expression de l'ARNm d'ERBB2, le siRNA Ku80 le réduit de 5 à 10%, et les siRNAs AP-2 α le réduisent de 15 à 20%. Cependant la combinaison du siRNA Ku70 avec les siRNAs AP-2 α réduit entre 35 et 40% l'expression de l'ARNm d'ERBB2.

Au vu de ces résultats, il semble que l'inhibition de l'ARNm d'ERBB2 dans les cellules BT-474 aie atteint son maximum avec les siRNAs AP-2 α et qu'il sera difficile de réduire encore plus l'expression en ciblant des cofacteurs comme Ku. Par contre, dans les SKBR3 où les

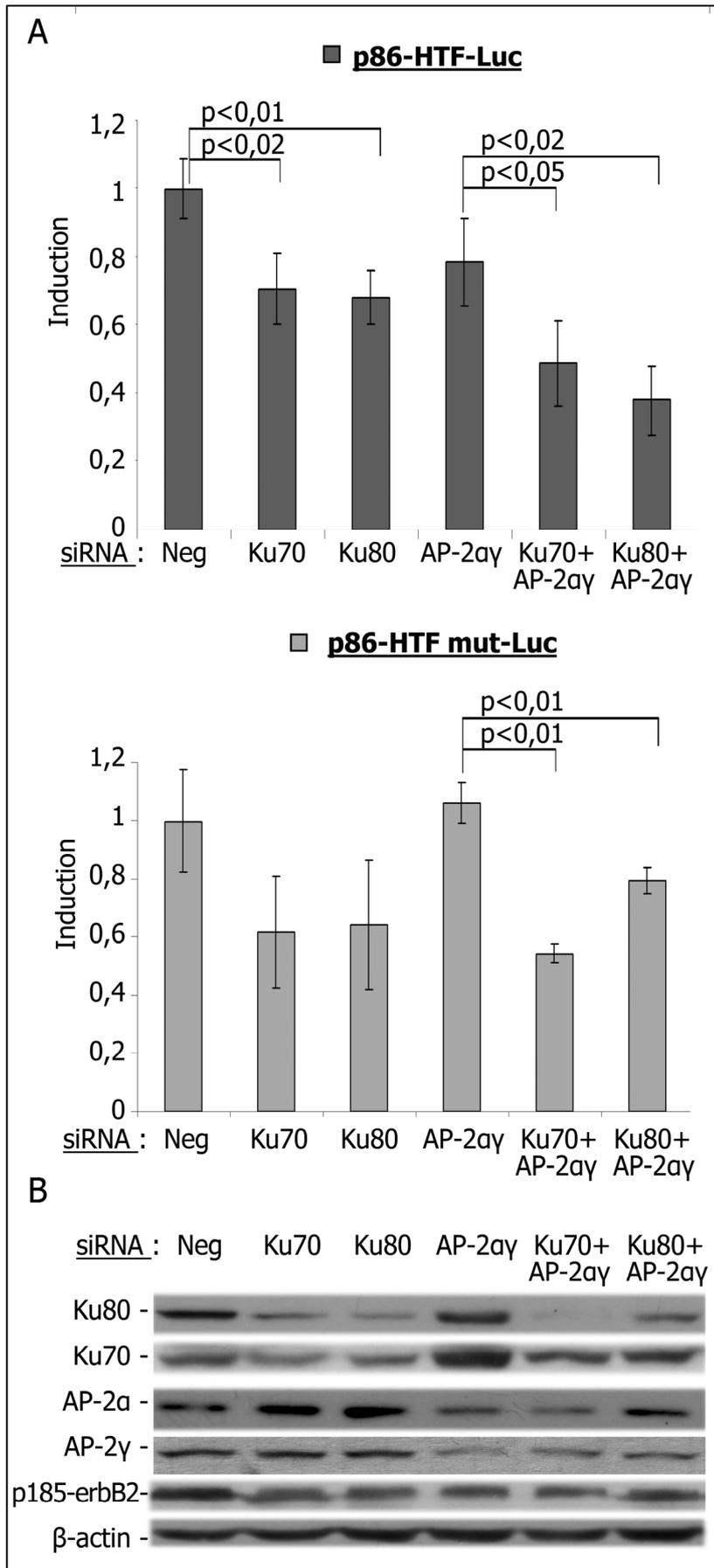


Figure R. 14. Effet de l'inhibition des protéines Ku et de la fixation d'AP-2 α et AP-2 γ sur le promoteur proximal d'*ERBB2* **A**, Mesure de l'activité Luciférase de 2 vecteurs rapporteurs (p86-HTF-Luc en gris foncé, et p86-HTFmut-Luc en gris clair) décrits Figure R. 9. Les cellules (ici, SKBR3) ont été préalablement traitées par différentes combinaisons de siRNA (en dessous des graphiques) pendant 72h. Les mesures ont été rapportées sur la condition du siRNA négatif (Neg). **B**. Western blot des protéines provenant des cellules traitées par les différentes conditions en siRNA du point A (au dessus). La β -actin sert de contrôle à la charge protéique.

siRNA AP-2 γ ont beaucoup moins d'effet, il semble que cette réduction ne soit pas au maximum car elle peut être renforcée par l'ajout de siRNA Ku70.

R.2.5 Rôle des protéines Ku dans l'activité du promoteur du gène *ERBB2*.

Les protéines Ku interagissent avec AP-2 α , et ont toutes un effet sur l'expression de l'ARNm et des protéines ERBB2. Les protéines AP-2 α et AP-2 γ influencent l'activité du promoteur d'*ERBB2* en se fixant à différentes régions du promoteur d'*ERBB2* (voir Introduction § I.2.3). Dans ce travail, il a également été montré *in vitro* qu'une réduction de la protéine Ku80 avait une influence sur l'activité d'AP-2 α sur une partie du promoteur d'*ERBB2*. Nous avons voulu vérifier que les protéines Ku ont un effet sur l'activité du promoteur d'*ERBB2*, en coopérant ou non avec AP-2 α et AP-2 γ , dans des lignées mammaires. Pour cela, les cellules BT-474 et SKBR3 ont été traitées avec différentes combinaisons de siRNAs. Ensuite elles ont été transfectées avec différents **vecteurs rapporteurs** codant pour la Luciferase. Ces trois vecteurs ont déjà été décrits Figure R.9.

Après 72h de traitement aux **siRNAs** Ku70, Ku80, AP-2 γ et avec les combinaisons aux siRNAs AP-2 γ + Ku70, ou AP-2 γ + Ku80, les lignées cellulaires BT-474 et SKBR3 ont été transfectées avec les vecteurs rapporteurs décrits plus haut. Un quatrième vecteur rapporteur constitué d'un promoteur SV40 (pGL3 Control vector, Promega) répondant constitutivement dans les cellules a été utilisé comme contrôle positif. 40h après transfection de ces vecteurs, les protéines ont été extraites et l'activité Luciferase mesurée en triplicat pour chaque condition (Figure R.14.A). Un western-blot a également été réalisé pour s'assurer du bon fonctionnement du traitement aux siRNAs (Figure R.14.B). Les résultats illustrés ici ont été obtenus dans les cellules SKBR3 et ont le même profil que ceux obtenus dans les cellules BT-474 (illustrés dans l'article 2 en annexe). Les résultats obtenus pour le vecteur p86-Luc sont semblables et significativement identiques à ceux obtenus pour le vecteur p86-HTFmut-Luc (résultats non montrés).

Au vu des profils d'induction obtenus, on constate que la réduction des protéines Ku70 et Ku80 affecte l'activité des trois vecteurs rapporteurs. Cependant cette réduction n'est

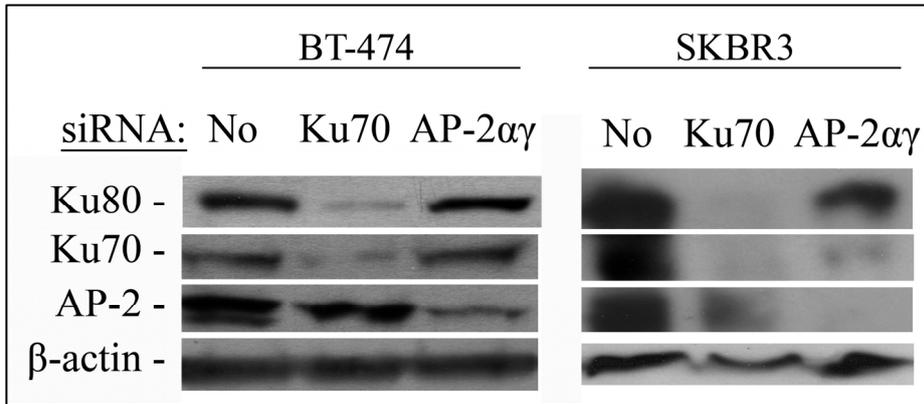


Figure R. 15. Préparation de chromatine avec réduction des protéines AP-2 (α et γ) ou des protéines Ku. Western blot sur les différentes préparations de chromatine provenant de cellules BT-474 (à gauche) et SKBR3 (à droite) traitées avec différents siRNAs (au dessus). Après préparation et réversion de la chromatine, 60 μ g de protéine ont été analysés par western blot à l'aides des anticorps Ku80, Ku70, AP-2 (reconnaissant α et γ). La β -actin sert de contrôle à la charge protéique.

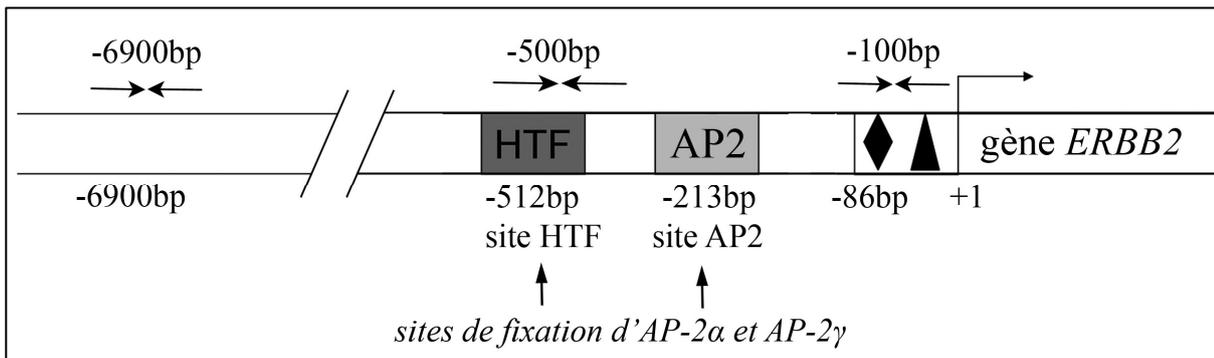


Figure R. 16. Illustration des différentes zones amplifiées par ChIP sur le promoteur du gène *ERBB2*. Les trois zones fléchées, au dessus, correspondent aux séquences amplifiées par ChIP assay, sur différentes parties du promoteur. Leur nom correspond à la distance en nucléotides les séparant du codon start (+1) du gène. HTF et AP2

significative que pour le vecteur contenant la séquence de fixation à AP-2 (p86-HTF-Luc). Celle-ci est réduite de 30-35% pour les siRNAs Ku70 et Ku80, par rapport à la condition siRNA Neg. Les protéines Ku ont donc une influence sur l'activité du promoteur d'*ERBB2*, seulement quand les protéines AP-2 peuvent s'y fixer.

Comme attendu, la réduction d'expression des protéines AP-2 α et AP-2 γ (conditions siRNA AP-2 $\alpha\gamma$) ne réduit que l'expression du promoteur contenant la séquence de fixation à AP-2, appelée HTF. On observe même une légère augmentation de l'activité Luciférase pour les deux autres vecteurs par rapport à la condition siRNA Neg. Mais cette augmentation est également observée avec le vecteur contrôle SV40-pGL3 (données en annexe, voir Supplemental Data article 2). Ces données confirment celles des précédents travaux effectués sur l'étude du promoteur d'*ERBB2* (Vernimmen et al., 2003a; Begon et al., 2005).

De plus, la **combinaison des siRNAs** ciblant les protéines AP-2 et Ku, montre que l'activité du vecteur p86-HTF-Luc est encore plus réduite par rapport à la condition utilisant les siRNAs AP-2 $\alpha\gamma$ seuls. Ceci suggère que les protéines Ku ont un effet combiné avec les protéines AP-2 α et AP-2 γ sur l'activité du promoteur d'*ERBB2*. Cependant dans ces mêmes conditions, les deux autres vecteurs voient également leur activité significativement diminuer. Ainsi les protéines Ku influencent l'activité des vecteurs rapporteurs ne fixant pas AP-2, en absence d'AP-2 α et AP-2 γ . Les trois vecteurs ont en commun la séquence du promoteur « core » allant de -86bp au codon start (0bp).

Enfin, les résultats obtenus sur le western-blot (Figure R.14.B), montrent également une diminution de l'expression de la protéine p185-erbB2 pour les conditions en siRNA Ku et AP-2. Cependant, il est difficile d'affirmer qu'il existe un effet combiné des siRNAs Ku et AP-2 sur l'expression de cette protéine.

R.2.6 Interaction des protéines Ku avec le promoteur proximal du gène *ERBB2*.

Les protéines Ku ont donc un effet sur l'activité du promoteur d'*ERBB2*, *in vitro*. Nous savons qu'elles interagissent avec les protéines AP-2 et qu'elles régulent leur activité sur ce promoteur. Cependant, nous ne savons pas et si les protéines Ku interagissent avec le promoteur d'*ERBB2* *in vivo*. Pour étudier cette interaction, nous avons effectué des **ChIP assay** (Chromatin Immuno-Precipitation). Cela consiste à fixer de manière permanente (cross-link) les protéines qui interagissent avec l'ADN dans la cellule. Cela signifie que cette

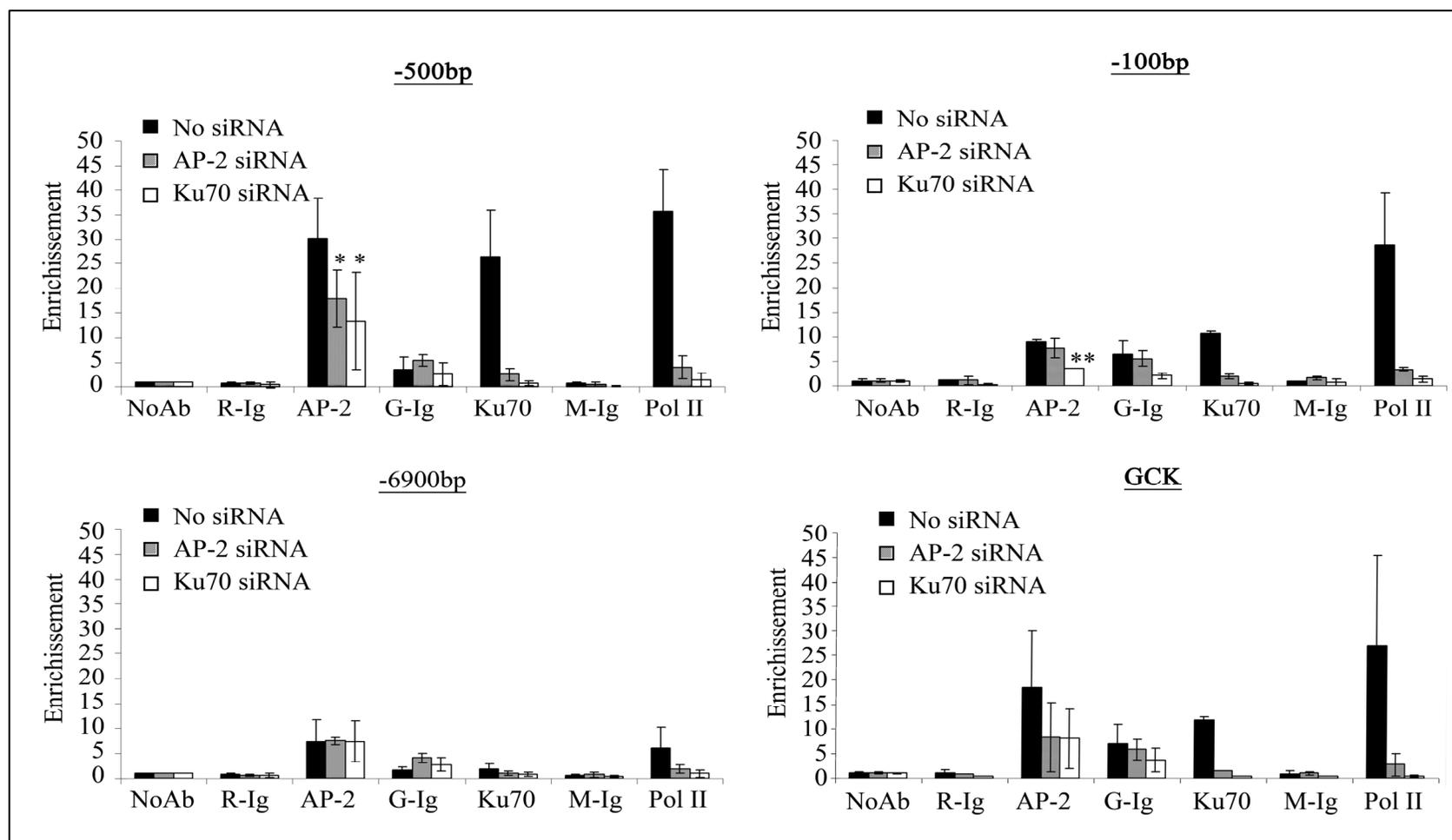


Figure R. 17. Expérience de ChIP sur la chromatine de BT-474, non-traitées (colonnes noires) ou traitées aux siRNAs AP-2 α (colonnes grises) ou Ku70 (colonnes blanches). Le titre de chaque graphique correspond aux séquences étudiées et décrites Figure R.16. Des anticorps dirigés contre AP-2 (α et γ), Ku70 et PolII (RNA polymérase II) ont été comparés à des anticorps contrôles (Ig) de la même espèce, situés à leur gauche respectives (R = Rabbit, G = Goat, M = Mouse). Après immunoprecipitation et quantification des séquences par Real-time PCR, les résultats ont été rapportés à une condition sans anticorps (NoAb). * et ** Ces valeurs sont significativement différentes par rapport à la condition « No siRNA » (p-values < 0,05%).

interaction sera présente seulement là où la chromatine est ouverte et où le système transcriptionnel est actif. Ensuite cette chromatine est fragmentée en petites séquences d'ADN d'environ 500bp. Les protéines d'intérêt sont immunoprécipitées, précipitant avec elles la/les séquences d'ADN qu'elles ont fixées. Après dissociation de la liaison protéine-ADN, l'ADN est purifié et les séquences étudiées sont amplifiées par PCR classique (End point PCR), ou quantifiées par Real-time PCR.

Pour cette expérience, les cellules des lignées BT-474 et SKBR3 ont été traitées à l'aide de siRNAs dirigés contre les protéines AP-2 α et AP-2 γ (siRNA AP-2 $\alpha\gamma$) ou contre Ku (siRNA Ku70). Comme contrôle, les cellules non-traitées ont été utilisées. Un western-blot a été effectué afin de s'assurer de la bonne extinction des protéines cibles (Figure R.15). Les séquences d'ADN étudiées correspondent au **promoteur « core »** (-100bp), au site HTF fixant AP-2 α et AP-2 γ (-500bp) du promoteur proximal d'*ERBB2*, ainsi qu'à une séquence lointaine du promoteur ne fixant pas AP-2 (-6900bp) et utilisée comme contrôle négatif (Figure R.16). Une séquence connue pour fixer les protéines Ku a été également utilisée comme contrôle positif (GCK) (Mo and Dynan, 2002).

Les protéines AP-2 (α et γ), Ku70, et l'ARN Polymérase II (Pol II) ont été ciblées à l'aide d'anticorps spécifiques. L'amplification d'ADN précipité par ces anticorps est comparée à celle d'anticorps contrôles de la même espèce. Comme référence globale, le résultat obtenu pour chaque anticorps était reporté à une condition sans anticorps. La Pol II est une protéine faisant partie de la machinerie transcriptionnelle et son recrutement sur un promoteur indique une activation de la transcription du gène correspondant. L'utilisation d'un anticorps anti-Pol II sert donc de contrôle positif à la transcription. Un anticorps dirigé contre Ku80 (C-20, Santa Cruz), et référencé dans des expériences de ChIP (Matheos et al., 2003), a également été utilisé mais sans succès, ni pour les séquences du promoteur d'*ERBB2*, ni même pour la séquence contrôle GCK.

Dans les cellules BT-474 non-traitées (Figure R.17), l'anticorps AP-2 (qui reconnaît les formes α et γ) ainsi que l'anticorps Pol II immunoprécipitent la séquence -500bp, comme montré précédemment (Delacroix et al., 2005; Begon et al., 2005). De plus, et dans la même ampleur, l'anticorps Ku70 recrute également cette séquence. La séquence « contrôle » GCK est également amplifiée à l'aide de ces trois anticorps. En comparaison aux résultats obtenus avec la séquence -500bp, la séquence -100bp est plus faiblement recrutée par AP-2 et Ku70, tandis que la Pol II permet un meilleur recrutement. Les résultats obtenus pour la séquence

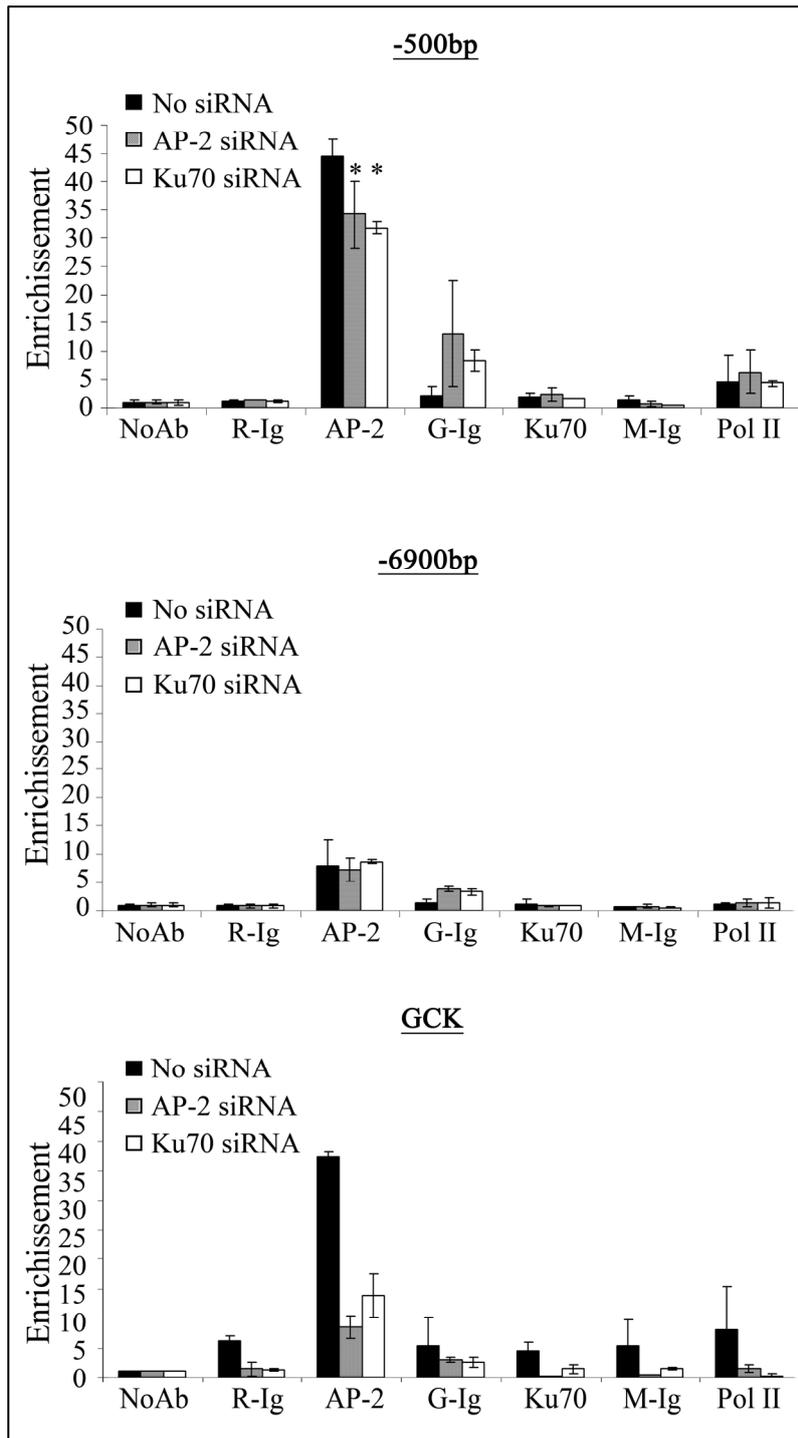


Figure R. 18. Expérience de ChIP sur la chromatine de SKBR3, non-traitées (colonnes noires) ou traitées aux siRNAs AP-2 α (colonnes grises) ou Ku70 (colonnes blanches). Le titre de chaque graphique correspond aux séquences étudiées et décrites Figure R.16. Des anticorps dirigés contre AP-2 (α et γ), Ku70 et PolII (RNA polymérase II) ont été comparés à des anticorps contrôles (Ig) de la même espèce, situés à leur gauche respectives (R = Rabbit, G = Goat, M = Mouse). Après immunoprecipitation et quantification des séquences par Real-time PCR, les résultats ont été rapportés à une condition sans anticorps (NoAb). * Ces valeurs sont significativement différentes par rapport à la condition « No siRNA » (p-values <0,02%).

-6900bp ont été considérés comme témoins négatifs étant donné que cette séquence est dépourvue de site de fixation pour AP-2.

Le fait de traiter les cellules **BT-474** aux **siRNAs AP-2 $\alpha\gamma$** , réduit significativement d'un peu moins de la moitié le recrutement de la séquence -500bp avec l'anticorps AP-2. Par contre, cette diminution est bien plus importante pour les anticorps dirigés contre Ku70 et Pol II. Cette observation est la même pour les séquences -100bp et GCK. Le traitement au **siRNA Ku70** a un effet semblable par rapport aux siRNAs AP-2 $\alpha\gamma$. Ce traitement réduit même un peu plus le recrutement des séquences -100bp et -500bp par les anticorps AP-2 et Ku70.

Dans les cellules **SKBR3** (Figure R.18), les anticorps Ku70 et Pol II se sont montrés inefficaces à recruter les séquences cibles, y compris la séquence GCK. Cependant l'anticorps AP-2 recrute bien la séquence -500bp, et également la séquence GCK. Les traitements aux siRNAs AP-2 $\alpha\gamma$ ou Ku70 réduisent significativement d'environ 30% le recrutement de la séquence -500bp, et d'environ 60% pour la séquence GCK par rapport aux cellules non-traitées.

Combinés, ces résultats de ChIP suggèrent que la présence des protéines Ku est importante pour le recrutement des protéines AP-2 α et AP-2 γ sur le promoteur proximal d'*ERBB2*. De plus, ces résultats confirment la présence des protéines AP-2 sur ce promoteur. Dans les cellules BT-474, la protéine Ku70 est recrutée de la même façon que les protéines AP-2. De plus, la présence des protéines AP-2 (α et γ) et des protéines Ku y sont essentielles pour le bon recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Pol II) sur ce promoteur. Par contre, dans les SKBR3, il est difficile de confirmer le recrutement des protéines Ku sur le promoteur proximal d'*ERBB2* étant donné l'incapacité de précipiter Ku70 (ni Pol II), ainsi que Ku80 dans les deux lignées.

R.2.7 Conclusion.

Afin de savoir si les protéines Ku sont impliquées dans l'expression d'*ERBB2*, nous avons procédé à différentes études portant sur l'activité du promoteur, la transcription du gène et l'expression protéique d'*ERBB2*.

Préalablement, nous avons montré que les protéines Ku70 et Ku80 sont fortement exprimées dans le noyau de lignées cancéreuses utilisées. D'après des études immuno-

histologiques, il n'existerait pas de corrélation entre l'expression des protéines Ku dans des tissus de cancers mammaires et des tissus sains (Someya et al., 2007). Cependant, en combinant les observations avec d'autres tissus, l'expression de Ku70 serait corrélée à une indifférenciation cellulaire, ce qui est propre aux cellules cancéreuses (Choi et al., 2002).

Etant conscient de l'expression ubiquitaire des protéines Ku, nous avons utilisé une lignée cellulaire dérivée exprimant moins la protéine Ku80. Ainsi nous avons pu montrer que la protéine AP-2 α nécessite la protéine Ku80 afin d'obtenir sa pleine activité sur le promoteur d'*ERBB2*.

L'extinction de l'expression des protéines par interférence à l'ARN (siRNA) a permis l'étude sous d'autres aspects moléculaires. Plusieurs observations en ressortent.

Premièrement, nous avons pu observer que l'utilisation des siRNAs dirigés contre l'ARNm de Ku70 diminuait non seulement l'expression de la protéine Ku70, mais également celle de Ku80. Cette observation est également vraie pour les siRNA Ku80. Lorsque l'expression d'une protéine de l'hétérodimère Ku70/Ku80 est réduite, son partenaire l'est aussi. Cette observation a déjà été faite dans d'autres études (Belenkov et al., 2002; Bertolini et al., 2007; Mayeur et al., 2005). Leur hypothèse à cette observation est que l'expression de Ku80 pouvait influencer la transcription ou la stabilité de la protéine Ku70. Mais, dans cette étude, nous avons montré que seule l'expression de l'ARNm du Ku ciblé était réduite, et non celui de son partenaire. Ces résultats suggèrent que l'effet de réduction sur les deux protéines Ku ne résulte pas d'un effet sur la transcription ou sur l'ARNm de l'autre partenaire Ku ciblé. Cet effet croisé serait plutôt la conséquence d'une déstabilisation du partenaire, voire d'une dégradation de celui-ci, lorsque l'hétérodimère Ku70/Ku80 n'est pas formé. Ces hypothèses doivent encore être confirmées.

Deuxièmement, la réduction des protéines Ku a montré qu'elle diminuait les niveaux d'expression de l'ARNm *ERBB2* et de la protéine p185-*erbB2*. Ceci indique que les protéines Ku70 et Ku80 ont un effet sur l'expression d'*ERBB2*, et sont impliquées dans la transcription du gène. Cependant, le pourcentage de réduction de la protéine p185-*erbB2* est plus important par rapport à celui de l'ARNm correspondant. Cette différence pourrait être expliquée par un autre mécanisme post-transcriptionnel des protéines Ku sur l'expression de p185-*erbB2*.

Ensuite, ces siRNAs ont permis de montrer une coopération des protéines AP-2 α et AP-2 γ avec les protéines Ku sur l'activité du promoteur d'*ERBB2*. Les expériences de ChIP

combinées aux siRNAs ont également montré que ces protéines doivent être complémentaires pour être recrutées sur ce promoteur. La réduction de l'une engendre une diminution du recrutement de l'autre. Ces réductions affectent également le recrutement de la machinerie transcriptionnelle sur ce promoteur.

Cependant, ces différents résultats ont mis en évidence une différence entre deux lignées cellulaires surexprimant conjointement AP-2 et ERBB2 : la lignée BT-474 et la lignée SKBR3. Tout d'abord, l'efficacité de réduction des protéines par les siRNAs s'est toujours montrée plus efficace dans la lignée BT-474 par rapport à la lignée SKBR3. Les niveaux de réduction d'ERBB2, tant pour les siRNAs Ku que les siRNAs AP-2 α γ , se sont montrés bien moins importants dans les cellules SKBR3. Même l'efficacité de l'immunoprecipitation (ChIP) s'y est trouvée différente par rapport aux cellules BT-474. Il faut garder à l'esprit que ces résultats ont été réalisés avec des lignées cancéreuses, donc **anormales** par définition. Celles-ci sont aneuploïdes, ont des aberrations chromosomiques différentes, n'ont pas le même temps de doublement et n'ont pas le même transcriptome.

Tous ces facteurs pris en compte, il n'est pas difficile de voir cette différence de résultats sous un autre aspect. Ainsi, l'utilisation des ces deux lignées cellulaires différentes permettent de se rendre compte que, combinés, les résultats vont dans le même sens, et ce pour des lignées ayant en commun la surexpression d'AP-2 et d'ERBB2.

Ainsi, on peut conclure que les protéines Ku70 et Ku80 coopèrent avec les protéines AP-2 α et AP-2 γ dans la surexpression d'ERBB2 dans des lignées du cancer du sein.

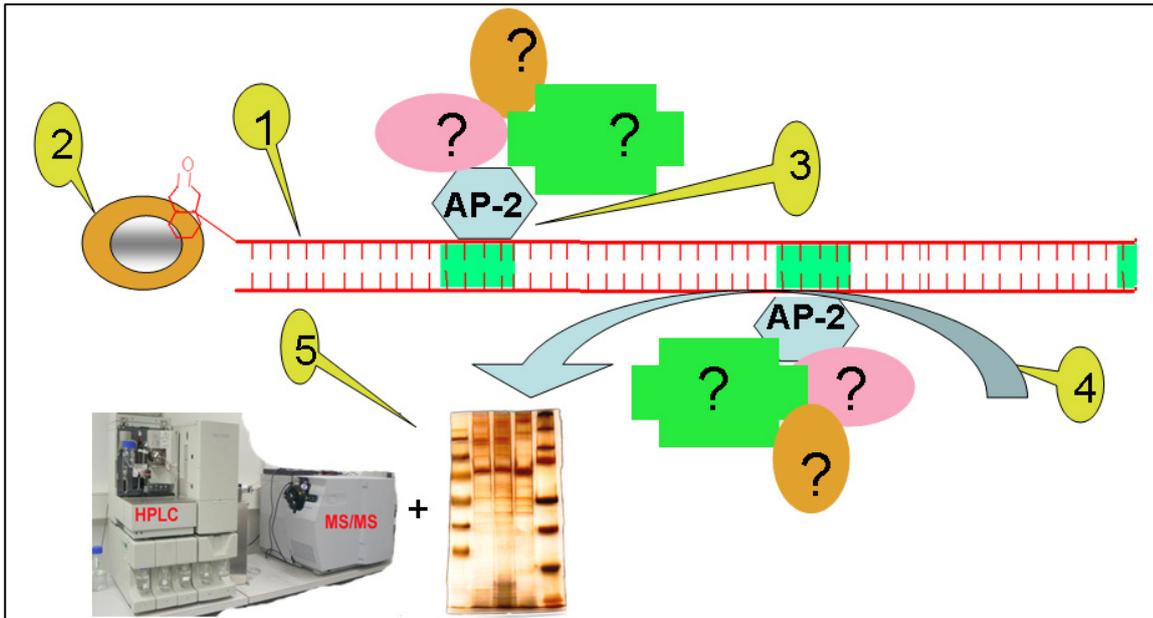


Figure R. 19 Schémas représentant la technique de chromatographie d'affinité sur ADN et les différentes étapes de purification des protéines. 1. Le brin d'ADN contenant la séquence spécifique est concatémérisé (répétée plusieurs fois par PCR). 2. Celle-ci, préalablement biotinylée, est alors fixée sur des billes magnétiques enrobées de streptavidine. 3. Les billes sont incubées avec des fractions nucléaires de cellules surexprimant AP-2 et ERBB2 (BT-474). Ces extraits contiennent les facteurs de transcription AP-2 et les protéines interagissant avec. 4. Les protéines ayant fixés l'ADN sont ensuite éluées et, 5, analysées sur gel de polyacrylamide pour être enfin identifiées par spectrométrie de masse.

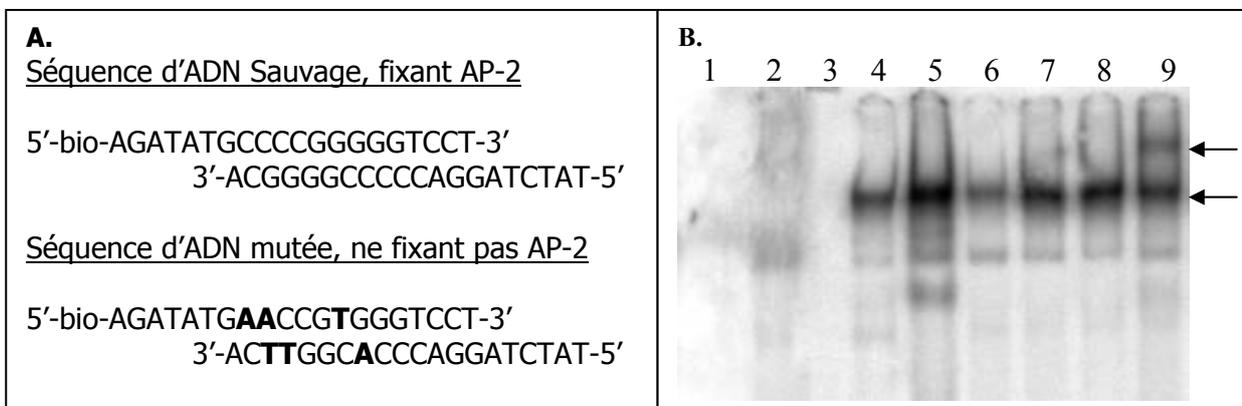


Figure R. 20. Séquences d'ADN utilisées pour la chromatographie d'affinité sur ADN. **A.** La séquence sauvage correspond à celle située en -516bp du gène codant ERBB2, et connue pour fixée AP-2. La même séquence, mais mutée pour 3 paires de base, ne fixe plus AP-2 et est alors utilisée comme contrôle négatif. **B.** Retard sur gel effectué à l'aide de ces séquences marquées radioactivement incubées avec des extraits nucléaires; de cellules BT-474. En 1, avec la séquence mutée non marquée; 2. avec la séquence mutée marquée; 3. avec la séquence sauvage non-marquée; 4. avec la séquence sauvage marquée. La flèche du bas montre le retard de la séquence marquée. 5. égal à 4 mais avec deux fois plus de protéine ; 6. égal à 5 mais avec une compétition de 100 fois plus de séquence sauvage non-marquée ; 7. égal à 5 mais avec une compétition de 100 fois plus de séquence mutée non-marquée ; 8. égal à 5 mais avec une compétition de 100 fois plus d'ADN non relevant ; 9. égal à 5 mais avec une incubation d'anticorps polyclonal anti-AP-2 α (SantaCruz, C-18). La flèche du haut montre le retard supplémentaire de la bande (supershift).

Résultats Annexes

R.3. R-Annexe I. Mises au point d'une technique d'affinité sur ADN.

Afin d'identifier les protéines interagissant avec les protéines AP-2 sur le promoteur d'*ERBB2*, nous avons développé une approche originale: la chromatographie d'affinité sur ADN. Cette technique consiste à fixer sur un support des brins d'ADN contenant la séquence voulue et d'y incuber des extraits protéiques de cellules étudiées (Figure R. 19). Cette méthode est plus communément appelée **Chromatographie d'affinité sur ADN (CAA)** ou **DNA-pull down**. Nous avons repris les recommandations d'autres études, et nous y avons apporté quelques mises au point.

Tout d'abord, nous avons utilisé des **extraits nucléaires** de lignées de cancer du sein surexprimant ERBB2 et AP-2 (BT-474, ZR-75.1 SKBR3), afin de concentrer les protéines étudiées. Ensuite il a fallu extraire ces protéines dans des **conditions non-dénaturantes** (pas/peu de détergent, ni d'agent réducteur). Ces agents peuvent nuire à la conformation et à l'interaction des protéines. L'absence de ces détergents a également été évitée dans les tampons de lavage. Comme support, nous avons utilisé des billes magnétiques enrobées de streptavidine, et l'ADN utilisé a été biotinylé (Tag biotine en l'extrémité 5'). Ce système de Tag comporte de nombreux avantages par rapport à d'autres méthodes de purification et est de plus en plus utilisé (Diamandis and Christopoulos, 1991; Wilchek and Bayer, 1990). Les billes magnétiques ont été manipulées par un robot afin d'augmenter la robustesse de la technique.

Le design de l'ADN a également été étudié. Les brins d'ADN étaient composés de la séquence étudiée répétée plusieurs fois. Ces longs brins d'ADN sont appelés **Concatémères** ou Multimères d'ADN. La fabrication des concatémères a été réalisée par self-priming-PCR décrite dans la partie Matériel et Méthode (White et al., 1991). Les séquences utilisées sont celles décrites par Vernimmen comme étant la séquence sauvage HTF (WT), pour celle fixant AP-2, et HTF-AA/T (Mut), mutée en trois bases et ne fixant pas AP-2 (Figure R. 20). La spécificité de séquences pour AP-2 a été vérifiée par retard sur gel (ou EMSA). Celles-ci ont été adaptées pour permettre la concatémérisation.

Les séquences d'ADN biotinylés sont de différentes tailles (de 30 à +/-1500bp), et ont été purifiées au-delà de 150bp afin de ne permettre la fixation que des plus grandes séquences et d'éliminer les amorces (Figure R. 21).

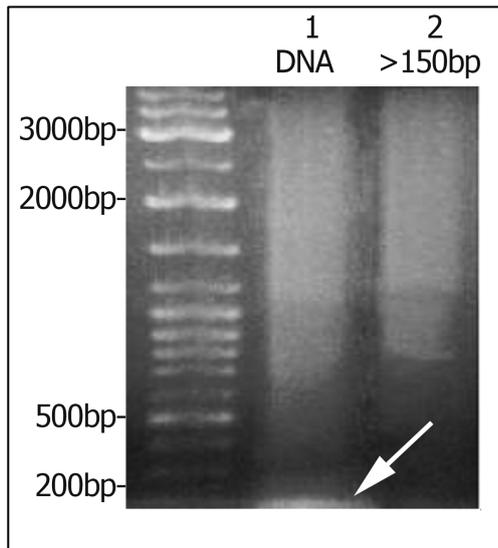


Figure R. 21 Gel d'agarose avec les concatémères. 1, avant filtration (DNA). **2.** et après filtration (>150bp) à travers un filtre Microcon YM100 (Millipore). La flèche montre les monomères (ou amorces) éliminés. L'échelle du marqueur de poids moléculaire est indiquée à gauche.

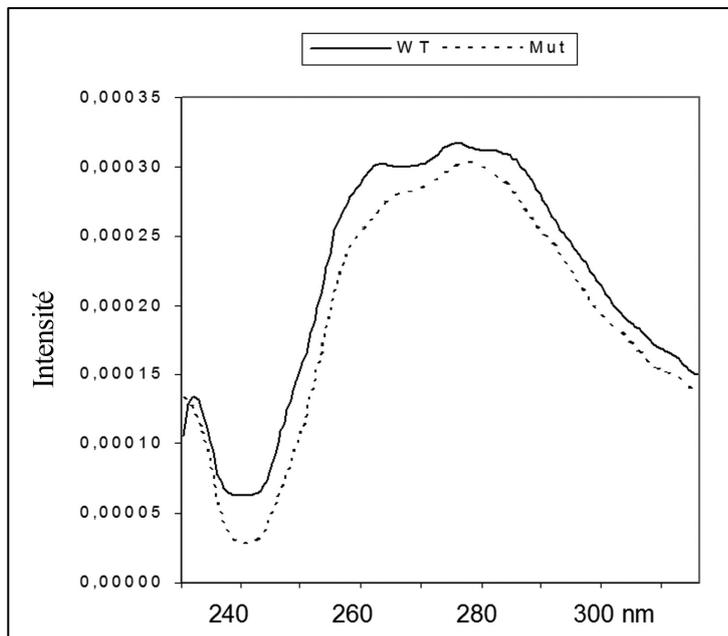


Figure R. 22 Dichroïsme circulaire sur les séquences d'ADN concatémérisées (= répétées plusieurs fois). Profils d'intensité des séquences d'ADN Sauvages (WT), et des séquences mutées (Mut), selon la longueur d'onde (nm).

Un **dichroïsme circulaire** a également été réalisé sur ces séquences d'ADN (Figure R. 22) afin de vérifier la structure secondaire de ces molécules. Cette expérience montre des courbes de profil correspondant à de l'ADN double brin normal, avec une sous-excitation à environ 240nm et une haute excitation au-delà des 260nm. Ceci écarte une structure anormale de l'ADN qui pourrait créer des interactions aspécifiques (Hou et al., 2001).

Après fixation de l'ADN sur les billes, les complexes formés ont été incubés avec des extraits nucléaires de cellules de la lignée BT-474. Celles-ci surexpriment AP-2 et ERBB2. Après lavage, les protéines sont éluées à l'aide du tampon dénaturant de Leammli. L'analyse par western blot de celles-ci montre que la capture des protéines AP-2 α a seulement fonctionné avec la séquence sauvage (WT) (Figure R. 23). Ensuite, ces mêmes éluas de protéines, mais en plus grande quantité (5 fois par rapport à celle utilisée pour le western blot, et décrite dans le Matériels et Méthodes), ont été déposés sur gel d'acrylamide de 15cm de résolution (hauteur du gel de séparation). Après coloration à l'argent des protéines dans le gel (Figure R. 24.A), nous avons constaté la présence d'une bande protéique présente seulement pour la technique utilisant l'ADN sauvage (Figure R.6.B), aux alentours de 50kDa.

Cette bande et la région homologue pour l'ADN muté, furent extraites et, après digestion en peptide, les protéines présentes ont ensuite été analysées et identifiées par Spectrométrie de masse. Les protéines identifiées furent le facteur de transcription **AP-2**, sous sa forme **α** et **γ** (Table R.3.A). Ces protéines possèdent des peptides communs, et certains d'entre eux ont été identifiés. Cependant, d'autres peptides spécifiques à la forme α ou γ , montrent que les deux formes ont bien été distinctement identifiées (Table R.3.B).

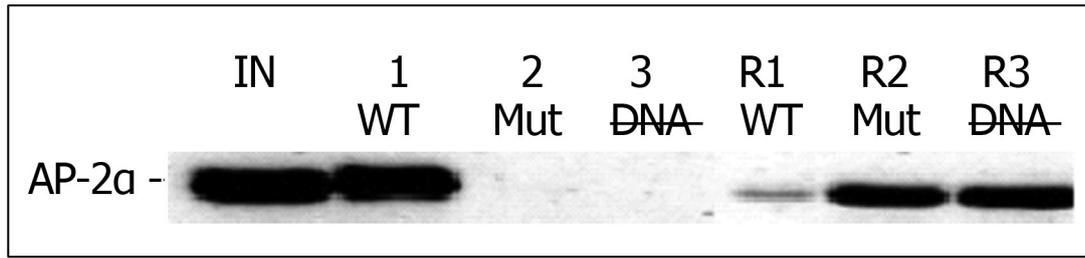


Figure R. 23 Western blot AP-2α des protéines éluées de la Chromatographie sur ADN. IN. Extrait nucléaire utilisé. 1. Protéines éluées de l'ADN sauvage (WT). Protéines éluées de l'ADN muté (Mut). 3. Protéines éluées des billes seules, sans ADN (DNA). R1-R3. Partie des protéines restantes après incubation (flow-through) du numéro correspondant.

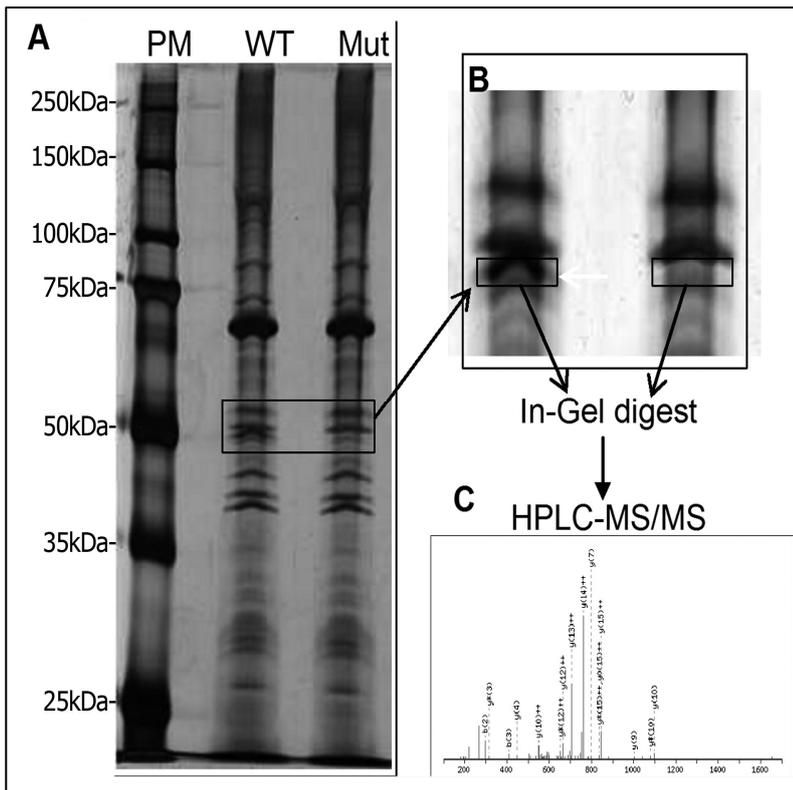


Figure R. 24 Gel de polyacrylamide 1D sur les éluas des protéines de la Chromatographie d'affinité sur ADN. **A**, gel entier avec le marqueur de poids moléculaire (PM), les protéines éluées de l'ADN sauvage (WT), et les protéines de l'ADN muté (Mut). **B**, agrandissement sur la bande spécifique de la condition sauvage. Les rectangles correspondent aux bandes qui ont été excisées. **C**, les protéines présentes ont été digérées (In-Gel digest), et les peptides analysés par HPLC suivi par spectrométrie de masse (MS/MS)

Tableau R. 3 . Identification par Spectrométrie de masse des protéines AP-2 isolées par chromatographie d'affinité sur ADN. A. Résumé de la recherche dans la base de donnée UniProt KB/Swiss-Prot. **B.** Peptides (en gras) identifiés pour les deux formes d'AP-2.

A				
Numéro d'accès ^a	Nom de la protéine	Masse ^b	Peptides trouvés ^c	Score total ^d
Q8IVB6	Transcription factor AP-2 gamma	56675	13	242
Q96SH1	Transcription factor AP-2 alpha	48691	10	187

a Numéros d'accès des protéines identifiées dans la base de donnée UniProtKB/Swiss-Prot.
b Masse moléculaire predate des protéines identifiées.
c Nombre de peptides identifiés provenant des sequences en acides aminés de protéines décrites.
d Score de probabilité totale donné par la recherche Mascot pour les protéines identifiées.
 La limite de score était >47.

B

Transcription factor AP-2 gamma

1 SGLDTRGGSI YARRAADACP VTRTARPARG GGGRRRLVTV TPILDPLGG
51 WGDPGFNWRL FWGTPDAMLW KITDNVKEYE DCEDRHDGSS NGNPRVPHLS
101 SAGQHLYSPA PPLSHTGVAE YQPPPYFPPP YQLAYSQSA DPYSHLGEAY
151 AAAINPLHQP APTGSQQQAW PGRQSQEGAG LPSHHGRPAG LLPHLGLEA
201 GAVSARRDAY RRSDDLPHAL HALDAAGLAE NLGLHDMPHQ MDEVQNVDDQ
251 HLLLDHDTVI RKGPISMTKN **PLNLPCQKEL** VGAVMNPTEV FCSVPGRLSL
301 **LSSTSKYKVT VAEVQRRLSP** PECLNASLLG GVLRRAKSKN GGRSLREKLD
351 **KIGLNLPAGR** RKAHVTLT SLVEGEAVHL ARDFAYVCEA EFPSKPVAEY
401 LTRPHLGGRN EMAARKNMLL **AAQQLCKEFT ELLSQDRTPH** GTSRLAPVLE
451 TNIQNCLSHF SLITHGFGSQ AICAAVSALQ NYIKEALIVI **DKSYMNP**GDQ
501 SPADSNKTLE KMEKHRK

Transcription factor AP-2 alpha

1 MLVHSFSAMD RHDGTSNGTA RLPQLGTVGQ SPYTSAPPLS HTPNADFQPP
51 YFPPPYQPIY PQSQDPYSHV NDPYSLNPLH AQPQPQHPGW PGQRQSQESG
101 LLHTHRGLPH QLSGLDPRRD YRRHEDLLHG PHALSSGLGD LSIHSLPHAI
151 EEVPHVEDPG INIPDQTVIK KGPVLSKSN SNAVSAIPIN KDNLFGGVN
201 PNEVFCSVPG **RLSLLSSTSK YKVTVAEVQR** RLSPPPECLNA SLLGGVLRRA
251 KSKNGGRSLR EKLD**KIGLNL PAGRR**KAAV TLLTSLVEGE AVHLARDFGY
301 VCETEPPAKA VAEFLNRQHS DPNEQVTRKN MLLATKQICK **EFTDLLAQDR**
351 SPLGNSRPNP ILEPGIQSCL THFNLISHGF GSPAVCAAVT ALQNYLTEAL
401 KAMDKMYLSN **NNSHTDNN**A KSSDKEEKHR K

Ce résultat vient alors confirmer nos travaux antérieurs ainsi que ceux de l'équipe de Mme Hurst (Bosher et al., 1996). Néanmoins, il est montré ici de manière directe, et non à l'aide de vecteurs d'expression et rapporteurs, que les deux formes AP-2a et AP-2y formeraient des hétérodimères en se fixant au promoteur d'ERBB2.

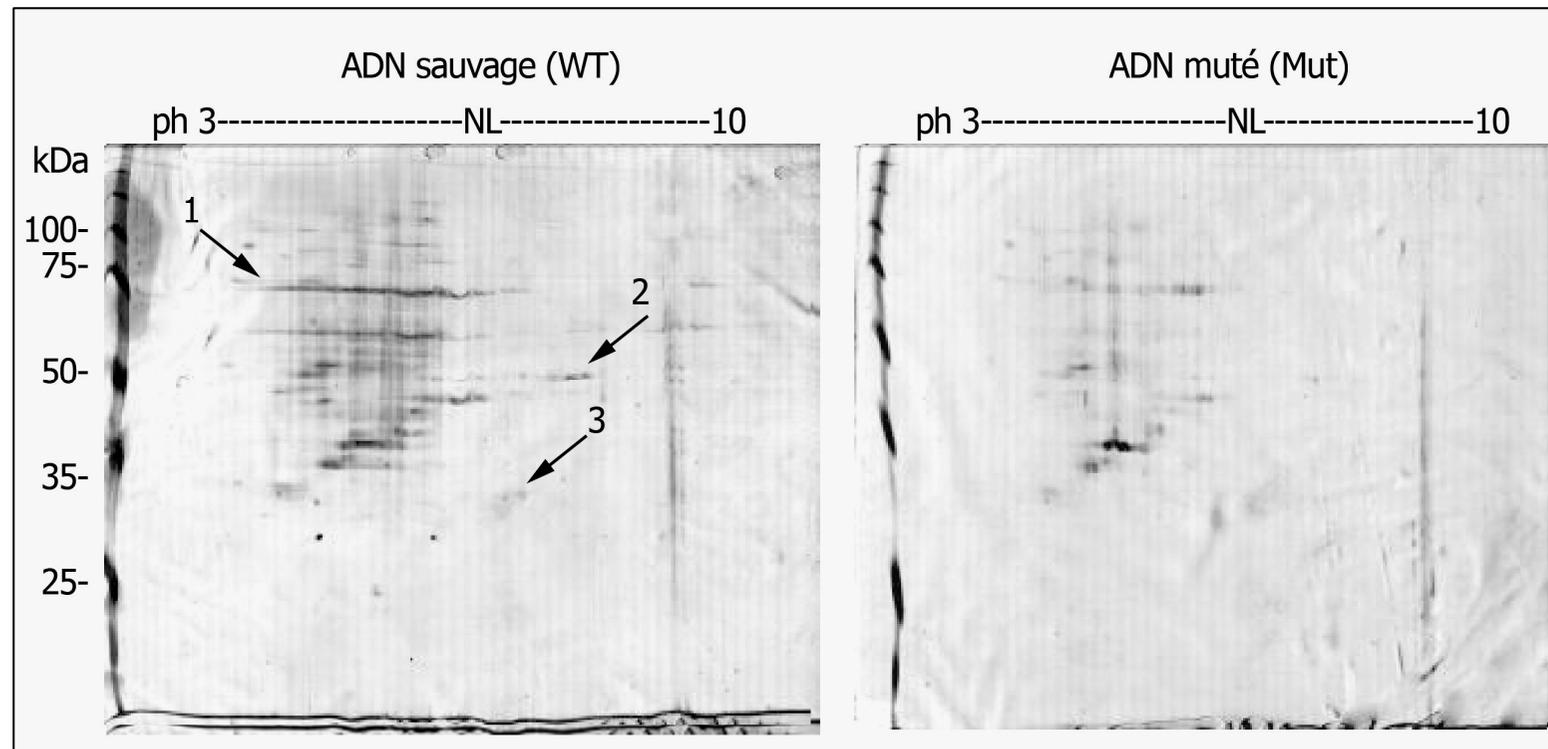


Figure R. 25. Gels de polyacrylamide en deux dimension (2D-GE) des protéines éluées de la chromatographie sur ADN, utilisant l'ADN sauvage WT (à gauche) et l'ADN muté (à droite). La première dimension a séparé les protéines selon leur point isoélectrique, du pH 3 à 10 de manière non-linéaire (NL). La seconde a séparé les protéines selon leur masse moléculaire apparente (marqueur de poids moléculaire à gauche du gel). Les numéros correspondent à des protéines identifiées par spectrométrie de masse et décrites au **Tableau R.4** .

Cependant, aucune autre différence n'a été observée entre la condition avec l'ADN sauvage et l'ADN muté. Un grand nombre de protéines (sous forme de bandes) étaient retrouvées dans les deux conditions, et étaient donc aspécifiques pour notre recherche. En utilisant des billes sans ADN, et après différents essais, on a remarqué que la majeure partie de ces « **contaminants** » résultait de la présence d'albumine (BSA), nécessaire à stabiliser les billes (résultats non-montrés). Afin de diminuer ce bruit de fond, il a fallu remplacer cette BSA à l'aide de poly-éthylène glycol 600 (PEG600), afin de maintenir les billes stabilisées sans utiliser de détergent. De plus, pour permettre l'utilisation de gels en deux dimensions (**2D-GE**), les protéines furent éluées à l'aide d'urée, et ce en milieu alcalin (pH 10,5). L'alcalinité du tampon d'éluion permet d'inverser la charge globale des protéines fixées à l'ADN et de les décrocher de celui-ci. L'urée sert à rompre les ponts disulfures et à permettre la dissociation des complexes protéiques.

Après ces mises au point, les protéines éluées par CAA ont été séparées par électrophorèses sur gel en deux dimensions. La coloration des protéines au nitrate d'argent a mis en évidence des différences entre les protéines éluées de l'ADN sauvage et celles de l'ADN muté (Figure R. 25). Les protéines (spots) présentes uniquement pour la condition utilisant l'ADN sauvage ont été ensuite identifiées par spectrométrie de masse. Certaines protéines identifiées ne correspondaient pas à leur masse moléculaire, ni à leur point isoélectrique sur le gel et n'ont pas été prises en compte. D'autres encore étaient des protéines contaminantes (kératine), ou encore de structure (actine). Néanmoins, trois protéines avec un score d'identification satisfaisant ont été retenues (Tableau R. 4). La première, **Ku80**, est une kinase ATP-dépendante, dont le rôle le plus connu est celui de la réparation de l'ADN, mais aussi connue comme cofacteur de plusieurs facteurs de transcription (voir Introduction § I.5). La deuxième, **PRP19**, joue également un rôle dans la réparation de l'ADN (Mahajan and Mitchell, 2003), et dans l'épissage de l'ARN (Tarn et al., 1994). Enfin, la troisième, **LASP-1**, est surexprimée dans les cancers du sein surexprimant ERBB2, mais est une protéine plus connue pour jouer un rôle dans le cytosquelette, même si elle peut être présente dans le noyau (Grunewald et al., 2007).

Ensuite, nous avons voulu vérifier que la protéine Ku80, et également son partenaire Ku70, interagissaient bien avec la séquence d'ADN WT, à l'aide de western blot sur les éluas de la CAA. Cependant, nous avons retrouvé ces protéines non seulement sur cette séquence, mais également sur l'ADN Mut, ainsi que sur d'autres séquences. De plus hauts taux en

protéines étaient parfois observé sur l'ADN WT par rapport à la séquence Mut, mais ces résultats ont manqué de reproductibilité (Résultats non-montrés).

Tableau R.4. Protéines identifiées par la technique de Chromatographie d'affinité sur ADN. Les numéros (#) correspondent à ceux décrits Figure R.7.

#	Numéro d'accès ^a	Nom de la protéine	Masse ^b	Peptides trouvés ^c	Score total ^d
1	P13010	Ku80_HUMAN	83091	1	46
2	NP_055317	PRP19_HUMAN	55050	3	108
3	S68234	LASP1 protein	36789	1	51

^a Numéros d'accès des protéines identifiées dans la base de données UniProtKB/Swiss-Prot.

^b Masse moléculaire prédite des protéines identifiées.

^c Nombre de peptides identifiés provenant des séquences en acides aminés de protéines décrites.

^d Score de probabilité totale donné par la recherche Mascot pour les protéines identifiées. La limite de score était >37.

En conclusion à cette partie, l'élaboration d'une technique comme la chromatographie d'affinité sur ADN permet de se rapprocher d'une sélection spécifique des protéines interagissant avec une séquence d'ADN. Dans notre cas, elle a permis d'identifier les protéines AP-2 α et AP-2 γ comme interagissant avec une séquence du promoteur d'*ERBB2*. L'identification d'autres protéines permet de les mettre sur une liste de candidats potentiels interagissant avec ces protéines AP-2. La protéine Ku80 avait également été identifiée à l'aide de la technique de GST-pull-down. Cependant, après avoir voulu vérifier l'identification de la protéine Ku80 par western blot après une CAA, cette méthode s'est montrée peu reproductible.

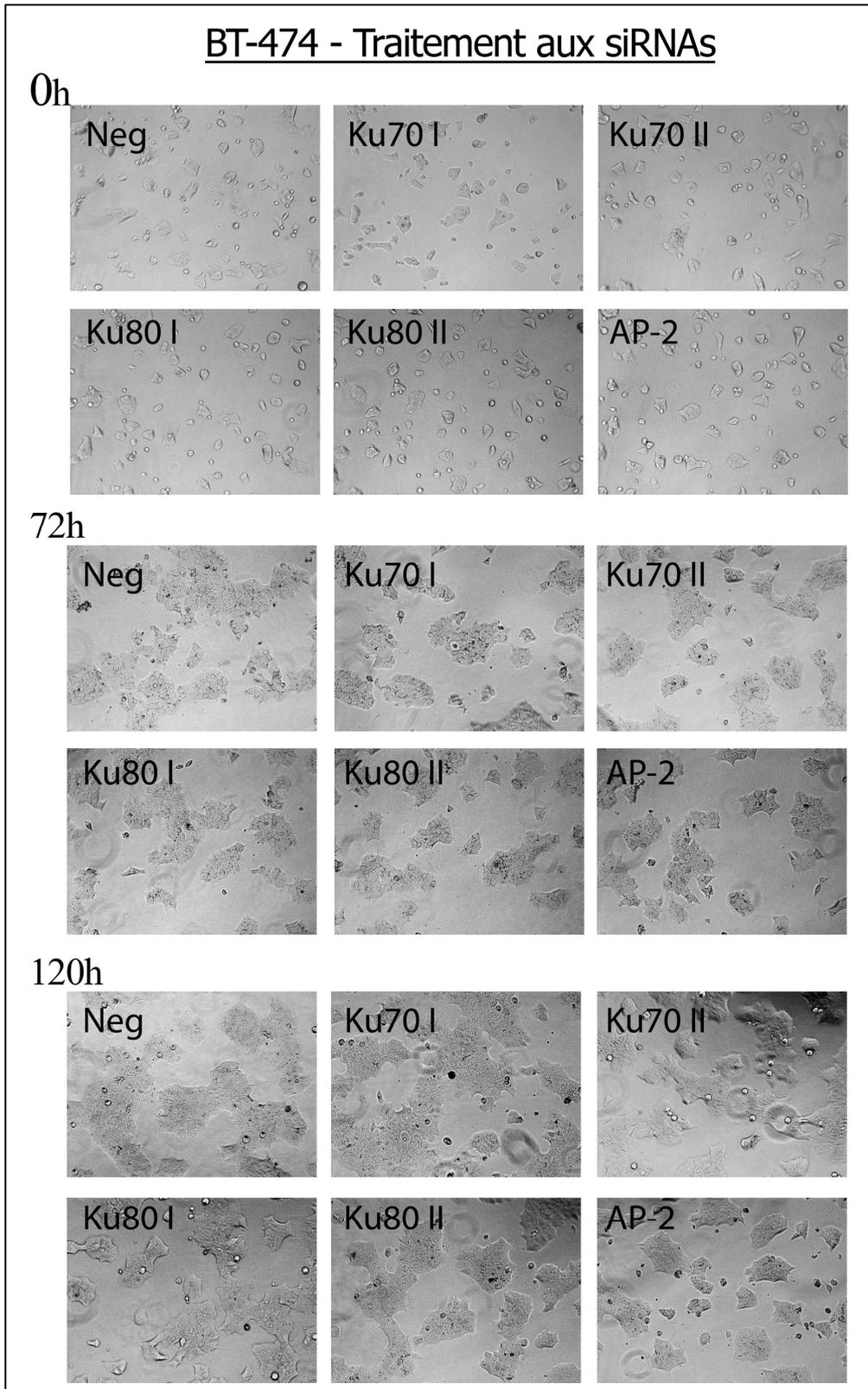


Figure R. 26. Images de cellules de la lignée BT-474 traitées aux siRNAs après différents laps de temps. Les cellules ont été traitées au temps 0h avec différents siRNAs : Négatif (Neg), Ku70 forme 1 (Ku70 I), Ku70 forme 2 (Ku70 II), Ku80 forme 1 (Ku80 I), Ku80 forme 2 (Ku80 II), et AP-2 α + AP-2 γ (AP-2). Les photos ont été prises à l'heure 0 (oh), puis à 72h, et 120h. Les images les plus représentatives sont illustrées ici.

R.4. **R-Annexe II.** Rôle des protéines AP-2 et Ku dans la croissance cellulaire.

Durant les expériences utilisant les siRNAs, une constatation a été faite concernant le comportement des BT-474. En effet, après plusieurs jours de traitement, les cellules traitées avec les siRNAs dirigés contre AP-2 (α et γ) ou Ku (70 et 80) semblaient être moins nombreuses que les cellules traitées avec le siRNA contrôle négatif (Neg). Pour mieux se rendre compte de cet effet, les cellules BT-474 ont été photographiées à plusieurs intervalles de temps (Figure R.26). Après 72h, une différence est observée pour les cellules traitées avec les siRNAs AP-2. Cependant, après 120h, une différence de la densité cellulaire est également visible pour les cellules traitées aux siRNA Ku70 et Ku80. Ces différences de densité cellulaire ont également été observées dans les SKBR3, mais moins fortes (Figure R.27). Cette différence de comportement peut être expliquée en partie par le temps de doublement plus court pour les SKBR3.

Cette constatation n'est pas surprenante quand on sait que les protéines AP-2 et Ku jouent un rôle dans la prolifération cellulaire (voir Introduction). De plus, les dosages des protéines et de l'ARNm récoltés lors des tests précédents (voir § R.2.2) montrent également une légère diminution pour les conditions en siRNAs Ku et AP-2 par rapport à la condition siRNA Neg (résultats non-montrés).

Figure R. 27 voir p57

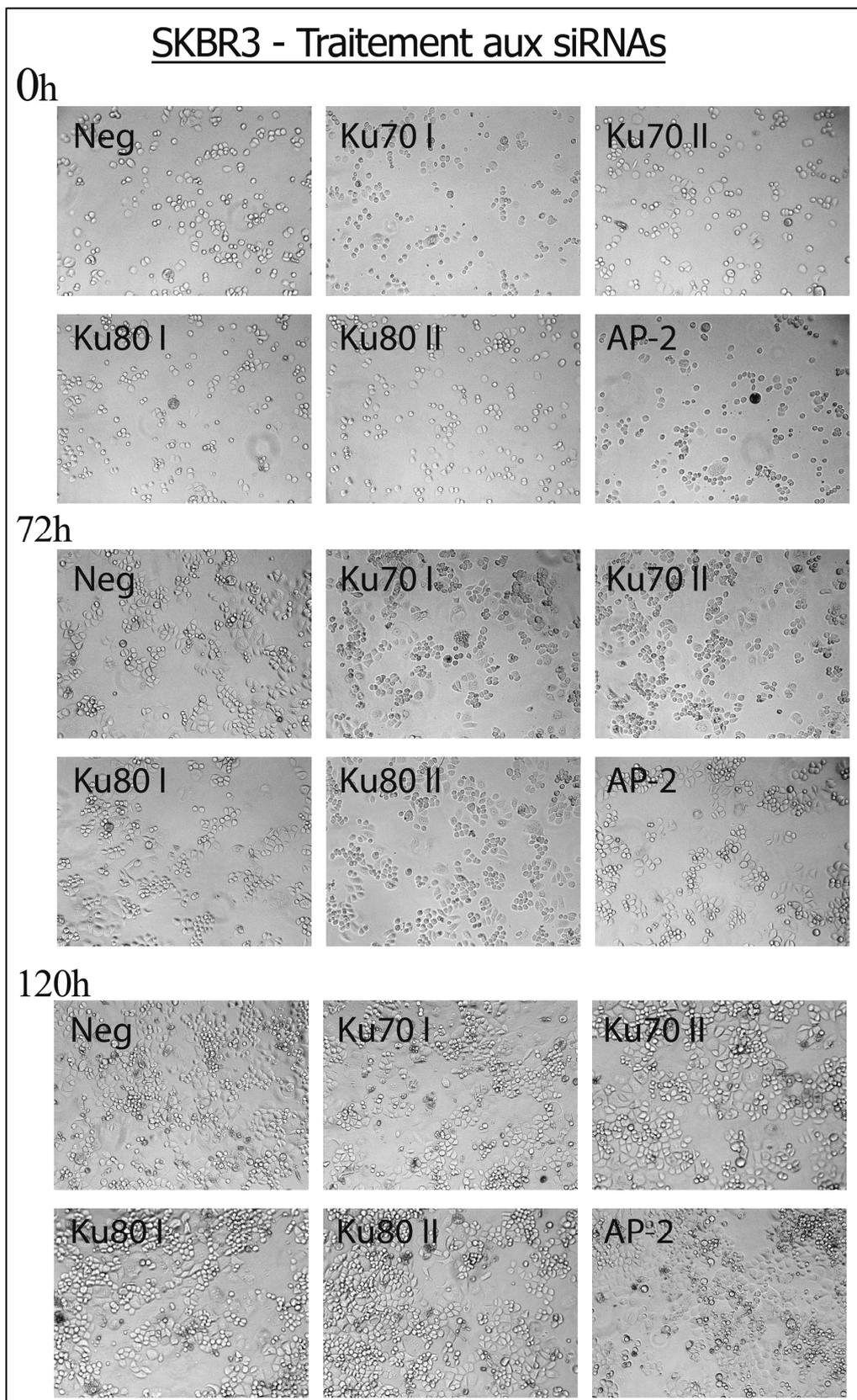
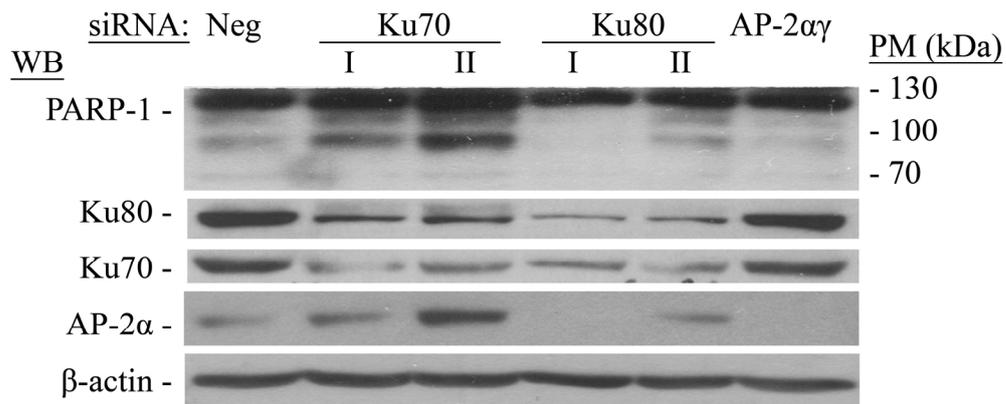


Figure R. 27. Images de cellules de la lignée SKBR3 traitées aux siRNAs après différents laps de temps. Les cellules ont été traitées au temps 0h avec différents siRNAs : Négatif (Neg), Ku70 forme 1 (Ku70 I), Ku70 forme 2 (Ku70 II), Ku80 forme 1 (Ku80 I), Ku80 forme 2 (Ku80 II), et AP-2α + AP-2γ (AP-2). Les photos ont été prises à 72h, et 120h. Les images les plus représentatives sont illustrées ici.

A. BT-474



B. SKBR3

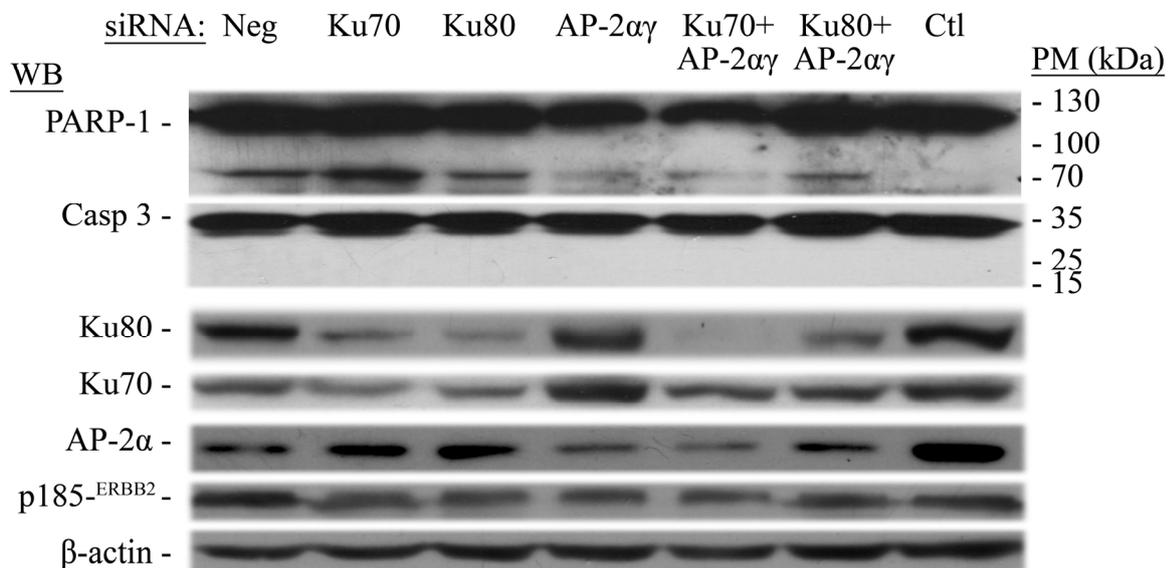


Figure R. 28. Clivage de protéines cibles de l'apoptose dans des cellules transfectées avec différents siRNAs, après 96h. A. dans les BT-474. Les différents siRNAs sont indiqués au dessus. Le Western Blot (WB) montre l'expression des différentes protéines étudiées, à l'aide d'anticorps spécifiques. La PARP-1 peut être clivée et créer un isoforme à 85kDa pendant l'apoptose. Les marques de poids moléculaire (PM) sont indiquées à droite. **B.** dans les SKBR3. Pareil au point A, mais les siRNAs ont également été combinés. La condition contrôle (Ctl) correspond à des transfections sans siRNA. La Caspase 3 peut être clivée et un isoforme à 17kDa peut normalement être détecté par Western Blot pendant l'apoptose.

La différence du nombre de cellules pourrait être le résultat d'une augmentation de l'apoptose, d'un ralentissement du cycle cellulaire, ou encore d'autres mécanismes. Des western-blots ont donc été réalisés sur des extraits protéiques de cellules traitées avec les différents siRNAs utilisés précédemment (Figure R.28). L'anticorps utilisé pour la Caspase-3 reconnaît la forme quiescente à 32kDa, et une des deux formes clivées à 17kDa. Celui pour la PARP-1 reconnaît la forme native à 116kDa, et une forme tronquée à 85kDa. Préalablement, les cellules (ici, des BT-474) ont été traitées avec des siRNAs Ku70, Ku80 ou AP-2 α + AP-2 γ (AP-2 $\alpha\gamma$) (Figure R.26.A). Sur ces images de western-blot, on peut constater que la protéine PARP-1 est peu clivée, avec un clivage légèrement plus prononcé pour les siRNAs Ku70. Cependant, les taux de la protéine AP-2 α semblent avoir augmenté pour la condition Ku70-I, et même diminué pour le siRNA Ku80 II dans cet essai.

Cette expérience a été répétée avec les SKBR3, mais cette fois en combinant les siRNAs Ku avec les siRNAs AP-2, et en analysant le clivage de la PARP-1 et de la Caspase-3 (Figure R.26.B). Ni le clivage de la PARP-1, ni celui de la Caspase-3 augmente avec les siRNAs seuls ou avec les siRNAs combinés.

Une façon plus sensible et qui permet d'étudier l'apoptose à un stade précoce est de marquer les cellules à l'aide d'un anticorps fluorescent dirigé contre l'**Annexine** et de trier ces cellules par FACS. Lors de l'apoptose, les phosphatidylsérines de la membrane cytoplasmique vont se transloquer. Ces phospholipides qui font partie en majorité de la partie interne de la membrane se retrouvent ainsi exposés à l'extérieur de la cellule. L'annexine a une haute affinité pour ces phospholipides, et va être transloquée avec ceux-ci. A l'aide d'un marquage de l'annexine par un anticorps, on peut ainsi estimer le pourcentage de cellules en apoptose après un tri cellulaire (FACS). Les cellules sont également marquées avec de l'iodure de propidium (Pi), afin de discriminer les cellules qui meurent de nécrose ou étant dans un stade apoptotique trop avancé.

Cette technique requiert une très bonne dissociation cellulaire, et peu d'agrégats cellulaires. Cependant, les cellules SKBR3 et BT-474 ne restent pas isolées très longtemps quand elles ont été séparées après trypsinisation. Elles forment donc rapidement des amas qui ne sont pas compatibles avec le tri au FACS. Les procédés mécaniques pour séparer ces cellules se sont également avérés inefficaces. Pour contourner le problème, nous avons utilisé la lignée cellulaire **ZR-75.1**. Celle-ci surexprime également AP-2 α et AP-2 γ , et de moindre manière ERBB2 (pas d'amplification, mais transcription accrue) (Bosher et al., 1995; Orso et al., 2004; Vernimmen et al., 2003b).

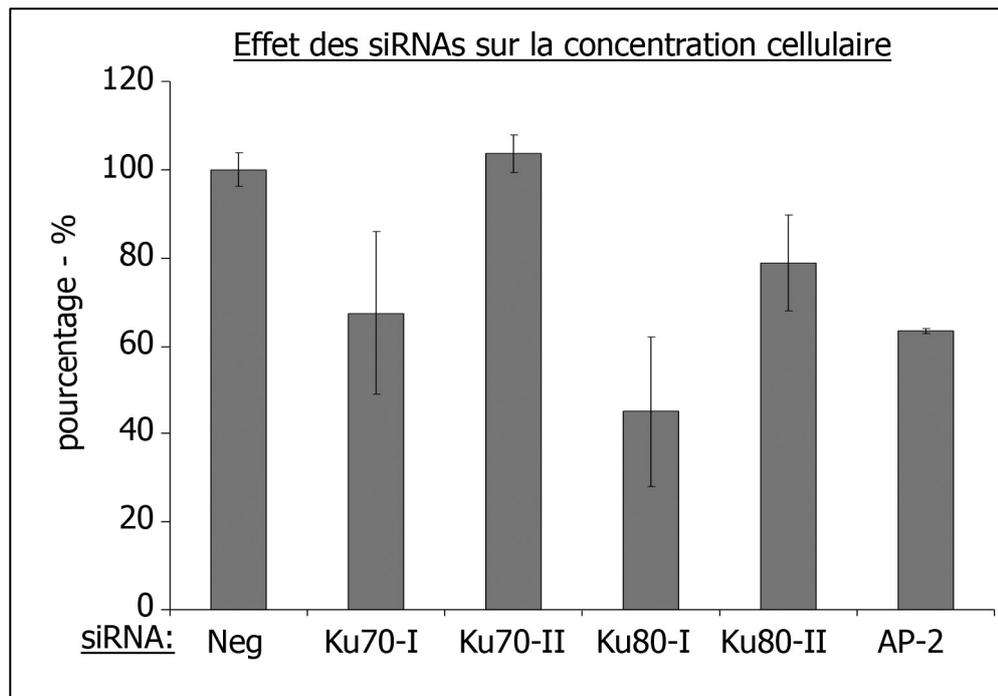


Figure R. 29. Comptage des cellules ZR75.1 traitées aux siRNA pendant 90h. Les nombres de cellules pour chaque condition en siRNA (en dessous) ont été rapportés en pourcent par rapport à la condition en siRNA négatif (Neg).

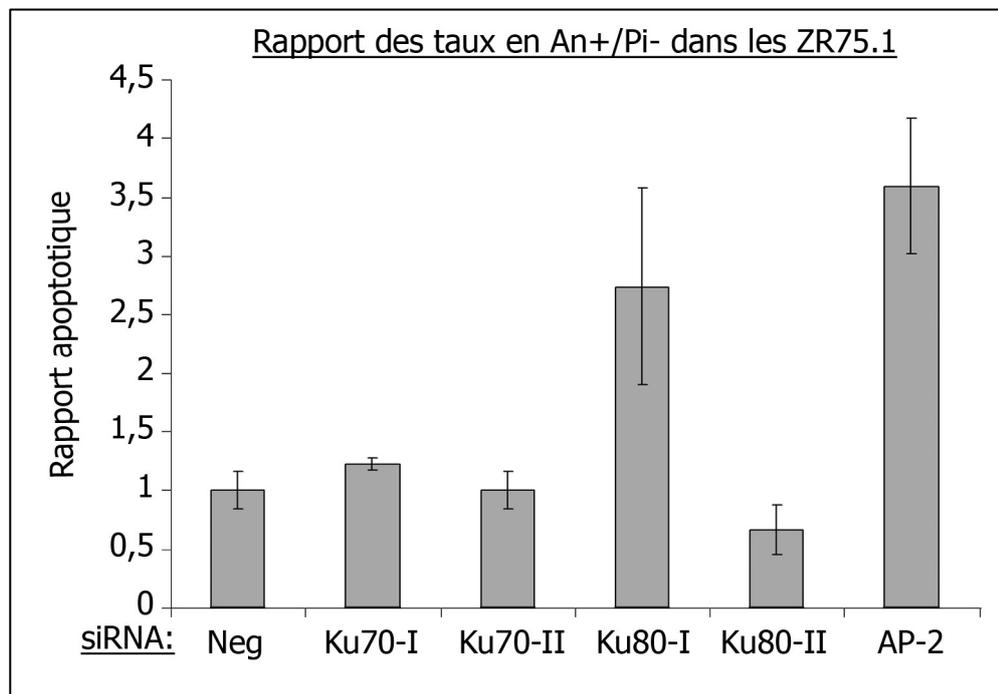


Figure R. 30. Evaluation de l'apoptose par FACS dans les cellules ZR75.1 traitées avec différents siRNAs pendant 90h. Les pourcentages en cellules marquées comme positive à l'Annexin, et négative au Pi (An+/Pi-) pour chaque conditions en siRNA (en dessous), ont été rapportés à la condition en siRNA négatif (Neg).

Après avoir transfecté ces cellules avec des siRNAs dirigés contre AP-2 ou Ku, les cellules ont d'abord été comptées à 90h (Figure R.29). On peut constater que les siRNAs dirigés contre Ku ou AP-2 (α et γ) ont un effet sur le nombre de cellules, excepté pour le siRNA Ku70-II. Ces résultats vont donc dans la même direction que ceux obtenus avec les cellules BT-474 et SKBR3.

Afin de se rendre compte si cette différence de population cellulaire entre les différentes conditions en siRNAs est le résultat d'une augmentation de l'apoptose, nous avons donc utilisé la technique du double marquage à l'Annexin/Pi décrite plus haut, suivi par le tri au FACS. La figure R.30 montre que l'apoptose est augmentée dans les cellules traitées aux siRNAs AP-2 $\alpha\gamma$, avec près de 4 fois plus d'apoptose, et également pour le siRNA Ku80-II avec 3 fois plus d'apoptose, par rapport à la condition avec le siRNA Négatif. Cependant les autres siRNAs n'ont aucun effet sur l'apoptose.

Un western blot a également été réalisé sur ces cellules traitées aux siRNAs (Figure R.31). On constate que l'anticorps anti-AP-2 α reconnaît une forme à +/- 55kDa, ainsi qu'une autre forme d'une masse moléculaire plus faible (+/- 50kDa). C'est certainement cette deuxième forme qui correspond à AP-2 α , vu sa masse moléculaire et sa disparition avec le traitement aux siRNA AP-2 $\alpha\gamma$. Cependant, le siRNA Ku80-I diminue également l'expression d'AP-2 α . Cet effet n'a pas été approfondi et reste inexplicé, mais pourrait expliquer l'augmentation de l'apoptose pour cette condition. En effet, l'augmentation de l'apoptose par le siRNA Ku80-I (Figure R.30) pourrait être dû à un effet aspécifique de cet siRNA sur la diminution d'AP-2 α .

En conclusion, le traitement aux siRNAs dirigés contre les protéines Ku70 et Ku80 ont maintes fois montré un effet sur la croissance des lignées cellulaires BT-474, SKBR3 et ZR-75.1. Ni l'expression de protéines tronquées, ni les tests de marquage à l'Annexin/Pi n'ont pu clairement montrer une augmentation de l'apoptose en diminuant ces protéines Ku dans ces lignées cellulaires. En conséquence, Ku n'influencerait pas la croissance cellulaire en augmentant l'apoptose cellulaire, mais sans doute en jouant sur un autre mécanisme. Les protéines Ku sont impliquées dans le cycle cellulaire (cf Introduction § I.5.3), et la diminution de ces protéines ralentirait la progression de la cellule dans son cycle cellulaire. Cette hypothèse est renforcée quand on sait que les cellules Hct116 dépourvues d'un allèle Ku80 (cellules 70/32 utilisées au § R.2.3), ont un temps de doublement plus long que les cellules Hct116 normales, mais n'entreraient pas en apoptose (Li et al., 2002). Cependant, ces mêmes cellules dépourvues alors des deux allèles Ku80 (Ku80 -/-) ont montré une réduction

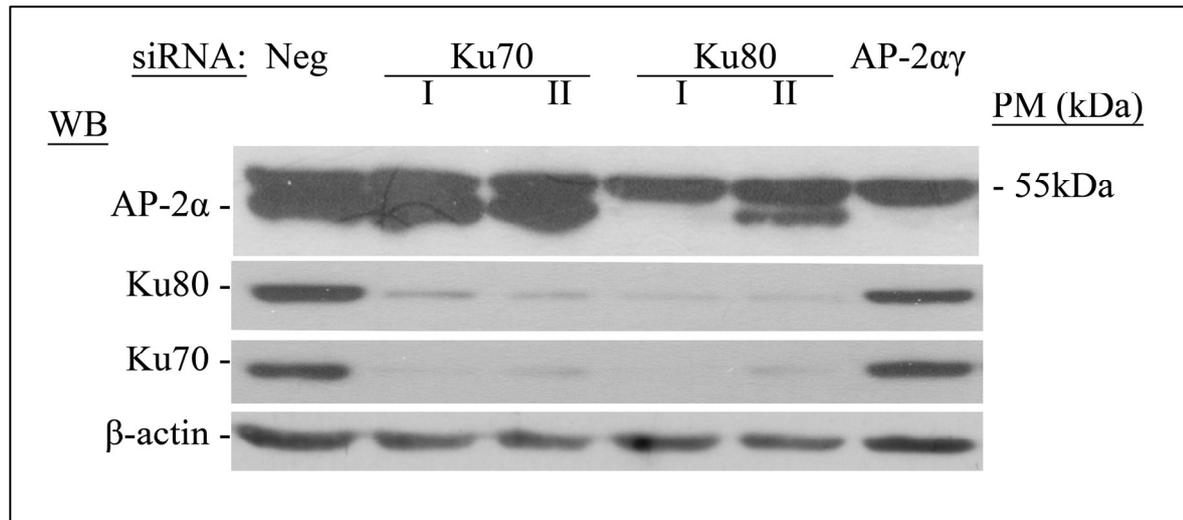


Figure R. 31. Western blot après traitement aux siRNAs pendant 90h, dans les ZR-75.1. Les différents siRNAs sont représentés en haut, avec 2 séquences différentes (I et II) pour les siRNA Ku70 et Ku80. L'anticorps AP-2 α révèle 2 bandes, une à 55kDa, et une en dessous (+/- 50kDa) correspondant à la taille d'AP-2 α . Les différents anticorps utilisés sont indiqués à gauche. La β -actin sert de contrôle à la charge protéique.

drastique du temps de doublement, et entrent en apoptose après quelques divisions cellulaires.

La transfection transitoire en siRNAs utilisée ne diminue pas complètement le taux des protéines Ku dans la cellule, et son effet n'est pas long dans le temps (environ 48h pour chaque transfection). De plus, la demi-vie de ces protéines demande d'attendre 72h (et deux transfusions de siRNAs) pour enfin voir une réduction de ces protéines Ku. Ces paramètres peuvent donc expliquer que la réduction des protéines Ku par siRNA réduirait la prolifération cellulaire mais ne serait pas suffisante et/ou suffisamment longue pour induire l'apoptose.

En parallèle, la réduction prolongée des protéines AP-2 α et AP-2 γ semble avoir un effet sur la croissance cellulaire encore plus marqué qu'avec les siRNAs Ku. Cependant leur demi-vie est plus courte par rapport à celle des protéines Ku. En effet, une réduction des protéines AP-2 α et AP-2 γ peut être obtenue après 24h de transfection. L'implication des protéines AP-2 α et AP-2 γ dans la prolifération cellulaire est souvent discuté dans la littérature et dépendrait du type cellulaire choisi (voir § I.3.6). Les westerns-blots sur le clivage des protéines PARP-1 et de la Caspase-3 n'ont montré aucun signe d'apoptose. Cependant, la technique de marquage à l'Annexin/Pi montre une augmentation de l'apoptose quand on traite les cellules ZR-75.1 avec les siRNAs AP-2 α et AP-2 γ combinés. Cependant, il faut bien garder à l'esprit que ces résultats sont préliminaires et devront être approfondis.

Discussion générale et perspectives

Notre laboratoire s'intéresse aux mécanismes responsables de la surexpression du gène *ERBB2*, dans les cancers du sein. En effet, les tumeurs présentant cette altération sont plus agressives et ont un pouvoir métastatique accru. La surexpression d'*ERBB2* procure à ces tumeurs une résistance à certains agents chimiothérapeutiques et à l'hormonothérapie. Des médicaments ciblant spécifiquement la protéine *ERBB2* permettent depuis peu d'améliorer le traitement des patientes atteintes de cancers du sein surexprimant *ERBB2*. Cependant, l'étude de cette dérégulation est importante afin de comprendre les mécanismes responsables de cette surexpression.

Des facteurs de transcription de la famille AP-2 contribuent à la surexpression d'*ERBB2* dans les cancers du sein. Les protéines AP-2 n'agissent pas seules. Elles interagissent avec des protéines, appelées cofacteurs, qui contribuent et modulent son activité transcriptionnelle.

Parmi ces cofacteurs, notre laboratoire avait identifié la **protéine YY1**. Dans ce travail, nous avons essayé de mieux caractériser la relation entre la surexpression d'*ERBB2* et celle d'AP-2 α dans des tumeurs du sein, et d'analyser l'implication des protéines YY1 comme cofacteur d'AP-2 α .

Comme mentionné dans l'introduction (voir §I.2.3), plusieurs études ont tenté de mettre en relation l'expression des protéines AP-2 α et AP-2 γ avec celle d'*ERBB2* par immunohistochimie, et les résultats obtenus sont controversés (Friedrichs et al., 2005; Gee et al., 2009; Pellikainen et al., 2004; Turner et al., 1998). En effet, là où 3 études montrent une corrélation directe entre l'expression d'AP-2 α et/ou d'AP-2 γ avec l'expression d'*ERBB2* (Friedrichs et al., 2005; Pellikainen et al., 2004; Turner et al., 1998), une quatrième ne montre aucune corrélation (Gee et al., 1999a). On notera que ces études utilisent des anticorps différents, qui ne discriminent pas toujours les différentes formes d'AP-2. Dans cette étude, nous montrons une corrélation positive entre l'expression des protéines AP-2 α et *ERBB2*. Ces résultats, combinés avec ceux obtenus à l'aide des siRNAs indiquent que les protéines AP-2 α et AP-2 γ sont requis pour la surexpression d'*ERBB2*.

Egalement dans cette étude, nous avons associé l'expression d'*ERBB2* avec les hauts niveaux d'expression de la protéine AP-2 α et de son partenaire YY1, dans des tumeurs du sein (*in vivo*) ainsi que dans des lignées cellulaires de cancers du sein (*in vitro*). Nos

précédents travaux avaient montré l'implication de la protéine YY1 sur l'activité transcriptionnelle d'AP-2 α , ainsi que le recrutement de ces protéines sur le promoteur d'ERBB2. L'absence de corrélation directe entre l'expression d'YY1 et celle d'ERBB2 pourrait être expliquée par le fait qu'YY1 a besoin de la protéine AP-2 pour interagir avec le promoteur d'ERBB2. Néanmoins, cette étude est la première à mettre en évidence une expression combinée de la protéine AP-2 α et de son cofacteur YY1 avec la surexpression d'ERBB2 dans des tumeurs du sein. De plus, les résultats obtenus à l'aide des siRNAs corroborent l'idée que les protéines YY1 coopèrent avec les protéines AP-2 α et AP-2 γ dans la surexpression d'ERBB2.

Dans l'étude des mécanismes par lesquels les protéines AP-2 induisent une transcription accrue du gène *ERBB2*, nous avons voulu identifier des protéines interagissant avec ce facteur de transcription. Pour cela, deux techniques ont été utilisées : la chromatographie d'affinité sur ADN, ou DNA-pull-down, et le GST-pull-down.

La technique de **chromatographie d'affinité sur ADN** permet la purification directe de protéines interagissant avec une séquence déterminée d'ADN. En utilisant comme « appât » une séquence de haute affinité pour les protéines AP-2, en -500 pb du site principal d'initiation de la transcription du gène *ERBB2*. Nous avons identifié par spectromètre de masse la liaison à la séquence étudiée des isoformes alpha et gamma des protéines AP-2 ainsi que les protéines Ku80, PRP19 et LASP-1. Cependant cette technique s'est révélée peu reproductible malgré les nombreuses tentatives de mises au point.

La technique de **GST-pull-down** permet l'identification des protéines interagissant avec une protéine chimérique constituée d'une protéine d'intérêt et de la protéine GST. A l'aide de son affinité pour le GSH, la GST permet de co-purifier la protéine d'intérêt (ici AP-2 α). Nous avons donc recherché les protéines interagissant avec AP-2 α via cette technique, couplée à la spectrométrie de masse. Plusieurs protéines, parmi lesquelles les protéines Ku70 et Ku80, ont ainsi été identifiées.

Lors de l'utilisation de la chromatographie d'affinité sur ADN, nous avons observé une interaction des protéines Ku avec différents brins d'ADN (résultats non-montrés). Même si cette interaction semblait plus intense avec les séquences d'ADN ayant fixé AP-2, d'autres brins d'ADN « contrôles » fixaient ces protéines. Cette interaction aspécifique avec ces brins

d'ADN est certainement corrélée à la faculté des protéines Ku à interagir avec les extrémités libres de l'ADN, à l'instar des cassures d'ADN (Blier et al., 1993). Une autre équipe a identifié l'interaction des protéines Ku avec le facteur de transcription YY1 à l'aide de la chromatographie sur ADN (Sucharov et al., 2004). Mais pour vérifier la spécificité de cette technique et de cette identification, ils ont utilisé une séquence d'**ADN circulaire**. En perspective à nos travaux, nous pourrions également circulariser nos brins d'ADN afin de vérifier la spécificité de l'interaction des protéines Ku sur nos séquences d'ADN.

Après l'identification des protéines Ku, l'interaction AP-2/Ku a été vérifiée par western-blot et par co-immunoprécipitation. Nous ne savons pas si l'interaction AP-2 / Ku est directe ou indirecte. Nous n'avons pas non plus identifié les domaines par lesquels cette interaction pourrait intervenir. Ces aspects feront l'objet de travaux ultérieurs.

Les protéines Ku sont impliquées dans la réparation des cassures NHEJ de l'ADN. Cependant, des travaux récents ont montré l'implication de ces protéines dans la transcription, notamment en interagissant avec des facteurs de transcription et en modulant leur activité (voir Introduction § I.5.6).

Le rôle des protéines Ku dans la transcription semble différent selon le facteur de transcription, la région promotrice, le gène ciblé ou encore le type cellulaire dans lequel elles se trouvent. Pour exemple, la liaison des protéines Ku70 et Ku80 à côté d'une région E-box du promoteur de la glycophorine B va réprimer l'expression de ce gène dans des cellules non-érythroïdes (Camara-Clayette et al., 1999; Sucharov et al., 2004). Au contraire, la liaison des protéines Ku sur le promoteur de l'apolipoprotéine C-IV augmente l'expression de ce gène, menée par le virus de l'hépatite C (HCV) dans des cellules du foie (Kim et al., 2008). D'autres gènes ont également été trouvés comme modulés par les protéines Ku, comme celui de la lipo-oxygénase-1 en réponse à des interleukines dans des cellules épithéliales du poumon (Kelavkar et al., 2000), ou celui de c-jun par Ku80, et sans doute aussi Ku70 (Jiang et al., 2008). Les protéines Ku peuvent également réguler la transcription de gènes via l'interaction avec des facteurs ou des cofacteurs de transcription. Ainsi, l'hétérodimère Ku 70/Ku80 empêche l'interaction à l'ADN de la protéine ESE1, un facteur de transcription de la famille Ets, dans des cellules épithéliales (Wang et al., 2004). Les protéines Ku pourraient également jouer un rôle dans l'élongation (Mo and Dynan, 2002) et la réinitialisation de la transcription (Woodard et al., 2001).

Les protéines Ku peuvent également interagir avec les protéines PARP-1 et YY1 pour réguler la transcription de gènes cibles. De plus, ces protéines sont également connues comme étant des cofacteurs du facteur de transcription AP-2. L'interaction des protéines Ku avec la PARP-1 a des effets opposés sur la transcription. Ainsi, les protéines Ku inhibent l'activité transcriptionnelle du complexe β -catenin-TCF4 en interférant avec PARP-1, dans différentes lignées cancéreuses (Idogawa et al., 2007). Au contraire, le complexe protéique Ku/PARP- stimule l'expression du gène S10019, important dans des processus inflammatoires dans des kératinocytes (Grote et al., 2006). L'interaction de Ku avec YY1, quant à lui, a un effet d'inhibition sur l'expression du gène de la chaîne lourde de l' α -myosin, dans le cœur (Sucharov et al., 2004).

C'est au vu des différents rôles que Ku peut avoir dans la transcription génique et de ses interactions avec des cofacteurs d'AP-2 que nous avons voulu étudier l'effet des protéines **Ku** sur l'activité transcriptionnelle d'**AP-2** et de l'expression d'**ERBB2**. C'est ainsi qu'à l'aide de vecteurs d'expression pour AP-2 α et Ku80 et de vecteurs rapporteurs contenant une région du promoteur d'**ERBB2**, nous avons pu montrer une coopération de la protéine Ku80 sur l'activité transcriptionnelle d'AP-2 α . A l'aide d'interférence à l'ARNm (siRNA), la diminution des protéines Ku a montré une réduction significative de l'ARNm d'ERBB2 ainsi que sa protéine p185-erbB2. En utilisant à nouveau des vecteurs rapporteurs, la diminution des protéines Ku a montré une réduction de l'activité du promoteur d'ERBB2, et ce seulement si le site de fixation pour AP-2 était préservé. De plus, l'utilisation combinée de siRNAs dirigés contre Ku et AP-2 (α et γ) a montré une réduction encore plus importante de l'activité de ce promoteur. Enfin, des expériences de ChIP assay ont montré le recrutement de la protéine Ku70 sur le promoteur proximal d'ERBB2, et que ce recrutement nécessitait la présence des protéines AP-2 α et AP-2 γ . De plus, ces protéines AP-2 nécessitent également la présence des protéines Ku pour fixer le promoteur proximal du gène **ERBB2**.

Ces résultats portent donc à croire que les protéines **Ku** interagissent avec les protéines AP-2 (α et γ) et ont un **rôle activateur** dans leur activité transcriptionnelle sur le gène **ERBB2**. Quant à l'interaction directe de la protéine Ku avec le promoteur d'**ERBB2**, elle n'est pas à exclure. Il existe une zone d'ADN dans le promoteur « core » d'ERBB2, qui peut former une **boucle D** d'ADN en triplex. Cette structure est retrouvée dans les recombinaisons d'ADN comme les V(D)J, où les protéines Ku jouent un rôle. Les protéines Ku sont également

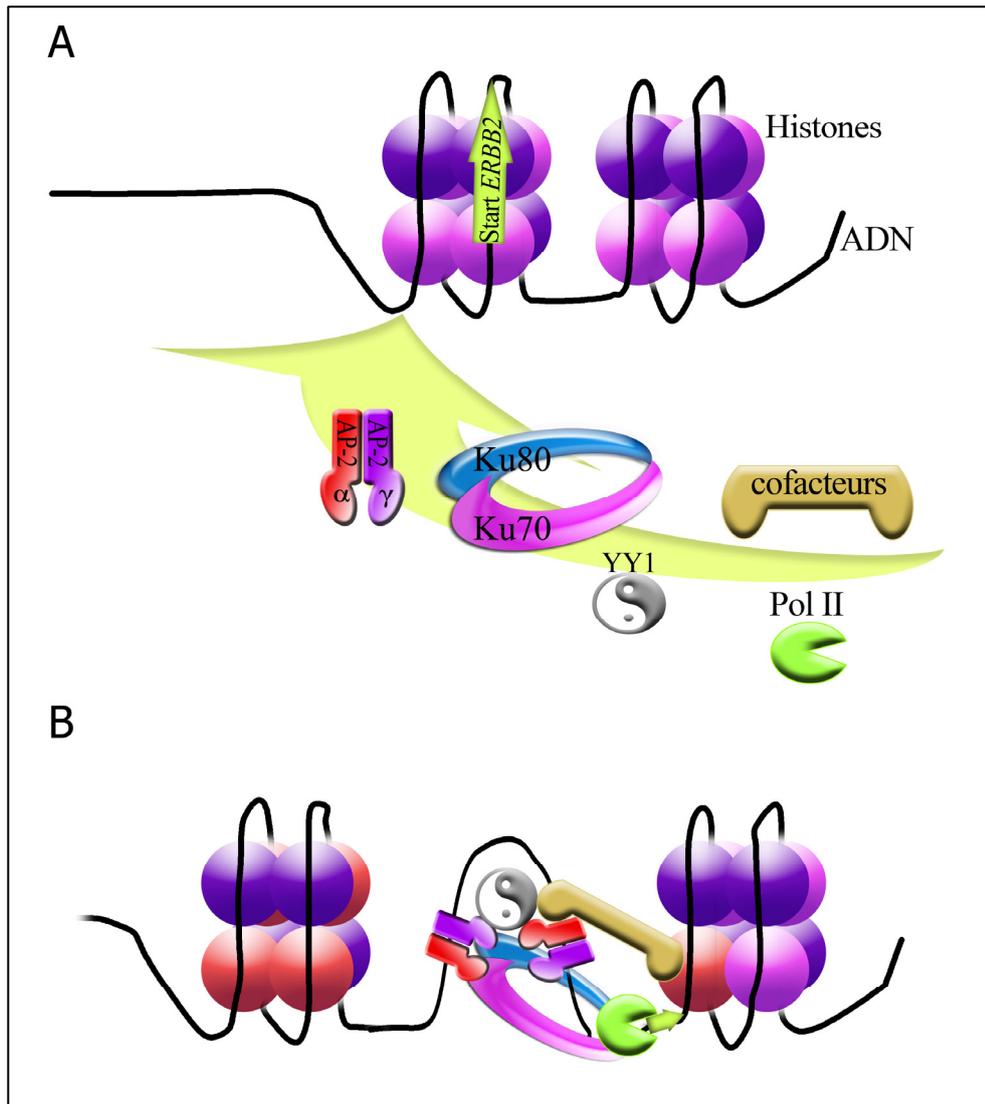


Figure D.1. Modèle de régulation de la transcription du gène *ERBB2* via AP-2 (α et γ) et ses cofacteurs. **A.** En l'absence d'AP-2 et de ses cofacteurs (YY1, Ku70/80, et d'autres), la machinerie transcriptionnelle (illustrée ici par Pol II) ne peut accéder au site d'initiation du gène *ERBB2*. En effet, celui-ci est rendu inaccessible par son enroulement autour des histones. **B.** Lorsque les protéines AP-2 peuvent interagir avec le promoteur, ses cofacteurs vont induire des modifications des histones (rose \rightarrow rouge). La chromatine va s'ouvrir et la séquence d'ADN contenant le site d'initiation de la transcription va devenir accessible à la machinerie transcriptionnelle. La transcription du gène *ERBB2* peut dès lors commencer. Les cofacteurs comme p300/CBP et CITED2/4 jouent certainement un grand rôle dans les modifications des histones, et sont compris dans le groupe « cofacteurs ».

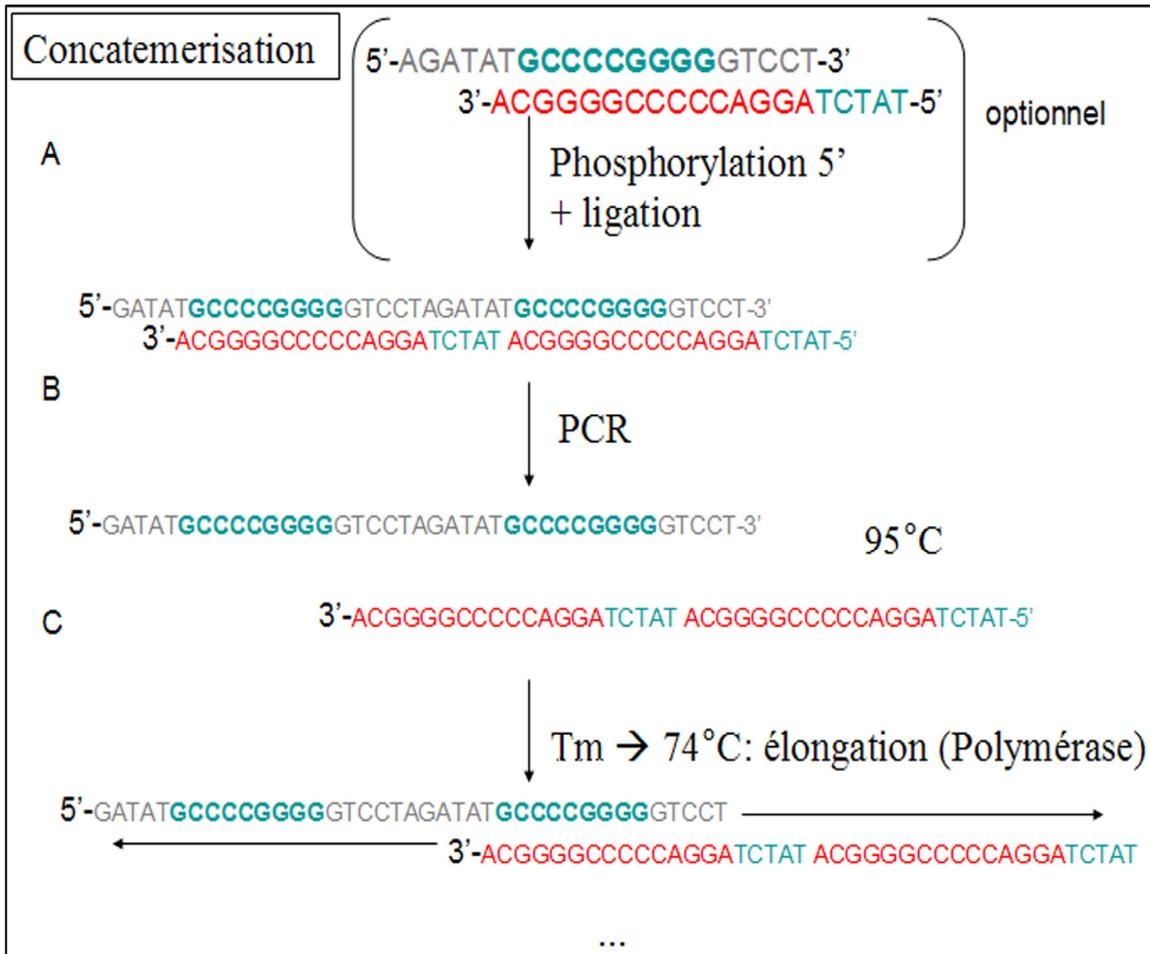
impliquées dans la stabilisation des boucles T d'ADN dans les télomères. Ces hypothèses sont bien sûr à vérifier *in vitro*. Les protéines Ku ont été montrées comme interagissant avec l'ARN Polymerase II (Pol II) sur certains promoteurs (Mo and Dynan, 2002). Les protéines Ku pourraient donc servir de pont entre les facteurs de transcription AP-2 fixant différentes régions du promoteur d'*ERBB2* et la machinerie transcriptionnelle située sur le promoteur core. La Figure D.1 propose un modèle dans lequel les cofacteurs d'AP-2 vont ouvrir la chromatine pour permettre l'accès de la machinerie transcriptionnelle au site d'initiation de la transcription.

Cependant, les facteurs de transcription AP-2 ne sont pas les seuls qui contribuent à la surexpression du gène *ERBB2* dans les cellules de cancer mammaire. En effet, leur inactivation réduit partiellement l'expression. De plus, leurs taux d'inhibition varient d'une lignée cellulaire à l'autre. Ainsi, les siRNAs dirigés contre AP-2 et Ku n'ont pas le même effet sur la réduction d'*ERBB2* (ARNm et protéine) dans les lignées cellulaires BT-474 ou SKBR3. Différents mécanismes de régulation de l'expression du gène *ERBB2* semblent présents dans ces cellules. D'autres protéines ainsi que d'autres régions du promoteur d'*ERBB2* pourraient ainsi avoir un rôle dans cette surexpression. D'autres régions régulatrices pour l'expression d'*ERBB2* existent sur son promoteur. Ainsi, une région au niveau de l'intron 1 du gène *ERBB2* a été identifiée pour interagir et être régulée par ER/PAX-2 (Hurtado et al., 2008). Ou encore, un site de liaison pour un membre de la famille Ets, sans doute PEA3, se situe au niveau du promoteur « core » d'*ERBB2* (Scott et al., 1994; Scott et al., 2000; Xing et al., 2000). D'autres régions pourraient également faire l'objet d'études, et l'apparition de nouvelles techniques d'épigénétiques comme le ChIP Seq pourraient certainement les faciliter (Bock and Lengauer, 2008).

Ce travail ne pourrait être conclu sans discuter des **perspectives thérapeutiques** concernant le cancer du sein. Il est vrai que les traitements actuels dirigés contre *ERBB2* ont déjà montré une réelle efficacité. De plus, la combinaison de ceux-ci, avec l'apparition de nouvelles molécules semble encore plus prometteuse (voir Introduction § I.2.2.b).

En découvrant que les protéines Ku et YY1 avaient un rôle dans l'expression d'*ERBB2*, nous avons voulu savoir si ces protéines pourraient être ciblées. Une équipe a montré que des inhibiteurs d'HDAC (histone deacetylase), utilisés entre autres dans le traitement de certains cancers, ont un effet sur les protéines Ku (Chen et al., 2007). En effet, ces

inhibiteurs augmentent l'acétylation de la protéine Ku70, ce qui a pour conséquence de réduire ses interactions avec l'ADN et de rendre l'hétérodimère Ku70/Ku80 inefficace. Ce traitement a un impact sur la réparation de l'ADN et sur la survie cellulaire. L'activité de la protéine YY1 peut également être modulée par ces inhibiteurs (Yao et al., 2001). Certains de ces inhibiteurs d'HDAC ont également été montrés comme réduisant la transcription du gène *ERBB2* dans les lignées BT-474 et SKBR3 (Scott et al., 2002). La protéine HDAC6 serait en partie responsable de cette réduction (Scott et al., 2008). Néanmoins, il se peut que la réduction d'*ERBB2* observée dans cette étude soit également liée à l'inhibition des protéines Ku, voire même d'YY1. Cette hypothèse sera à vérifier. Cependant l'utilisation de drogues comme les inhibiteurs d'HDAC, ciblant la transcription du gène *ERBB2*, semble une voie thérapeutique plausible.



M.1. Schématisation de la Self-Priming PCR. **A.** Tout d'abord, les brins sont conçus pour se chevaucher et laisser des séquences d'ADN en simple brin aux extrémités 5'. Soit les brins sont conçus pour contenir deux fois la séquence voulue, soit les brins sont dupliqués par phosphorylation et ligation. **B.** Lors des étapes de PCR, les brins dissociés à 95°C peuvent ensuite, **C**, se chevaucher sur d'autres parties, et allongé ainsi le brin d'une ou plusieurs séquences. La répétition des cycles de dénaturation et d'élongation permet alors d'obtenir de longs brins d'ADN contenant plusieurs fois la séquence voulue. Ces brins sont plus communément appelés multimères ou concatémères.

Matériels et Méthodes

Seules les techniques qui ne sont pas décrites dans les 2 articles annexés sont reprises dans cette section.

M.1. Mise au point de la chromatographie d'affinité sur ADN

M.1.1. Self-priming PCR

La technique de Self-priming-PCR est utilisée pour construire de longues séquences d'ADN contenant un motif répété, appelées concatémères. La technique a été décrite précédemment (White et al., 1991) (Figure M. 1). La séquence de fixation d'AP-2 (HTF), ou mutée (Mut), est doublée pour la conception des amorces (primers), mais aussi avec des bouts sortants. Si celle-ci n'est pas doublée, elle peut le devenir, par une simple phosphorylation et une ligation. Lors d'un cycle de PCR, les séquences peuvent alors se chevaucher, et la séquence peut alors s'allonger de part et d'autres, et donner un brin d'ADN composé de 3 séquences. Les cycles sont répétés pour avoir des séquences de plus en plus longues.

Pour la chromatographie d'affinité sur ADN, une des deux amorces (ici le 5' sortant) est conçue avec une biotine à son extrémité 5'.

Les séquences utilisées sont illustrées Figure R. 20.A. et conçues par Eurogentec (Seraing, Belgium).

M.1.2. Retard sur gel – EMSA (Electrophoretic mobility-shift assay)

Des extraits nucléaire de la lignée cellulaire BT-474 étaient préparés comme décrits précédemment (Schreiber, 1989). Les séquences contenant le site de fixation pour AP-2 (HTF) et les séquences mutées sont illustrées sur la Figure R. 20.A., et sont les mêmes pour la Self-Priming PCR. Les sondes ont été remplies et marquées à l'aide d'ATP³² (Amersham Biosciences), et de l'enzyme Klenow (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland). L'EMSA a été élaborée comme décrite précédemment (Grootclaes et al., 1999). Les complexes retardés ont été analysés sur un gel de polyacrylamide non-dénaturant 5%(w/v), dans du tampon 0.25M-Tris-borate-EDTA.

Pour l'hybridation de l'anticorps (supershift), les protéines ont été incubées toute une nuit à 4°C, dans un tampon d'EMSA avec 400ng d'anticorps AP-2α de lapin (C18, sc-184; Santa Cruz Biotechnology).

Enfin, les gels ont été séchés et analysés en utilisant un PhosphorImager (Molecular Dynamics).

M.1.3. Chromatographie d'affinité sur ADN.

Toute la procédure qui suit a été élaborée à l'aide d'un robot (KingFisher, Thermo).

Par réaction, 15µl de billes magnétiques enrobées de streptavidine (M270, Dynal, Thermo) étaient récupérées dans 100µl de PBS stabilisant (PBS avec 0,1% BSA, ou 5% PEG 600), puis lavées dans 300µl de ce PBS. L'incubation des billes avec l'ADN se faisait dans 100µl de ce PBS avec 1µg d'ADN, 15min. Après lavage dans 300µl de PBS stabilisant, les billes sont incubées 50min avec les protéines nucléaires (diluées dans 155mM CaCl₂ ; 5mM HEPES pH7,4 ; 1mM MgCl₂). Elles sont enfin lavées une fois dans 300µl de PBS modifié puis une dernière dans du PBS sans BSA ou PEG.

Le tampon de Laemmli utilisé était le même qu'utilisé pour la dénaturation des protéines avant une électrophorèse sur gel de polyacrylamide de type SDS-PAGE (100mM Tris-HCl pH 6,8 ; 10% glycerol, 2% SDS, 4% β-mercaptoethanol), sans bleu de bromophenol.

M.1.4. Utilisation des siRNAs.

La transfection des siRNAs a été réalisée de manière transitoire, à l'aide du procédé au Phosphate Calcique (Chaplet et al., 2004). Cependant, les délais de récolte des ARNm ou des protéines après transfection des siRNAs n'ont pas été choisis au hasard mais ont fait l'objet de mises au point préalables. Par exemple, les protéines Ku ciblées étant stables dans le temps, leur extinction nécessite une deuxième transfection de siRNA, 48h après la première. Les autres siRNAs ont dès lors été transfectés de la même façon.

M.2. Etude de la croissance cellulaire

M.2.1. Photographie cellulaire

L'acquisition des images réalisées sur les cellules traitées aux siRNAs a été réalisée d'un microscope Leica muni d'une caméra (DFC).

M.2.2. Anticorps (autres que dans les articles)

L'anticorps PARP-1 provenait de chez Alexis (Clone C2-10, ref :ALX-804-210-R050)

L'anticorps Caspase 3 provenait de AbCam (ref : ab59388)

M.2.3. Test Annexin-Pi

Le test a été réalisé à l'aide du kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (556547 ; BD Pharmingen) et utilisé selon les consignes du fabricant.

Liste des Références

- Allouche A and Nolens G., Tancredi A, Delacroix L, Mardaga J, Fridman V, Winkler R, Boniver J, Delvenne P, Begon DY** (2008) The combined immunodetection of AP-2alpha and YY1 transcription factors is associated with ERBB2 gene overexpression in primary breast tumors. *Breast Cancer Res* 10:R9.
- Andrechek ER, Hardy WR, Siegel PM, Rudnicki MA, Cardiff RD, Muller WJ** (2000) Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3444-3449.
- Aqeilan RI, Palamarchuk A, Weigel RJ, Herrero JJ, Pekarsky Y, Croce CM** (2004) Physical and functional interactions between the Wwox tumor suppressor protein and the AP-2gamma transcription factor. *Cancer Res* 64:8256-8261.
- Ariizumi K, Bergstresser PR, Takashima A** (1996) Wavelength-specific induction of immediate early genes by ultraviolet radiation. *J Dermatol Sci* 12:147-155.
- Bamforth SD, Braganca J, Eloranta JJ, Murdoch JN, Marques FI, Kranc KR, Farza H, Henderson DJ, Hurst HC, Bhattacharya S** (2001) Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfap2 co-activator. *Nat Genet* 29:469-74.
- Barlev NA, Poltoratsky V, Owen-Hughes T, Ying C, Liu L, Workman JL, Berger SL** (1998) Repression of GCN5 histone acetyltransferase activity via bromodomain-mediated binding and phosphorylation by the Ku-DNA-dependent protein kinase complex. *Mol Cell Biol* 18:1349-1358.
- Barnes DE** (2001) Non-homologous end joining as a mechanism of DNA repair. *Curr Biol* 11:R455-R457.
- Bates NP, Hurst HC** (1997) An intron 1 enhancer element mediates oestrogen-induced suppression of ERBB2 expression. *Oncogene* 15:473-481.
- Batsche E, Cremisi C** (1999) Opposite transcriptional activity between the wild type c-myc gene coding for c-Myc1 and c-Myc2 proteins and c-Myc1 and c-Myc2 separately. *Oncogene* 18:5662-5671.
- Batsche E, Muchardt C, Behrens J, Hurst HC, Cremisi C** (1998) RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cells through interaction with transcription factor AP-2. *Mol Cell Biol* 18:3647-3658.
- Bauer R, Imhof A, Pscherer A, Kopp H, Moser M, Seegers S, Kerscher M, Tainsky MA, Hofstaedter F, Buettner R** (1994) The genomic structure of the human AP-2 transcription factor. *Nucleic Acids Res* 22:1413-1420.
- Begon DY, Delacroix L, Vernimmen D, Jackers P, Winkler R** (2005) Yin Yang 1 cooperates with activator protein 2 to stimulate ERBB2 gene expression in mammary cancer cells. *J Biol Chem* 280:24428-24434.
- Belenkov AI, Paiement JP, Panasci LC, Monia BP, Chow TY** (2002) An antisense oligonucleotide targeted to human Ku86 messenger RNA sensitizes M059K malignant glioma cells to ionizing radiation, bleomycin, and etoposide but not DNA cross-linking agents. *Cancer Res* 62:5888-5896.
- Benoit V, Chariot A, Delacroix L, Deregowski V, Jacobs N, Merville MP, Bours V** (2004) Caspase-8-dependent HER-2 cleavage in response to tumor necrosis factor alpha stimulation is counteracted by nuclear factor kappaB through c-FLIP-L expression. *Cancer Res* 64:2684-2691.
- Benz CC, O'Hagan RC, Richter B, Scott GK, Chang CH, Xiong X, Chew K, Ljung BM, Edgerton S, Thor A, Hassell JA** (1997) HER2/Neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer. *Oncogene* 15:1513-1525.
- Bertolini LR, Bertolini M, Anderson GB, Maga EA, Madden KR, Murray JD** (2007) Transient depletion of Ku70 and Xrcc4 by RNAi as a means to manipulate the non-homologous end-joining pathway. *J Biotechnol* 128:246-257.
- Bhalla SS, Robitaille L, Nemer M** (2001) Cooperative activation by GATA-4 and YY1 of the cardiac B-type natriuretic peptide promoter. *J Biol Chem* 276:11439-11445.

- Blier PR, Griffith AJ, Craft J, Hardin JA** (1993) Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J Biol Chem* 268:7594-7601.
- Bock C, Lengauer T** (2008) Computational epigenetics. *Bioinformatics* 24:1-10.
- Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SA, Killander D, McGuire WL** (1990) HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 50:4332-4337.
- Bosher JM, Totty NF, Hsuan JJ, Williams T, Hurst HC** (1996) A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma. *Oncogene* 13:1701-7.
- Bosher JM, Williams T, Hurst HC** (1995) The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:744-747.
- Boyle P, Ferlay J** (2005) Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16:481-488.
- Braganca J, Eloranta JJ, Bamforth SD, Ibbitt JC, Hurst HC, Bhattacharya S** (2003) Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2. *J Biol Chem* 278:16021-9.
- Braganca J, Swingler T, Marques FI, Jones T, Eloranta JJ, Hurst HC, Shioda T, Bhattacharya S** (2002) Human CREB-binding protein/p300-interacting transactivator with ED-rich tail (CITED) 4, a new member of the CITED family, functions as a co-activator for transcription factor AP-2. *J Biol Chem* 277:8559-65.
- Camara-Clayette V, Rahuel C, Bertrand O, Cartron JP** (1999) The E-box of the human glycoporphin B promoter is involved in the erythroid-specific expression of the GPB gene. *Biochem Biophys Res Commun* 265:170-176.
- Chaplet M, Detry C, Deroanne C, Fisher LW, Castronovo V, Bellahcene A** (2004) Zoledronic acid up-regulates bone sialoprotein expression in osteoblastic cells through Rho GTPase inhibition. *Biochem J* 384:591-598.
- Chen CS, Wang YC, Yang HC, Huang PH, Kulp SK, Yang CC, Lu YS, Matsuyama S, Chen CY, Chen CS** (2007) Histone deacetylase inhibitors sensitize prostate cancer cells to agents that produce DNA double-strand breaks by targeting Ku70 acetylation. *Cancer Res* 67:5318-5327.
- Cheng YH, Handwerker S** (2002) AP-2alpha modulates human corticotropin-releasing hormone gene expression in the placenta by direct protein-protein interaction. *Mol Cell Endocrinol* 191:127-136.
- Choi EK, Lee YH, Choi YS, Kwon HM, Choi MS, Ro JY, Park SK, Yu E** (2002) Heterogeneous expression of Ku70 in human tissues is associated with morphological and functional alterations of the nucleus. *J Pathol* 198:121-130.
- Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, Altucci L, Petrizzi VB, Borgo R, Cancemi M, Caporali S, Caristi S, Scafoglio C, Teti D, Bresciani F, Perillo B, Weisz A** (2004) Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol Cell Biol* 24:7260-7274.
- Collis SJ, DeWeese TL, Jeggo PA, Parker AR** (2005) The life and death of DNA-PK. *Oncogene* 24:949-961.
- Cortes P, Weis-Garcia F, Misulovin Z, Nussenzweig A, Lai JS, Li G, Nussenzweig MC, Baltimore D** (1996) In vitro V(D)J recombination: signal joint formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14008-14013.
- Creaser PC, D'Argenio DA, Williams T** (1996) Comparative and functional analysis of the AP2 promoter indicates that conserved octamer and initiator elements are critical for activity. *Nucleic Acids Res* 24:2597-2605.
- Crone SA, Zhao YY, Fan L, Gu Y, Minamisawa S, Liu Y, Peterson KL, Chen J, Kahn R, Condorelli G, Ross J, Jr., Chien KR, Lee KF** (2002) ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 8:459-465.

- dda di FF, Hande MP, Tong WM, Roth D, Lansdorp PM, Wang ZQ, Jackson SP** (2001) Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr Biol* 11:1192-1196.
- De BM, Dati C, Antoniotti S, Maggiora P, Sapei ML** (1992) Hormonal regulation of c-erbB-2 oncogene expression in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:21-25.
- deConinck EC, McPherson LA, Weigel RJ** (1995) Transcriptional regulation of estrogen receptor in breast carcinomas. *Mol Cell Biol* 15:2191-2196.
- Delacroix L, Begon D, Chatel G, Jackers P, Winkler R** (2005) Distal ERBB2 promoter fragment displays specific transcriptional and nuclear binding activities in ERBB2 overexpressing breast cancer cells. *DNA Cell Biol* 24:582-594.
- Diamandis EP, Christopoulos TK** (1991) The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* 37:625-636.
- Doherty AJ, Jackson SP** (2001) DNA repair: how Ku makes ends meet. *Curr Biol* 11:R920-R924.
- Downs JA, Jackson SP** (2004) A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:367-378.
- Eccles SA** (2001) The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:393-406.
- Eckert D, Buhl S, Weber S, Jager R, Schorle H** (2005) The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol* 6:246.
- Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA** (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* 15:50-65.
- Eloranta JJ, Hurst HC** (2002) Transcription factor AP-2 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and is sumoylated in vivo. *J Biol Chem* 277:30798-30804.
- Ewer MS, Vooletich MT, Durand JB, Woods ML, Davis JR, Valero V, Lenihan DJ** (2005) Reversibility of trastuzumab-related cardiotoxicity: new insights based on clinical course and response to medical treatment. *J Clin Oncol* 23:7820-7826.
- Featherstone C, Jackson SP** (1999a) Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res* 434:3-15.
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P** (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18:581-592.
- Francoeur AM, Peebles CL, Gompper PT, Tan EM** (1986) Identification of Ki (Ku, p70/p80) autoantigens and analysis of anti-Ki autoantibody reactivity. *J Immunol* 136:1648-1653.
- Friedrichs N, Jager R, Paggen E, Rudlowski C, Merkelbach-Bruse S, Schorle H, Buettner R** (2005) Distinct spatial expression patterns of AP-2alpha and AP-2gamma in non-neoplastic human breast and breast cancer. *Mod Pathol* 18:431-438.
- Friedrichs N, Steiner S, Buettner R, Knoepfle G** (2007) Immunohistochemical expression patterns of AP2alpha and AP2gamma in the developing fetal human breast. *Histopathology* 51:814-823.
- Garcia MA, Campillos M, Marina A, Valdivieso F, Vazquez J** (1999) Transcription factor AP-2 activity is modulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *FEBS Lett* 444:27-31.
- Gaubatz S, Imhof A, Dosch R, Werner O, Mitchell P, Buettner R, Eilers M** (1995) Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *EMBO J* 14:1508-1519.

- Gee JM** (2002) Chaperone-mediated destruction of erbB2: relevance to tyrosine kinase inhibitors. *Breast Cancer Res* 4:205-206.
- Gee JM, Eloranta JJ, Ibbitt JC, Robertson JF, Ellis IO, Williams T, Nicholson RI, Hurst HC** (2009) Overexpression of TFAP2C in invasive breast cancer correlates with a poorer response to anti-hormone therapy and reduced patient survival. *J Pathol* 217:32-41.
- Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI, Hurst HC** (1999b) Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor-like role for the transcription factor AP-2 in invasive breast cancer. *J Pathol* 189:514-20.
- Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI, Hurst HC** (1999a) Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor-like role for the transcription factor AP-2 in invasive breast cancer. *J Pathol* 189:514-520.
- Giffin W, Torrance H, Rodda DJ, Prefontaine GG, Pope L, Hache RJ** (1996) Sequence-specific DNA binding by Ku autoantigen and its effects on transcription. *Nature* 380:265-268.
- Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Esteva FJ** (2006) Adjuvant therapy with trastuzumab for HER-2/neu-positive breast cancer. *Oncologist* 11:857-867.
- Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B** (2006) Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 25:1125-1142.
- Grooteclaes M, Pasleau F, Dijkmans H, Berzi P, Albert A, Winkler-Gol R** (1994) The 6-kilobase c-erbB2 promoter contains positive and negative regulatory elements functional in human mammary cell lines. *Cancer Res* 54:4193-4199.
- Grooteclaes M, Vernimmen D, Plaza S, Pasleau F, Hodzic D, Winkler-Gol R** (1999) A new cis element is involved in the HER2 gene overexpression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 59:2527-2531.
- Grote J, Konig S, Ackermann D, Sopalla C, Benedyk M, Los M, Kerkhoff C** (2006) Identification of poly(ADP-ribose)polymerase-1 and Ku70/Ku80 as transcriptional regulators of S100A9 gene expression. *BMC Mol Biol* 7:48.
- Grunewald TG, Kammerer U, Kapp M, Eck M, Dietl J, Butt E, Honig A** (2007) Nuclear localization and cytosolic overexpression of LASP-1 correlates with tumor size and nodal-positivity of human breast carcinoma. *BMC Cancer* 7:198.
- Grunt TW, Saceda M, Martin MB, Lupu R, Dittrich E, Krupitza G, Harant H, Huber H, Dittrich C** (1995) Bidirectional interactions between the estrogen receptor and the cerbB-2 signaling pathways: heregulin inhibits estrogenic effects in breast cancer cells. *Int J Cancer* 63:560-567.
- Gullo C, Au M, Feng G, Teoh G** (2006) The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1765:223-234.
- Guo B, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS** (1997) ATF1 and CREB trans-activate a cell cycle regulated histone H4 gene at a distal nuclear matrix associated promoter element. *Biochemistry* 36:14447-14455.
- Gurley KE, Moser R, Gu Y, Hasty P, Kemp CJ** (2009) DNA-PK suppresses a p53-independent apoptotic response to DNA damage. *EMBO Rep* 10:87-93.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA** (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400:464-468.
- Hanahan D, Weinberg RA** (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hasleton MD, Ibbitt JC, Hurst HC** (2003) Characterization of the human activator protein-2gamma (AP-2gamma) gene: control of expression by Sp1/Sp3 in breast tumour cells. *Biochem J* 373:925-932.
- He Y, Casaccia-Bonnel P** (2008) The Yin and Yang of YY1 in the nervous system. *J Neurochem* 106:1493-1502.

- He Y, Dupree J, Wang J, Sandoval J, Li J, Liu H, Shi Y, Nave KA, Casaccia-Bonnel P** (2007) The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron* 55:217-230.
- Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R** (2000b) Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 260:1-12.
- Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R** (2000a) Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 260:1-12.
- Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF, III, Hynes NE** (2003) The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8933-8938.
- Hollywood DP, Hurst HC** (1993) A novel transcription factor, OB2-1, is required for overexpression of the proto-oncogene c-erbB-2 in mammary tumour lines. *EMBO J* 12:2369-2375.
- Hou MH, Lin SB, Yuann JM, Lin WC, Wang AH, Kan LL** (2001) Effects of polyamines on the thermal stability and formation kinetics of DNA duplexes with abnormal structure. *Nucleic Acids Res* 29:5121-5128.
- Hurst HC** (2001) Update on HER-2 as a target for cancer therapy: the ERBB2 promoter and its exploitation for cancer treatment. *Breast Cancer Res* 3:395-8.
- Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, Hutcheson IR, Nicholson RI, Brown M, Jiang J, Howat WJ, Ali S, Carroll JS** (2008) Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature* 456:663-666.
- Hutchinson JN, Muller WJ** (2000) Transgenic mouse models of human breast cancer. *Oncogene* 19:6130-6137.
- Hynes NE, Lane HA** (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5:341-354.
- Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, Honda K, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Hirohashi S, Yamada T** (2007) Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res* 67:911-918.
- Iorio MV, Casalini P, Tagliabue E, Menard S, Croce CM** (2008) MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer. *Eur J Cancer* 44:2753-2759.
- Iwamoto N, be-Dohmae S, Ayaori M, Tanaka N, Kusahara M, Ohsuzu F, Yokoyama S** (2007) ATP-binding cassette transporter A1 gene transcription is downregulated by activator protein 2alpha. Doxazosin inhibits activator protein 2alpha and increases high-density lipoprotein biogenesis independent of alpha1-adrenoceptor blockade. *Circ Res* 101:156-165.
- Jiang D, Zhou Y, Moxley RA, Jarrett HW** (2008) Purification and identification of positive regulators binding to a novel element in the c-Jun promoter. *Biochemistry* 47:9318-9334.
- Jiang MS, Lane MD** (2000) Sequential repression and activation of the CCAAT enhancer-binding protein-alpha (C/EBPalpha) gene during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12519-12523.
- Jiang MS, Tang QQ, McLenithan J, Geiman D, Shillinglaw W, Henzel WJ, Lane MD** (1998) Derepression of the C/EBPalpha gene during adipogenesis: identification of AP-2alpha as a repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3467-3471.
- Johnson AC** (1996) Activation of epidermal growth factor receptor gene transcription by phorbol 12-myristate 13-acetate is mediated by activator protein 2. *J Biol Chem* 271:3033-3038.
- Kannan P, Buettner R, Chiao PJ, Yim SO, Sarkiss M, Tainsky MA** (1994) N-ras oncogene causes AP-2 transcriptional self-interference, which leads to transformation. *Genes Dev* 8:1258-69.

- Kannan P, Tainsky MA** (1999) Coactivator PC4 mediates AP-2 transcriptional activity and suppresses ras-induced transformation dependent on AP-2 transcriptional interference. *Mol Cell Biol* 19:899-908.
- Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA** (1999) PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* 27:866-74.
- Kelavkar UP, Wang S, Badr KF** (2000) Ku autoantigen (DNA helicase) is required for interleukins-13/-4-induction of 15-lipoxygenase-1 gene expression in human epithelial cells. *Genes Immun* 1:237-250.
- Kim E, Li K, Lieu C, Tong S, Kawai S, Fukutomi T, Zhou Y, Wands J, Li J** (2008) Expression of apolipoprotein C-IV is regulated by Ku antigen/peroxisome proliferator-activated receptor gamma complex and correlates with liver steatosis. *J Hepatol* 49:787-798.
- Kirisits A, Pils D, Krainer M** (2007) Epidermal growth factor receptor degradation: an alternative view of oncogenic pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 39:2173-2182.
- Koike M** (2002) Dimerization, translocation and localization of Ku70 and Ku80 proteins. *J Radiat Res (Tokyo)* 43:223-236.
- Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS** (2008) HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* 27:6120-6130.
- Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh SC, King CR** (1987) Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms. *EMBO J* 6:605-610.
- Lee BC, Lee TH, Zagazdson R, Avraham S, Usheva A, Avraham HK** (2005) Carboxyl-terminal Src kinase homologous kinase negatively regulates the chemokine receptor CXCR4 through YY1 and impairs CXCR4/CXCL12 (SDF-1alpha)-mediated breast cancer cell migration. *Cancer Res* 65:2840-2845.
- Lee SE, He DM, Hendrickson EA** (1996) Characterization of Chinese hamster cell lines that are x-ray-sensitive, impaired in DNA double-strand break repair and defective for V(D)J recombination. *Curr Top Microbiol Immunol* 217:133-142.
- Lees-Miller SP, Meek K** (2003) Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* 85:1161-1173.
- Li G, Nelsen C, Hendrickson EA** (2002) Ku86 is essential in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:832-837.
- Li H, Watts GS, Oshiro MM, Futscher BW, Domann FE** (2006a) AP-2alpha and AP-2gamma are transcriptional targets of p53 in human breast carcinoma cells. *Oncogene* 25:5405-5415.
- Li L, Olvera JM, Yoder KE, Mitchell RS, Butler SL, Lieber M, Martin SL, Bushman FD** (2001) Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *EMBO J* 20:3272-3281.
- Li M, Wang Y, Hung MC, Kannan P** (2006b) Inefficient proteasomal-degradation pathway stabilizes AP-2alpha and activates HER-2/neu gene in breast cancer. *Int J Cancer* 118:802-811.
- Lim JW, Kim H, Kim KH** (2002) Expression of Ku70 and Ku80 mediated by NF-kappa B and cyclooxygenase-2 is related to proliferation of human gastric cancer cells. *J Biol Chem* 277:46093-46100.
- Mahajan KN, Mitchell BS** (2003) Role of human Pso4 in mammalian DNA repair and association with terminal deoxynucleotidyl transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10746-10751.
- Matheos D, Novac O, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M** (2003) Analysis of the DNA replication competence of the xrs-5 mutant cells defective in Ku86. *J Cell Sci* 116:111-124.
- Mayeur GL, Kung WJ, Martinez A, Izumiya C, Chen DJ, Kung HJ** (2005) Ku is a novel transcriptional recycling coactivator of the androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 280:10827-10833.

- Mazina OM, Phillips MA, Williams T, Vines CA, Cherr GN, Rice RH** (2001) Redistribution of transcription factor AP-2alpha in differentiating cultured human epidermal cells. *J Invest Dermatol* 117:864-870.
- McPherson LA, Baichwal VR, Weigel RJ** (1997) Identification of ERF-1 as a member of the AP2 transcription factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4342-4347.
- McPherson LA, Loktev AV, Weigel RJ** (2002) Tumor suppressor activity of AP2alpha mediated through a direct interaction with p53. *J Biol Chem* 277:45028-45033.
- McPherson LA, Weigel RJ** (1999) AP2alpha and AP2gamma: a comparison of binding site specificity and transactivation of the estrogen receptor promoter and single site promoter constructs. *Nucleic Acids Res* 27:4040-4049.
- Mertens PR, fonso-Jaume MA, Steinmann K, Lovett DH** (1998) A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription. *J Biol Chem* 273:32957-32965.
- Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S, Homma M** (1981) Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* 68:611-620.
- Mimori T, Hardin JA** (1986) Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem* 261:10375-10379.
- Mitchell PJ, Timmons PM, Hebert JM, Rigby PW, Tjian R** (1991) Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 5:105-119.
- Mo X, Dynan WS** (2002) Subnuclear localization of Ku protein: functional association with RNA polymerase II elongation sites. *Mol Cell Biol* 22:8088-8099.
- Muller C, Paupert J, Monferran S, Salles B** (2005) The double life of the Ku protein: facing the DNA breaks and the extracellular environment. *Cell Cycle* 4:438-441.
- Myers E, Hill AD, Kelly G, McDermott EW, O'Higgins NJ, Young LS** (2006) A positive role for PEA3 in HER2-mediated breast tumour progression. *Br J Cancer* 95:1404-1409.
- Newman SP, Bates NP, Vernimmen D, Parker MG, Hurst HC** (2000) Cofactor competition between the ligand-bound oestrogen receptor and an intron 1 enhancer leads to oestrogen repression of ERBB2 expression in breast cancer. *Oncogene* 19:490-497.
- Nezu M, Sasaki H, Kuwahara Y, Ochiya T, Yamada Y, Sakamoto H, Tashiro H, Yamazaki M, Ikeuchi T, Saito Y, Terada M** (1999) Identification of a novel promoter and exons of the c-ERBB-2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 258:499-505.
- Nussenzweig A, Chen C, da CS, V, Sanchez M, Sokol K, Nussenzweig MC, Li GC** (1996) Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 382:551-555.
- Nussenzweig A, Sokol K, Burgman P, Li L, Li GC** (1997) Hypersensitivity of Ku80-deficient cell lines and mice to DNA damage: the effects of ionizing radiation on growth, survival, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13588-13593.
- Nyormoi O, Wang Z, Doan D, Ruiz M, McConkey D, Bar-Eli M** (2001) Transcription factor AP-2alpha is preferentially cleaved by caspase 6 and degraded by proteasome during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 21:4856-67.
- Oei SL, Shi Y** (2001) Transcription factor Yin Yang 1 stimulates poly(ADP-ribosyl)ation and DNA repair. *Biochem Biophys Res Commun* 284:450-454.
- Oh WJ, Kim EK, Ko JH, Yoo SH, Hahn SH, Yoo OJ** (2002) Nuclear proteins that bind to metal response element a (MREa) in the Wilson disease gene promoter are Ku autoantigens and the Ku-80 subunit is necessary for basal transcription of the WD gene. *Eur J Biochem* 269:2151-2161.

- Orso F, Cottone E, Hasleton MD, Ibbitt JC, Sismondi P, Hurst HC, De BM** (2004) Activator protein-2gamma (AP-2gamma) expression is specifically induced by oestrogens through binding of the oestrogen receptor to a canonical element within the 5'-untranslated region. *Biochem J* 377:429-438.
- Orso F, Penna E, Cimino D, Astanina E, Maione F, Valdembri D, Giraudo E, Serini G, Sismondi P, De BM, Taverna D** (2008) AP-2alpha and AP-2gamma regulate tumor progression via specific genetic programs. *FASEB J* 22:2702-2714.
- Oyama N, Takahashi H, Tojo M, Iwatsuki K, Iizuka H, Nakamura K, Homma Y, Kaneko F** (2002) Different properties of three isoforms (alpha, beta, and gamma) of transcription factor AP-2 in the expression of human keratinocyte genes. *Arch Dermatol Res* 294:273-280.
- Palmieri D, Bronder JL, Herring JM, Yoneda T, Weil RJ, Stark AM, Kurek R, Vega-Valle E, Feigenbaum L, Halverson D, Vortmeyer AO, Steinberg SM, Aldape K, Steeg PS** (2007) Her-2 overexpression increases the metastatic outgrowth of breast cancer cells in the brain. *Cancer Res* 67:4190-4198.
- Park SJ, Ciccone SL, Freie B, Kurimasa A, Chen DJ, Li GC, Clapp DW, Lee SH** (2004) A positive role for the Ku complex in DNA replication following strand break damage in mammals. *J Biol Chem* 279:6046-6055.
- Pasleau F, Grootclaes M, Gol-Winkler R** (1993) Expression of the c-erbB2 gene in the BT474 human mammary tumor cell line: measurement of c-erbB2 mRNA half-life. *Oncogene* 8:849-854.
- Pellikainen J, Kataja V, Ropponen K, Kellokoski J, Pietilainen T, Bohm J, Eskelinen M, Kosma VM** (2002) Reduced nuclear expression of transcription factor AP-2 associates with aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res* 8:3487-3495.
- Pellikainen J, Naukkarinen A, Ropponen K, Rummukainen J, Kataja V, Kellokoski J, Eskelinen M, Kosma VM** (2004) Expression of HER2 and its association with AP-2 in breast cancer. *Eur J Cancer* 40:1485-1495.
- Pellikainen JM, Kosma VM** (2007) Activator protein-2 in carcinogenesis with a special reference to breast cancer--a mini review. *Int J Cancer* 120:2061-2067.
- Pena P, Reutens AT, Albanese C, D'Amico M, Watanabe G, Donner A, Shu IW, Williams T, Pestell RG** (1999) Activator protein-2 mediates transcriptional activation of the CYP11A1 gene by interaction with Sp1 rather than binding to DNA. *Mol Endocrinol* 13:1402-1416.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D** (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-752.
- Perreard L, et al.** (2006) Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Breast Cancer Res* 8:R23.
- Piccart-Gebhart MJ, et al.** (2005) Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1659-1672.
- Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L, Gorman CM, Parker MG, Sliwkowski MX, Slamon DJ** (1995) HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 10:2435-2446.
- Popa C, Dahler AL, Serewko-Auret MM, Wong CF, Smith L, Barnes LM, Strutton GM, Saunders NA** (2004) AP-2 transcription factor family member expression, activity, and regulation in human epidermal keratinocytes in vitro. *Differentiation* 72:185-197.
- Pucci S, Mazzarelli P, Rabitti C, Gai M, Gallucci M, Flammia G, Alcini A, Altomare V, Fazio VM** (2001) Tumor specific modulation of KU70/80 DNA binding activity in breast and bladder human tumor biopsies. *Oncogene* 20:739-747.
- Rahimov F, et al.** (2008) Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet* 40:1341-1347.

- Raich N, Clegg CH, Grofti J, Romeo PH, Stamatoyannopoulos G** (1995) GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human epsilon-globin gene. *EMBO J* 14:801-809.
- Rampakakis E, Di PD, Zannis-Hadjopoulos M** (2008) Ku is involved in cell growth, DNA replication and G1-S transition. *J Cell Sci* 121:590-600.
- Reeves WH** (1985) Use of monoclonal antibodies for the characterization of novel DNA-binding proteins recognized by human autoimmune sera. *J Exp Med* 161:18-39.
- Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP** (1998) ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 34:791-808.
- Rody A, Karn T, Ruckhaeberle E, Hanker L, Gaetje R, Holtrich U, Kaufmann M** (2008) Differentially expressed genes of reprogrammed human pluripotent stem cells in breast cancer. *Eur J Cancer* 44:1789-1792.
- Roh H, Pippin J, Drebin JA** (2000) Down-regulation of HER2/neu expression induces apoptosis in human cancer cells that overexpress HER2/neu. *Cancer Res* 60:560-565.
- Romond EH, et al.** (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1673-1684.
- Ross JS, Fletcher JA** (1998) The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 3:237-252.
- Samper E, Goytisolo FA, Slijepcevic P, van Buul PP, Blasco MA** (2000) Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep* 1:244-252.
- Scott GK, Chang CH, Erny KM, Xu F, Fredericks WJ, Rauscher FJ, III, Thor AD, Benz CC** (2000) Ets regulation of the erbB2 promoter. *Oncogene* 19:6490-6502.
- Scott GK, Daniel JC, Xiong X, Maki RA, Kabat D, Benz CC** (1994) Binding of an ETS-related protein within the DNase I hypersensitive site of the HER2/neu promoter in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 269:19848-19858.
- Scott GK, Marden C, Xu F, Kirk L, Benz CC** (2002) Transcriptional repression of ErbB2 by histone deacetylase inhibitors detected by a genomically integrated ErbB2 promoter-reporting cell screen. *Mol Cancer Ther* 1:385-392.
- Scott GK, Marx C, Berger CE, Saunders LR, Verdin E, Schafer S, Jung M, Benz CC** (2008) Destabilization of ERBB2 transcripts by targeting 3' untranslated region messenger RNA associated HuR and histone deacetylase-6. *Mol Cancer Res* 6:1250-1258.
- Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, Murphy M, Stewart SJ, Keefe D** (2002) Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 20:1215-1221.
- Sharma BK, Ray A, Kaur S, Gupta S** (1999) Immunohistochemical co-expression of c-erbB-2/Neu oncoprotein, altered tumour suppressor (p53) protein, EGF-R and EMA in histological subtypes of infiltrating duct carcinoma of the breast. *Indian J Exp Biol* 37:223-227.
- Sibani S, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M** (2005b) Decreased origin usage and initiation of DNA replication in haploinsufficient HCT116 Ku80^{+/-} cells. *J Cell Sci* 118:3247-3261.
- Sibani S, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M** (2005a) Ku80 binds to human replication origins prior to the assembly of the ORC complex. *Biochemistry* 44:7885-7896.
- Skinner A, Hurst HC** (1993) Transcriptional regulation of the c-erbB-3 gene in human breast carcinoma cell lines. *Oncogene* 8:3393-3401.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL** (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182.

- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, .** (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-712.
- Slijepcevic P** (2006) The role of DNA damage response proteins at telomeres--an "integrative" model. *DNA Repair (Amst)* 5:1299-1306.
- Someya M, Sakata K, Matsumoto Y, Satoh M, Narimatsu H, Hareyama M** (2007) Immunohistochemical analysis of Ku70/86 expression of breast cancer tissues. *Oncol Rep* 18:1483-1487.
- Song K, Jung Y, Jung D, Lee I** (2001) Human Ku70 interacts with heterochromatin protein 1alpha. *J Biol Chem* 276:8321-8327.
- Sorlie T, Perou CM, Fan C, Geisler S, Aas T, Nobel A, Anker G, Akslen LA, Botstein D, Borresen-Dale AL, Lonning PE** (2006) Gene expression profiles do not consistently predict the clinical treatment response in locally advanced breast cancer. *Mol Cancer Ther* 5:2914-2918.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein LP, Borresen-Dale AL** (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10869-10874.
- Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET** (2003) Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10393-10398.
- Stern DF** (2008) ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13:215-223.
- Sternlicht MD, Sunnarborg SW** (2008) The ADAM17-amphiregulin-EGFR axis in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13:181-194.
- Stoica GE, Franke TF, Moroni M, Mueller S, Morgan E, Iann MC, Winder AD, Reiter R, Wellstein A, Martin MB, Stoica A** (2003) Effect of estradiol on estrogen receptor-alpha gene expression and activity can be modulated by the ErbB2/PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 22:7998-8011.
- Sucharov CC, Helmke SM, Langer SJ, Perryman MB, Bristow M, Leinwand L** (2004) The Ku protein complex interacts with YY1, is up-regulated in human heart failure, and represses alpha myosin heavy-chain gene expression. *Mol Cell Biol* 24:8705-8715.
- Sui G, Affar eB, Shi Y, Brignone C, Wall NR, Yin P, Donohoe M, Luke MP, Calvo D, Grossman SR, Shi Y** (2004) Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell* 117:859-872.
- Sun JM, Chen HY, Davie JR** (2007) Differential distribution of unmodified and phosphorylated histone deacetylase 2 in chromatin. *J Biol Chem* 282:33227-33236.
- Tan DS, Marchio C, Reis-Filho JS** (2008) Hereditary breast cancer: from molecular pathology to tailored therapies. *J Clin Pathol* 61:1073-1082.
- Tanaka Y, Imamura J, Kanai F, Ichimura T, Isobe T, Koike M, Kudo Y, Tateishi K, Ikenoue T, Ijichi H, Yamaji Y, Yoshida H, Kawabe T, Omata M** (2007) Runx3 interacts with DNA repair protein Ku70. *Exp Cell Res* 313:3251-3260.
- Tarn WY, Hsu CH, Huang KT, Chen HR, Kao HY, Lee KR, Cheng SC** (1994) Functional association of essential splicing factor(s) with PRP19 in a protein complex. *EMBO J* 13:2421-2431.
- Thomas MJ, Seto E** (1999) Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* 236:197-208.
- Thompson D, Easton D** (2004) The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9:221-236.

- Tong WM, Cortes U, Hande MP, Ohgaki H, Cavalli LR, Lansdorp PM, Haddad BR, Wang ZQ** (2002) Synergistic role of Ku80 and poly(ADP-ribose) polymerase in suppressing chromosomal aberrations and liver cancer formation. *Cancer Res* 62:6990-6996.
- Turner BC, Zhang J, Gumbs AA, Maher MG, Kaplan L, Carter D, Glazer PM, Hurst HC, Haffty BG, Williams T** (1998) Expression of AP-2 transcription factors in human breast cancer correlates with the regulation of multiple growth factor signalling pathways. *Cancer Res* 58:5466-72.
- Tuteja N, Tuteja R, Ochem A, Taneja P, Huang NW, Simoncsits A, Susic S, Rahman K, Marusic L, Chen J, .** (1994) Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J* 13:4991-5001.
- Vernimmen D, Begon D, Salvador C, Gofflot S, Grootelaes M, Winkler R** (2003a) Identification of HTF (HER2 transcription factor) as an AP-2 (activator protein-2) transcription factor and contribution of the HTF binding site to ERBB2 gene overexpression. *Biochem J* 370:323-9.
- Vernimmen D, Gueders M, Pisvin S, Delvenne P, Winkler R** (2003b) Different mechanisms are implicated in ERBB2 gene overexpression in breast and in other cancers. *Br J Cancer* 89:899-906.
- Vervoorts J, Luscher-Firzlaff JM, Rottmann S, Lilischkis R, Walsemann G, Dohmann K, Austen M, Luscher B** (2003) Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep* 4:484-490.
- Wajapeyee N, Britto R, Ravishankar HM, Somasundaram K** (2006) Apoptosis induction by activator protein 2alpha involves transcriptional repression of Bcl-2. *J Biol Chem* 281:16207-16219.
- Wajapeyee N, Raut CG, Somasundaram K** (2005) Activator protein 2alpha status determines the chemosensitivity of cancer cells: implications in cancer chemotherapy. *Cancer Res* 65:8628-8634.
- Wajapeyee N, Somasundaram K** (2003) Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2alpha (AP-2alpha) and the role of p53 and p21WAF1/CIP1 in AP-2alpha-mediated growth inhibition. *J Biol Chem* 278:52093-52101.
- Wang H, Fang R, Cho JY, Libermann TA, Oettgen P** (2004) Positive and negative modulation of the transcriptional activity of the ETS factor ESE-1 through interaction with p300, CREB-binding protein, and Ku 70/86. *J Biol Chem* 279:25241-25250.
- White MJ, Fristensky BW, Thompson WF** (1991) Concatemer chain reaction: a Taq DNA polymerase-mediated mechanism for generating long tandemly repetitive DNA sequences. *Anal Biochem* 199:184-190.
- Wilchek M, Bayer EA** (1990) Introduction to avidin-biotin technology. *Methods Enzymol* 184:5-13.
- Winger Q, Huang J, Auman HJ, Lewandoski M, Williams T** (2006) Analysis of transcription factor AP-2 expression and function during mouse preimplantation development. *Biol Reprod* 75:324-333.
- Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM** (2003) Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 200:290-297.
- Woodard RL, Lee KJ, Huang J, Dynan WS** (2001) Distinct roles for Ku protein in transcriptional reinitiation and DNA repair. *J Biol Chem* 276:15423-15433.
- Woodfield GW, Horan AD, Chen Y, Weigel RJ** (2007) TFAP2C controls hormone response in breast cancer cells through multiple pathways of estrogen signaling. *Cancer Res* 67:8439-8443.
- Wu F, Lee AS** (2001) YY1 as a regulator of replication-dependent hamster histone H3.2 promoter and an interactive partner of AP-2. *J Biol Chem* 276:28-34.
- Wu J, Lee C, Yokom D, Jiang H, Cheang MC, Yorida E, Turbin D, Berquin IM, Mertens PR, Iftner T, Gilks CB, Dunn SE** (2006) Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2. *Cancer Res* 66:4872-4879.

- Xenaki G, Ontikatzte T, Rajendran R, Stratford IJ, Dive C, Krstic-Demonacos M, Demonacos C** (2008) PCAF is an HIF-1alpha cofactor that regulates p53 transcriptional activity in hypoxia. *Oncogene* 27:5785-5796.
- Xia WY, Lien HC, Wang SC, Pan Y, Sahin A, Kuo YH, Chang KJ, Zhou X, Wang H, Yu Z, Hortobagyi G, Shi DR, Hung MC** (2006b) Expression of PEA3 and lack of correlation between PEA3 and HER-2/neu expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 98:295-301.
- Xia WY, Lien HC, Wang SC, Pan Y, Sahin A, Kuo YH, Chang KJ, Zhou X, Wang H, Yu Z, Hortobagyi G, Shi DR, Hung MC** (2006a) Expression of PEA3 and lack of correlation between PEA3 and HER-2/neu expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 98:295-301.
- Xing X, Wang SC, Xia W, Zou Y, Shao R, Kwong KY, Yu Z, Zhang S, Miller S, Huang L, Hung MC** (2000) The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis. *Nat Med* 6:189-195.
- Yaneva M, Arnett FC** (1989) Antibodies against Ku protein in sera from patients with autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 76:366-372.
- Yang JW, Kim MR, Kim HG, Kim SK, Jeong HG, Kang KW** (2008) Differential regulation of ErbB2 expression by cAMP-dependent protein kinase in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Arch Pharm Res* 31:350-356.
- Yao YL, Yang WM, Seto E** (2001) Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Mol Cell Biol* 21:5979-5991.
- Yarden Y** (2001) Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 61 Suppl 2:1-13.
- Yeh ET, Tong AT, Lenihan DJ, Yusuf SW, Swafford J, Champion C, Durand JB, Gibbs H, Zafarmand AA, Ewer MS** (2004) Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management. *Circulation* 109:3122-3131.
- Yu D, Hung MC** (2000) Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* 19:6115-6121.
- Zhang J, Brewer S, Huang J, Williams T** (2003) Overexpression of transcription factor AP-2alpha suppresses mammary gland growth and morphogenesis. *Dev Biol* 256:127-145.
- Zhong L, Wang Y, Kannan P, Tainsky MA** (2003) Functional characterization of the interacting domains of the positive coactivator PC4 with the transcription factor AP-2alpha. *Gene* 320:155-164.
- Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC** (2001a) Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 3:245-252.
- Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC** (2001b) HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3:973-982.
- Zhu CH, Domann FE** (2002) Dominant negative interference of transcription factor AP-2 causes inhibition of ErbB-3 expression and suppresses malignant cell growth. *Breast Cancer Res Treat* 71:47-57.
- Zsebik B, Citri A, Isola J, Yarden Y, Szollosi J, Vereb G** (2006) Hsp90 inhibitor 17-AAG reduces ErbB2 levels and inhibits proliferation of the trastuzumab resistant breast tumor cell line JIMT-1. *Immunol Lett* 104:146-155.

Annexes Bibliographiques

- **Article 1** : Allouche A, Nolens G, Tancredi A et al. The combined immunodetection of AP-2 alpha and YY1 transcription factors is associated with ERBB2 gene overexpression in primary breast tumours. Breast Cancer Research, 2008; 10(1):R9
- **Article 2** : Nolens G, Pignon JC et al. Ku proteins are involved with AP-2 α and AP-2 γ in the ERBB2 overexpression in breast cancer cell lines. Breast Cancer Research. Submitted

Research article

Open Access

The combined immunodetection of AP-2 α and YY1 transcription factors is associated with *ERBB2* gene overexpression in primary breast tumors

Abdelkader Allouche¹, Gregory Nolens², Annalisa Tancredi³, Laurence Delacroix², Julie Mardaga¹, Viviana Fridman¹, Rosita Winkler², Jacques Boniver¹, Philippe Delvenne¹ and Dominique Y Begon^{1,2}

¹Department of Pathology, GIGA-Research, CRCE, University of Liege and CHU of Liege, B23, Avenue de l'Hopital, 3, 4000 Liege, Belgium

²Molecular Oncology Laboratory, GIGA-Research, CRCE, University of Liege, B34, Avenue de l'Hopital, 1, 4000 Liege, Belgium

³Department of Public Health, Epidemiology and Health Economics, University of Liege, B23, Avenue de l'Hopital, 3, 4000 Liege, Belgium

Corresponding author: Dominique Y Begon, D.Begon@ulg.ac.be

Received: 18 Jul 2007 Revisions requested: 3 Sep 2007 Revisions received: 17 Dec 2007 Accepted: 24 Jan 2008 Published: 24 Jan 2008

Breast Cancer Research 2008, **10**:R9 (doi:10.1186/bcr1851)

This article is online at: <http://breast-cancer-research.com/content/10/1/R9>

© 2008 Allouche *et al.*; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Introduction Overexpression of the *ERBB2* oncogene is observed in about 20% of human breast tumors and is the consequence of increased transcription rates frequently associated with gene amplification. Several studies have shown a link between activator protein 2 (AP-2) transcription factors and *ERBB2* gene expression in breast cancer cell lines. Moreover, the Yin Yang 1 (YY1) transcription factor has been shown to stimulate AP-2 transcriptional activity on the *ERBB2* promoter *in vitro*. In this report, we examined the relationships between *ERBB2*, AP-2 α , and YY1 both in breast cancer tissue specimens and in a mammary cancer cell line.

Methods *ERBB2*, AP-2 α , and YY1 protein levels were analyzed by immunohistochemistry in a panel of 55 primary breast tumors. *ERBB2* gene amplification status was determined by fluorescent *in situ* hybridization. Correlations were evaluated by a χ^2 test at a p value of less than 0.05. The functional role of AP-2 α and YY1 on *ERBB2* gene expression was analyzed by small interfering RNA (siRNA) transfection in the BT-474 mammary cancer cell line followed by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blotting.

Results We observed a statistically significant correlation between *ERBB2* and AP-2 α levels in the tumors ($p < 0.01$). Moreover, associations were found between *ERBB2* protein level and the combined high expression of AP-2 α and YY1 ($p < 0.02$) as well as between the expression of AP-2 α and YY1 ($p < 0.001$). Furthermore, the levels of both AP-2 α and YY1 proteins were inversely correlated to *ERBB2* gene amplification status in the tumors ($p < 0.01$). Transfection of siRNAs targeting AP-2 α and AP-2 γ mRNAs in the BT-474 breast cancer cell line repressed the expression of the endogenous *ERBB2* gene at both the mRNA and protein levels. Moreover, the additional transfection of an siRNA directed against the YY1 transcript further reduced the *ERBB2* protein level, suggesting that AP-2 and YY1 transcription factors cooperate to stimulate the transcription of the *ERBB2* gene.

Conclusion This study highlights the role of both AP-2 α and YY1 transcription factors in *ERBB2* oncogene overexpression in breast tumors. Our results also suggest that high *ERBB2* expression may result either from gene amplification or from increased transcription factor levels.

Introduction

The *ERBB2* oncogene (also known as *HER2*) belongs to the epidermal growth factor receptor gene family and encodes a 185-kDa receptor tyrosine kinase [1]. The *ERBB2* gene is

overexpressed in several human tumors, mostly in breast and ovary carcinomas, where the overexpression is a marker of poor prognosis [2]. Moreover, *ERBB2* gene overexpression is able to transform cells in culture and to induce mammary tumors in transgenic mice [3]. *ERBB2* gene-overexpressing tumors are more aggressive due to increased invasive,

AP-2 = activator protein 2; ASCO = American Society of Clinical Oncology; CAP = College of American Pathologists; ChIP = chromatin immunoprecipitation; FISH = fluorescent *in situ* hybridization; IHC = immunohistochemistry; RT-PCR = reverse transcription-polymerase chain reaction; siRNA = small interfering RNA; YY1 = Yin Yang 1.

metastatic, and angiogenic phenotypes [4]. Therefore, elucidating the mechanisms leading to *ERBB2* gene overexpression is an important step in understanding the pathogenesis of a particularly aggressive subset of breast tumors.

Several laboratories have undertaken the study of the mechanisms leading to the accumulation of high levels of *ERBB2* transcript and corresponding protein in breast cancer cells. First, the overexpression of the *ERBB2* gene has been shown to be partly explained by gene amplification [5]. However, in breast cancer cell lines, regardless of whether the gene is amplified, there is a higher *ERBB2* mRNA level per gene copy in overexpressing tumor cells compared with cells with a low *ERBB2* expression [6,7]. In addition, we and others have demonstrated that *ERBB2* overexpression is due to increased transcription rates and not to the stabilization of the mRNA [6,8]. Further experiments, therefore, were needed to identify the activating sequences in the *ERBB2* promoter, and the molecules that bind them, such as the activator protein 2 (AP-2) transcription factors.

The AP-2 family currently includes five related 50-kDa proteins: AP-2 α , AP-2 β , AP-2 γ [9], AP-2 δ [10], and AP-2 ϵ [11]. Several *in vitro* and *in vivo* sets of data have demonstrated a connection between AP-2 transcription factors and *ERBB2* expression. First, four AP-2 binding sequences were identified in the *ERBB2* promoter [12-15]. Then, we reported the *in vivo* binding of AP-2 proteins to these sites on the endogenous *ERBB2* promoter by chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments [13,16]. Moreover, *in vitro* results of transfection experiments have shown that AP-2 factors contribute significantly to the activity of the *ERBB2* promoter [9,12-16]. In particular, expression of a dominant negative AP-2 protein in mammary cancer cells was shown to result in the inhibition of the transcription from a reporter vector bearing a 6-kb fragment of the *ERBB2* promoter [13]. Finally, AP-2 transcription factors have been shown to be highly expressed in breast cancer cell lines overexpressing *ERBB2* [9,14].

AP-2 factors modulate transcription through interactions with several nuclear factors (for example, PARP [17], PC4 [18], CITED2 [19], CITED4 [20], and p300 [21]). Recently, we identified Yin Yang 1 (YY1) as a new cofactor stimulating AP-2 transcriptional activity [16]. YY1 is a multifunctional transcription factor that modulates the expression of a wide variety of genes [22]. It can act as a transcriptional activator or repressor, depending on the context of its binding site within a particular promoter [23] and on other cell type-specific factors [24]. A wide variety of proteins are able to bind to YY1, indicating that protein-protein interactions are important for its activity. Among these proteins, YY1 interacts with AP-2 α through a domain highly conserved in AP-2 γ [25]. Moreover, YY1 enhances AP-2 α , AP-2 β , and AP-2 γ transcriptional activity on the *ERBB2* promoter in breast cancer cells [16]. ChIP experiments also showed that the YY1 protein is recruited on

the endogenous *ERBB2* promoter only when a member of the AP-2 protein family is present [16].

The aim of this study was to characterize better the relationship between the overexpression of *ERBB2* oncogene and AP-2 α transcription factor in primary breast tumors and to determine whether the expression level of the YY1 cofactor could play a role in the association between the expression of AP-2 α and *ERBB2*. In this study, we first demonstrated that the expression of these proteins is positively correlated in breast cancer tissues. These results were further associated with *ERBB2* gene amplification status and then corroborated by a functional analysis using small interfering RNA (siRNA) transfected in a mammary cancer cell line. Altogether, our data indicate that *ERBB2* gene amplification or increased levels of transcription factors may lead to a pathologically high level of *ERBB2* transcript and protein in breast cancer.

Materials and methods

Tissue samples

A series of 55 primary tumors from breast cancer patients diagnosed between 2002 and 2004 at the University Hospital of Liege, Belgium, was analyzed. The mean age of the patients was 61.9 years and the median was 59.0 years (range: 38.0 to 88.0 years). The clinicopathological data of the patients are summarized in Table 1. The tumor samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. The histological diagnosis was confirmed by reviewing the original sections of the primary tumors. All of the tumors were simultaneously evaluated for histological type and grade by senior pathologists. The most representative blocks were selected and cut into new 5- μ m-thick sections for immunohistochemical analyses. The study was approved by the local ethics committee at the Liege University Hospital.

Immunohistochemistry

Sections of breast biopsy specimens underwent immunoperoxidase staining using antibodies directed against AP-2 α (1:100) (#39001; Active Motif, Carlsbad, CA, USA), against YY1 (1:50) (H-10; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), or against *ERBB2* (1:250) (A0485; Dako A/S, Glostrup, Denmark). The sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in methanol. Endogenous peroxidases were blocked by 5% H₂O₂ treatment. For better antigen retrieval, the samples were boiled either in a microwave oven for 3 \times 5 minutes in citrate buffer (AP-2 α and YY1) or in a water bath at 99°C in EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) buffer for 40 minutes (*ERBB2*). Samples were then washed with phosphate-buffered saline-Tween (pH 7.2; 1.5%) and incubated with the primary antibody at room temperature for 30 minutes (AP-2 α and YY1) or 1 hour (*ERBB2*). After washings, the revelation was performed with the use of appropriate secondary antibodies and the LSAB2 system (AP-2 α and YY1; Dako A/S) or the EnVision kit (*ERBB2*; Dako A/S) according to the supplier's recommendations. Immunoreactiv-

Table 1**Clinicopathological data of the patients and their relationships with ERBB2 expression**

Characteristic	n	(Percentage)	ERBB2 expression (percentage)				P value
			(0/1+/2+)		(3+)		
Number of patients	55	(100)	40	(73)	15	(27)	
Tumor size							NS
T ₁	20	(36)	16	(80)	4	(20)	
T ₂	29	(53)	20	(69)	9	(31)	
T ₃	6	(11)	4	(67)	2	(33)	
Lymph node status							NS
Negative	33	(60)	24	(73)	9	(27)	
Positive	22	(40)	16	(73)	6	(27)	
Grade							
Not determined	3	(5)	/				
I	12	(22)	29	(83)	6	(17)	0.060
II	23	(42)					
III	17	(31)	10	(59)	7	(41)	
Histological type							NS
Ductal	40	(73)	28	(70)	12	(30)	
Lobular	7	(13)	5	(71)	2	(29)	
Other	8	(14)	7	(87)	1	(13)	
ER status							0.035
Positive	42	(76)	34	(81)	8	(19)	
Negative	13	(24)	6	(46)	7	(54)	
PR status							0.022
Positive	32	(58)	27	(84)	5	(16)	
Negative	23	(42)	13	(57)	10	(43)	
Menopausal status							NS
Premenopausal	9	(16)	8	(89)	1	(11)	
Postmenopausal	46	(84)	32	(70)	14	(30)	
Ki67							0.018
Low	29	(53)	25	(86)	4	(14)	
High	26	(47)	15	(58)	11	(42)	

Table 1 (Continued)

Clinicopathological data of the patients and their relationships with ERBB2 expression						
p53						0.052
Low	46	(84)	36	(78)	10	(22)
High	9	(16)	4	(44)	5	(56)

ER, estrogen receptor; grade, Elston-Ellis modification of Bloom grade; NS, not significant; PR, progesterone receptor.

ity was visualized by a treatment with diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and the slides were counterstained with Mayer's hematoxylin.

For statistical analyses of AP-2 α and YY1 immunoreactivity, the percentage distribution of stained tumor cell nuclei in the sample was divided into low (<80%) or high (\geq 80%) expression groups according to Pellikainen and colleagues [26]. ERBB2 scoring was performed according to the recently proposed guidelines from the American Society of Clinical Oncology (ASCO) and the College of American Pathologists (CAP) [27]. Pathological ERBB2 overexpression (3+) was detected in 27% of tumors. There was a significant statistical association between ERBB2 overexpression and Ki67 immunostaining, and an inverse relationship was demonstrated with estrogen receptor and progesterone receptor status (Table 1). Furthermore, a trend toward a direct link between ERBB2 overexpression and both p53 expression and histological grade III was observed.

Fluorescent *in situ* hybridization

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was performed with the INFORM HER-2/neu probe (approved by the U.S. Food and Drug Administration) and the BenchMark XT automated system (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) according to the supplier's recommendations. A minimum of 50 cell nuclei were counted, and gene amplification was considered as present when an average of more than six ERBB2 gene copies per cell was observed [27].

Statistics

The statistical analyses were carried out with a χ^2 test for categorical variables at a *p* value of less than 0.05 for significance by using Statistica software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Cell line

The BT-474 human mammary carcinoma cells were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured in the RPMI 1640 medium supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum, 2 mM glutamine, and 100 μ g/mL penicillin/streptomycin (all from Cambrex Bio Science Verviers S.p.r.l., Verviers, Belgium).

Small interfering RNAs

Cells were transfected (a) on days 0 and 2 by 150 nM siRNA directed against AP-2 α and/or AP-2 γ transcripts as indicated or (b) on day 0 by 30 nM siRNA against YY1, or 100 nM com-

bined siRNAs against AP-2 α and AP-2 γ transcripts, or both as indicated. As control, cells were transfected by either an siRNA against luciferase mRNA [28] or a negative control siRNA OR-0030-neg05 from Eurogentec S.A. (Seraing, Belgium). Total RNA was extracted after 2 to 4 days of treatment. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for AP-2 α , AP-2 γ , ERBB2, and β 2-microglobulin (standard gene) transcripts were performed on 1 μ g of total extracted RNA. The standardized transcript levels were reported to the values obtained in cells transfected with the control siRNA. The RT-PCR analysis was performed on an ABI Prism 7000 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using standard protocol. Western blot analysis was performed on proteins extracted after 1 or 3 days of treatment as indicated. The antibodies used for Western blot were 3B5 for AP-2 α , 6E4/4 for AP-2 γ , H-10 for YY1, and C-19 for Ku70 (all purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and a rabbit antibody for ERBB2 (06-562; Upstate, now part of Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). The sequences of the siRNAs and the RT-PCR primers (all purchased from Eurogentec S.A.) are presented in Table 2.

Results

Combined high AP-2 α and YY1 levels are associated with expression of ERBB2 in breast cancer tissue samples

We first detected levels of ERBB2, AP-2 α , and YY1 proteins by immunohistochemistry (IHC) in tumor specimens from 55 cases of breast carcinomas (Tables 1 and 3). Representative examples of the staining patterns obtained for ERBB2 receptor and the transcription factors AP-2 α and YY1 are shown in Figure 1. The AP-2 α and YY1 proteins were detected mainly in the nuclear compartment, while cytoplasmic staining was rare and weak (Figure 1a–d). We scored the AP-2 α and YY1 levels as low or high regarding the percentage of stained nuclei according to Pellikainen and colleagues [26] (Figure 1). High AP-2 α and YY1 protein levels were seen in 42% and 45% of breast carcinomas, respectively. For ERBB2, we considered only membranous staining (Figure 1e–h). Scoring was carried out according to the ASCO/CAP guidelines [27].

We then analyzed the correlations between the levels of ERBB2, AP-2 α , and YY1 proteins in the tumors. Our statistical analyses showed that ERBB2 expression was significantly associated with a high AP-2 α transcription factor level (*p* = 0.003) (Table 3). Accordingly, 83% of the tumors with high AP-2 α level had a 2+ or 3+ IHC score for ERBB2 protein and

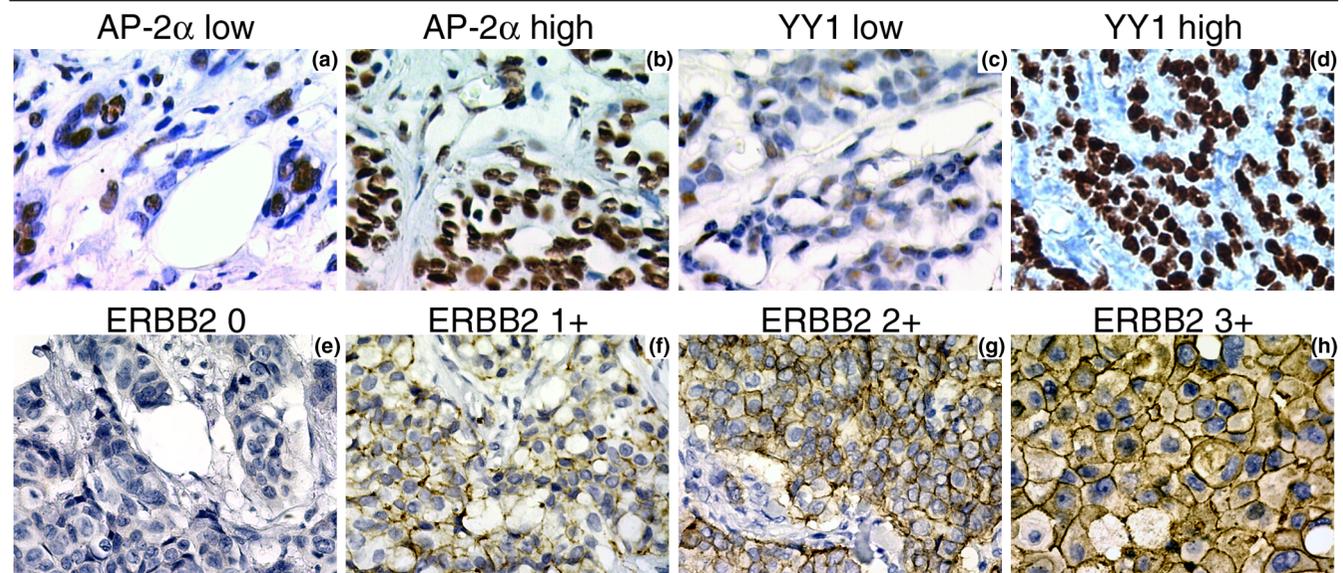
Table 2**Sequences of small interfering RNAs and primers for reverse transcription-polymerase chain reaction**

	Sequence 5'-3'	Location
siRNAs		
siAP-2 α ss	CCGAAUUUCCUGCCAAAGCdTdT	
siAP-2 α as	GCUUUGGCAGGAAAUUCGGdTdT	
siAP-2 γ ss	UUAUUUUUUCUGCCACUGGdTdT	
siAP-2 γ as	CCAGUGGCAGAAUUUUUAdTdT	
siYY1 ss	GAACUCACCUCCUGAUUAdTdT	
siYY1 as	AUAAUCAGGAGGUGAGUUCdTdT	
RT-PCR primers		
AP-2 α forward	AGCTGAATTCTCAACCGACAAC	1,013 (exon 5)
AP-2 α reverse	TAGCCAGGAGCATGTTTTTCTT	1,083 (exon 6)
AP-2 γ forward	CAGAAGAGCCAAATCGAAAAATG	1,041 (exons 5–6)
AP-2 γ reverse	ATTCAACCCAATCTTGCCAACTT	1,107 (exon 6)
<i>ERBB2</i> forward	CTGAAGTGGTGTATGCAGATTGC	2,617 (exon 20)
<i>ERBB2</i> reverse	TTCCGAGCGGCCAAGTC	2,699 (exon 21)

as, antisense strand; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; siRNA, small interfering RNA; ss, sense strand.

only 17% had a low *ERBB2* expression (0 to 1+). On the other hand, 83% of the tumors with *ERBB2* low expression had a low level of AP-2 α protein. In contrast, no association between *ERBB2* and YY1 expression was observed (Table 3). How-

ever, there was a significant association of *ERBB2* protein level with combined overexpression of AP-2 α and YY1 transcription factors ($p \leq 0.02$) (Table 3). Indeed, among the 19 cases presenting high levels of both AP-2 α and YY1, 84%

Figure 1

Detection of activator protein 2 alpha (AP-2 α), Yin Yang 1 (YY1), and *ERBB2* by immunohistochemistry in breast tumors. (a) Case with low immunoreactivity for AP-2 α . (b) Tumor sample expressing high level of AP-2 α protein in more than 80% of the nuclei. (c) Tumor with low immunoreactivity for YY1. (d) Case expressing high level of YY1 protein in more than 80% of the nuclei. (e) Case with no *ERBB2* membrane staining, scored as IHC 0. (f) Tumor with partial weak membrane staining, scored as IHC 1+. (g) Case with *ERBB2* score of 2+. (h) Tumor with thick circumferential *ERBB2* membrane staining, scored as IHC 3+.

Table 3**Associations between ERBB2 and AP-2 α and/or YY1 levels determined by immunohistochemistry**

	<i>n</i>	ERBB2 expression (percentage)						<i>P</i> value
		0/1+	2+	3+				
AP-2 α expression								0.003
Low	32	19	(59)	5	(16)	8	(25)	
High	23	4	(17)	12	(52)	7	(31)	
YY1 expression								0.318
Low	30	15	(50)	7	(23)	8	(27)	
High	25	8	(32)	10	(40)	7	(28)	
Combination								0.016
AP-2 α lo/YY1 lo	26	14	(54)	4	(15)	8	(31)	
AP-2 α lo/YY1 hi or AP-2 α hi/YY1 lo	10	6	(60)	4	(40)	0	(0)	
AP-2 α hi/YY1 hi	19	3	(16)	9	(47)	7	(37)	

AP-2 α , activator protein 2 alpha; hi, high expression; lo, low expression; YY1, Yin Yang 1.

had an ERBB2 2+ or 3+ score (Table 3).

Levels of both AP-2 α and YY1 proteins are inversely associated with ERBB2 amplification status in primary breast cancer samples

FISH demonstrated *ERBB2* gene amplification in 11 cases of breast cancer. All of these had an ERBB2 3+ score in IHC. Moreover, out of the 15 ERBB2 3+ cases, 11 were FISH-positive, 2 showed no *ERBB2* amplification, 1 was borderline with an average of 4 copies of *ERBB2* gene per cell, and 1 was undetermined due to lack of material for FISH testing. Interestingly, the 2 cases of ERBB2 3+ immunostaining without gene amplification and the borderline case showed high AP-2 α and YY1 levels. On the other hand, all the ERBB2 3+ cases with low levels of both AP-2 α and YY1 showed *ERBB2* gene amplification. Furthermore, when considering the entire ERBB2 expressing group (1+, 2+, 3+), we observed a significant inverse correlation between *ERBB2* FISH status on one hand and AP-2 α and YY1 levels on the other hand ($p = 0.017$ and 0.029 , respectively) (Table 4). In particular, 80% of the cases with high levels of both AP-2 α and YY1 proteins did not present *ERBB2* gene amplification ($p = 0.006$) (Table 4). These results suggest that when the *ERBB2* gene is not amplified, the *ERBB2* expression may rely partially on AP-2 α and YY1 transcription factor levels. Accordingly, considering only the FISH-negative cases ($n = 34$), the correlation between ERBB2 and AP-2 α levels was higher than in the whole group ($r = 0.67$, $p < 0.001$ compared with $r = 0.31$, $p = 0.022$ in the whole group). Interestingly, the percentage of ERBB2 2+3+/AP-2 α -low cases decreased (12% in the FISH-negative group compared with 24% in the entire group) (Table 5). Similarly, the percentage of ERBB2-positive/AP-2 α -low/

YY1-low cases diminished (from 22% in the whole group to 9% in the FISH-negative group) (Table 5). These results indicate that high *ERBB2* expression may result either from gene amplification or from increased transcription factor levels.

Inhibition of AP-2 and YY1 downregulates ERBB2 expression *in vitro*

After these correlation results in breast cancer specimens, we sought to study these relationships on the functional side. Although the AP-2 family is known to activate the *ERBB2* promoter in reporter vectors, the effect of these transcription factors on the expression of the endogenous *ERBB2* gene has not been clearly established. To find out whether AP-2 factors do contribute functionally to *ERBB2* overexpression *in vivo*, we measured ERBB2 mRNA levels in breast cancer cells in which the expressions of AP-2 α and AP-2 γ were downregulated by siRNAs. BT-474 breast cancer cells overexpressing *ERBB2*, both through amplification and enhanced transcription, were transfected with AP-2 α and AP-2 γ siRNAs, both independently and in combination for several days. Two different siRNAs against AP-2 α and three distinct siRNAs against AP-2 γ were first tested (data not shown). The best one for each target, as tested by Western blotting, was further used in the study. First, AP-2 α and AP-2 γ transcript levels were quantified by real-time RT-PCR in the cells transfected by the AP-2 siRNAs and reported to transfection of a control siRNA. Transfection of AP-2 α siRNA alone inhibited AP-2 α expression (Figure 2a) but did not modify the AP-2 γ transcript level (Figure 2b). Comparable results were obtained in cells transfected with AP-2 γ siRNA alone (Figure 2a,b). Moreover, transfection of both AP-2 α and AP-2 γ siRNAs induced a decrease in both mRNA levels (Figure 2a,b). Similar results were obtained at the

Table 4**Inverse associations between FISH results and AP-2 α and/or YY1 levels in ERBB2 expressing group (1+, 2+, 3+)**

	<i>n</i>	ERBB2 FISH (percentage)			<i>P</i> value
		Negative		Positive	
AP-2 α expression					0.017
Low	12	4	(33)	8	(67)
High	18	15	(83)	3	(17)
YY1 expression					0.029
Low	14	6	(43)	8	(57)
High	16	13	(81)	3	(19)
Combination					0.006
AP-2 α lo/YY1 lo	11	3	(27)	8	(73)
AP-2 α lo/YY1 hi or AP-2 α hi/YY1 lo	4	4	(100)	0	(0)
AP-2 α hi/YY1 hi	15	12	(80)	3	(20)

AP-2 α , activator protein 2 alpha; FISH, fluorescent *in situ* hybridization; hi, high expression; lo, low expression; YY1, Yin Yang 1.

protein level (Figure 2c, Western blotting). Markedly, 3 days after treatment with the combination of AP-2 α and AP-2 γ siRNAs, both factors were undetectable (Figure 2c, lane 4), demonstrating that the siRNAs specifically inhibited the expression of their targets. We then quantified ERBB2 transcript level by real-time RT-PCR in those cells transfected by the siRNAs. Either the AP-2 α siRNA or the AP-2 γ siRNA alone produced a small transient downregulation of the ERBB2 transcript level (Figure 2d). Interestingly, transfection of both AP-2 α and AP-2 γ siRNAs induced a significant decrease in the endogenous ERBB2 mRNA level (Figure 2d). This result was also obtained with another set of siRNAs against AP-2 α and AP-2 γ (data not shown). Moreover, the inhibition was seen at the protein level (Figure 2e, lane 2). Indeed, we observed a reduction of ERBB2 protein level to 57% of control upon transfection of both siRNAs directed against AP-2 α and AP-2 γ . Going deeper, we further added an siRNA directed against YY1 and observed that the ERBB2 protein level could be decreased even further to 22% of control by this combination of siRNAs (Figure 2e, lane 4). These results are strong evidence that AP-2 and YY1 transcription factors effectively participate in ERBB2 expression in breast cancer cells.

AP-2 and YY1 protein levels are correlated both in mammary cancer cell line and tissue specimens

Surprisingly, we also observed a strong association between AP-2 α and YY1 expression levels in the primary breast tumors ($p < 0.001$) (Table 6). Indeed, the majority of the tumors contained either low levels (26 cases) or high amounts (19 cases) of both proteins. In contrast, there were only 10 cases (18%) with a high level of either AP-2 α or YY1 alone (Table 6). Next, we analyzed the relationship between these factors in a breast

cancer cell line. We observed that transfection of an siRNA directed against YY1 reduced both AP-2 α and AP-2 γ protein levels (Figure 2e, lane 3). Additionally, the combination of siRNAs directed against both AP-2 α and AP-2 γ also diminished the YY1 protein level (Figure 2e, lane 2). These results suggest that, besides the cooperation between AP-2 and YY1 transcription factors on the ERBB2 promoter, there is an intricate relationship between the expressions of these proteins.

Discussion

Multiple *in vitro* and *in vivo* data have demonstrated a link between AP-2 transcription factors and the ERBB2 oncogene. The goals of this study were to characterize better the relationship between the overexpressions of ERBB2 and AP-2 α in primary breast tumors and to analyze the implication of the YY1 protein as a cofactor of AP-2. Although the number of tumors analyzed in this study was quite small, it should be stressed that our observations in tissue samples were further corroborated by data from the functional *in vitro* experiments.

Previous immunohistochemical studies on AP-2 and ERBB2 expression in primary breast tumors have reported controversial conclusions [26,29-31]. Indeed, whereas three studies showed a direct correlation between the levels of one or two AP-2 transcription factor family members and ERBB2 gene expression [26,29,31], a fourth one revealed no correlation [30]. Moreover, Turner and colleagues [31] showed that the combination of AP-2 α and AP-2 γ expressions correlated to ERBB2 expression. It should be noted that these multiple studies used different antibodies which sometimes did not discriminate between the diverse members of the AP-2 family. In the present study, we focused on the AP-2 α member and

Table 5

Associations between ERBB2 and AP-2 α and/or YY1 levels (immunohistochemistry) in the FISH-negative group

	<i>n</i>	ERBB2 expression (percentage)						<i>P</i> value
		0/1+	2+	3+				
AP-2 α expression								<0.001
Low	18	14	(78)	4	(22)	0	(0)	
High	16	2	(12)	11	(69)	3	(19)	
YY1 expression								0.106
Low	16	10	(63)	6	(37)	0	(0)	
High	18	6	(33)	9	(50)	3	(17)	
Combination								0.015
AP-2 α lo/YY1 lo	13	10	(77)	3	(23)	0	(0)	
AP-2 α lo/YY1 hi or AP-2 α hi/YY1 lo	8	4	(50)	4	(50)	0	(0)	
AP-2 α hi/YY1 hi	13	2	(15)	8	(62)	3	(23)	

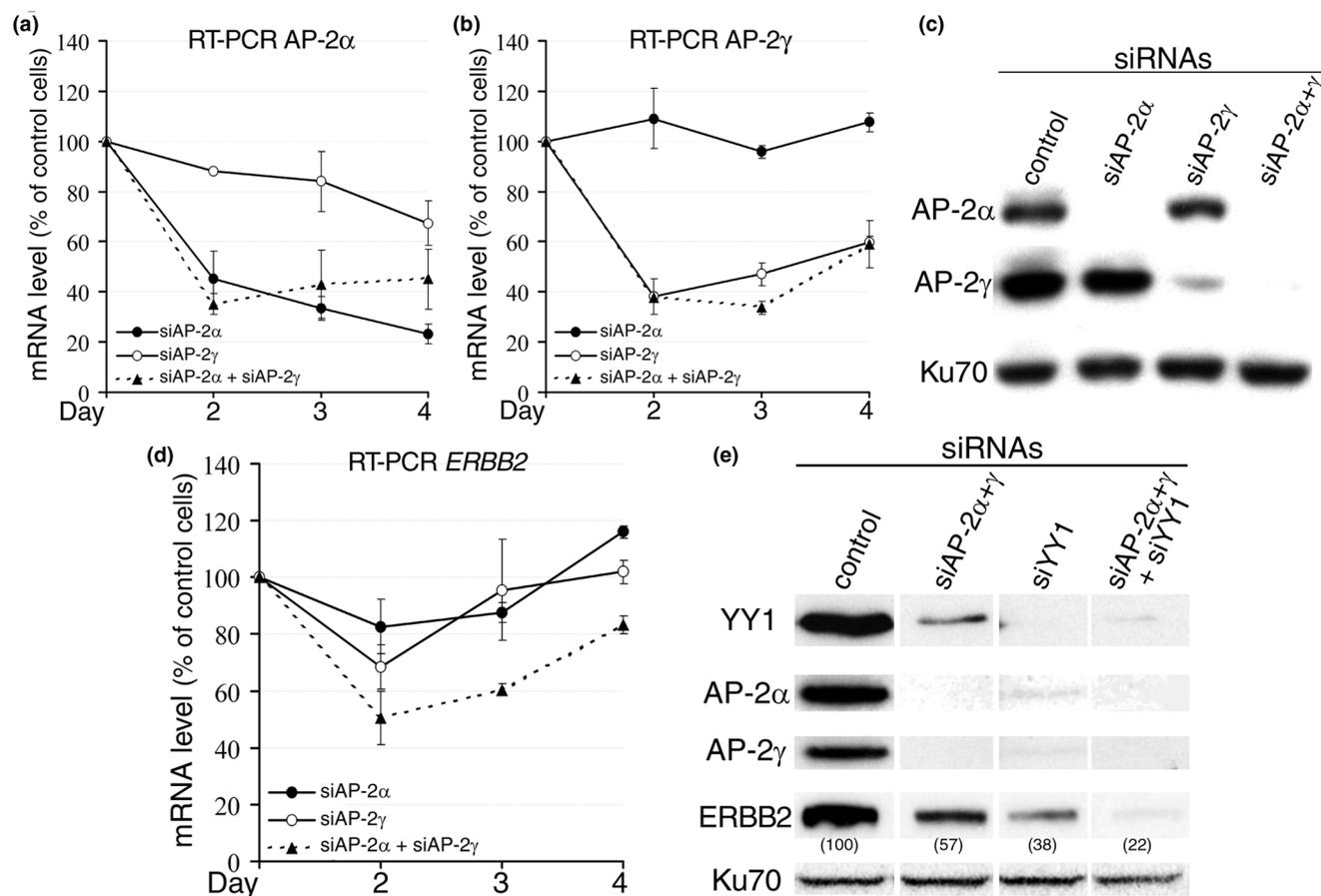
AP-2 α , activator protein 2 alpha; FISH, fluorescent *in situ* hybridization; hi, high expression; lo, low expression; YY1, Yin Yang 1.

showed a strongly significant correlation between AP-2 α and ERBB2 protein levels. Moreover, we demonstrated that ERBB2 endogenous expression is inhibited by the downregulation of both AP-2 α and AP-2 γ in a breast cancer cell line. These results and the fact that AP-2 factors bind the endogenous ERBB2 gene promoter [13,16] strongly suggest that AP-2 factors do effectively contribute to ERBB2 overexpression in breast cancer cells. Our siRNA results further indicate that both AP-2 α and AP-2 γ are required for ERBB2 overexpression, as already suggested in a study on breast cancer tissues by Turner and colleagues [31].

In the present study, ERBB2 expression was also associated with combined high levels of AP-2 α and its partner YY1 both in primary breast tumors, markedly in the absence of ERBB2 gene amplification, and in a breast cancer cell line. The fact that YY1 needs AP-2 to be recruited on the endogenous ERBB2 proximal promoter [16] could explain why no direct relationship between YY1 and ERBB2 levels was seen in the tumors and highlights the importance of the combination of high levels of AP-2 α and YY1 for ERBB2 expression. To the best of our knowledge, our study is the first to report both data in primary tumors and functional results on breast cancer cells regarding the role of AP-2 α transcription factor and one of its cofactors on ERBB2 gene expression. Further investigations, however, are needed to determine whether breast tumors with ERBB2 2+ or 3+ IHC score without gene amplification but with high levels of AP-2 α and YY1 have a particular behaviour regarding clinical outcome and response to Herceptin treatment.

Recently, Li and colleagues [32] proposed that AP-2 α overexpression in breast cancer cells is the consequence of a stabilization of the protein resulting from a defective proteasomal degradation, leading to an increased ERBB2 gene expression. Our results further suggest that ERBB2 overexpression in breast tumors results not only from a high expression of AP-2 α but also from the concomitant high expression of YY1. Indeed, we have previously shown that YY1 is able to enhance AP-2 α , AP-2 β , and AP-2 γ transcriptional activity *in vitro* and that it is recruited via AP-2 to the ERBB2 endogenous promoter in a breast cancer cell line [16]. Moreover, in the present study, we observed a strong correlation between AP-2 α and YY1 protein levels in the primary breast tumors and a decrease in the AP-2 α and AP-2 γ levels following transfection of an siRNA targeting YY1. These data suggest that there may be a two-sided contribution of YY1 for ERBB2 expression. On the one hand, YY1 increases the AP-2 α and AP-2 γ protein levels, and on the other hand, YY1 stimulates AP-2 α and AP-2 γ transcriptional activity. This view fits well with the additive effect of the siRNAs targeting AP-2 α , AP-2 γ , and YY1 for inhibiting ERBB2 endogenous level.

Another finding of this study was the positive correlation between AP-2 α and YY1. Interestingly, AP-2 α promoter is dependent upon an initiator element for proper transcription, and we noticed a potential YY1 binding site at the transcription start site of the AP-2 α gene (position +4) [33]. Since YY1 can act as an initiator factor [24], this could explain the effect of YY1 siRNA on the AP-2 α level. We also found a perfect AP-2 consensus binding site on the YY1 promoter at -236 base pairs upstream from the transcription start site [34]. Further studies are needed to determine whether these binding sites

Figure 2

Suppression of AP-2 α , AP-2 γ , and YY1 expression downregulates ERBB2 transcript levels in BT-474 cells. **(a)** Cells were transfected on days 0 and 2 by small interfering RNAs (siRNAs) directed against AP-2 α (*siAP-2 α*) and/or AP-2 γ (*siAP-2 γ*) or against luciferase mRNA as control. Graphic shows real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for AP-2 α transcripts on total RNA extracted after 2, 3, or 4 days of treatment with indicated siRNAs. Results are presented as percentages of mRNA level as compared with control cells transfected with luciferase siRNA. Data are means \pm standard deviation of three experiments. **(b)** RT-PCR for AP-2 γ transcripts on total RNA. Cells were transfected like in (a). **(c)** Detection by Western blotting of AP-2 α and AP-2 γ levels at day 3. Ku70 protein served as control. Cells were transfected like in (a). **(d)** RT-PCR for ERBB2 transcripts on total RNA. Cells were transfected like in (a). **(e)** Cells were transfected on day 0 with 30 nM siRNA directed against YY1 (*siYY1*) or 100 nM combined siRNAs against AP-2 α and AP-2 γ transcripts (*siAP-2 α + γ*) or both as indicated. Control cells were transfected with a commercially available negative control siRNA (*control*). Proteins extracted after 24 hours of treatment were detected by Western blotting. Ku70 protein served as control for the protein amount charged on the gel. The percentage of ERBB2 protein level compared with transfection of control siRNA is shown in brackets. AP-2, activator protein 2; YY1, Yin Yang 1.

are functional and may explain the relationship between AP-2 α and YY1 levels.

Conclusion

We demonstrated, for the first time, the implication of AP-2 α in combination with its cofactor, YY1, in *ERBB2* oncogene overexpression in breast tumors both *in vitro* and in breast cancer tissue specimens. Moreover, we showed that at least two mechanisms can lead to pathological *ERBB2* overexpression in breast cancer: *ERBB2* gene amplification and increased transcription through high levels of transcriptional activators, such as AP-2 α and YY1. We hope that these data open a new way in the research field of *ERBB2* overexpression and its pathogenic role in breast tumors.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

AA selected the histological specimens and performed and scored immunohistochemistry. GN performed siRNA transfection experiments and Western blotting. AA and GN contributed equally to this work. AT carried out the statistical analyses. LD performed siRNA transfection experiments, Western blotting, and real-time RT-PCR. JM and JB made substantial contributions to manuscript revisions. VF scored the *ERBB2* immunohistochemistry. RW participated in the study design, revised the manuscript, and provided important intellectual support. PD conceived of the study, scored FISH on the histological specimens, revised the manuscript, and pro-

Table 6

Association between AP-2 α and YY1 levels determined by immunohistochemistry on breast tumor specimens

	n	AP-2 α expression (percentage)		P value
		Low	High	
YY1 expression				<0.001
Low	30	26 (87)	4 (13)	
High	25	6 (24)	19 (76)	

AP-2 α , activator protein 2 alpha; YY1, Yin Yang 1.

vided important intellectual support. DYB participated in the study design, coordination, and interpretation of the results and drafted and finalized the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Estelle Dortu and the Centre for Research on Prion Proteins from the University of Liege for technical assistance. This work was supported by grants from Televie (Belgium), the Leon Fredericq Foundation (Liege, Belgium), the Anticancer Centre attached to the University of Liege, and the Belgian Federation Against Cancer. AA received a mixed doctorate grant from the Belgian Directorate-General for Development Cooperation. GN, JM, and DYB are recipients of a Televie Grant from the Belgian National Fund for Scientific Research (F.N.R.S.). RW and PD are Research Directors from the F.N.R.S.

References

- Yarden Y, Sliwkowski MX: **Untangling the ErbB signalling network.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**:127-137.
- Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y: **Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors.** *Adv Cancer Res* 2000, **77**:25-79.
- Neve RM, Lane HA, Hynes NE: **The role of overexpressed HER2 in transformation.** *Ann Oncol* 2001, **12**(Suppl 1):S9-13.
- Eccles SA: **The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001, **6**:393-406.
- Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E: **HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer.** *Ann Oncol* 2001, **12**(Suppl 1):S15-S19.
- Hollywood DP, Hurst HC: **A novel transcription factor, OB2-1, is required for overexpression of the proto-oncogene c-erbB-2 in mammary tumour lines.** *EMBO J* 1993, **12**:2369-2375.
- Kraus MH, Popescu NC, Amsbaugh SC, King CR: **Overexpression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell lines by different molecular mechanisms.** *EMBO J* 1987, **6**:605-610.
- Pasleau F, Grooteclaes M, Gol-Winkler R: **Expression of the c-erbB2 gene in the BT474 human mammary tumor cell line: measurement of c-erbB2 mRNA half-life.** *Oncogene* 1993, **8**:849-854.
- Bosher JM, Totty NF, Hsuan JJ, Williams T, Hurst HC: **A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma.** *Oncogene* 1996, **13**:1701-1707.
- Cheng C, Ying K, Xu M, Zhao W, Zhou Z, Huang Y, Wang W, Xu J, Zeng L, Xie Y, Mao Y: **Cloning and characterization of a novel human transcription factor AP-2 beta like gene (TFAP2BL1).** *Int J Biochem Cell Biol* 2002, **34**:78-86.
- Tummala R, Romano RA, Fuchs E, Sinha S: **Molecular cloning and characterization of AP-2 epsilon, a fifth member of the AP-2 family.** *Gene* 2003, **321**:93-102.
- Bosher JM, Williams T, Hurst HC: **The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:744-747.
- Delacroix L, Begon D, Chatel G, Jackers P, Winkler R: **Distal ERBB2 promoter fragment displays specific transcriptional and nuclear binding activities in ERBB2 overexpressing breast cancer cells.** *DNA Cell Biol* 2005, **24**:582-594.
- Grooteclaes M, Vernimmen D, Plaza S, Pasleau F, Hodzic D, Winkler-Gol R: **A new cis element is involved in the HER2 gene overexpression in human breast cancer cells.** *Cancer Res* 1999, **59**:2527-2531.
- Vernimmen D, Begon D, Salvador C, Gofflot S, Grooteclaes M, Winkler R: **Identification of HTF (HER2 transcription factor) as an AP-2 (activator protein-2) transcription factor and contribution of the HTF binding site to ERBB2 gene overexpression.** *Biochem J* 2003, **370**:323-329.
- Begon DY, Delacroix L, Vernimmen D, Jackers P, Winkler R: **Yin Yang 1 cooperates with activator protein 2 to stimulate ERBB2 gene expression in mammary cancer cells.** *J Biol Chem* 2005, **280**:24428-24434.
- Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA: **PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**:866-874.
- Kannan P, Tainsky MA: **Coactivator PC4 mediates AP-2 transcriptional activity and suppresses ras-induced transformation dependent on AP-2 transcriptional interference.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**:899-908.
- Bamforth SD, Braganca J, Eloranta JJ, Murdoch JN, Marques FI, Kranc KR, Farza H, Henderson DJ, Hurst HC, Bhattacharya S: **Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfpap2 co-activator.** *Nat Genet* 2001, **29**:469-474.
- Braganca J, Swingler T, Marques FI, Jones T, Eloranta JJ, Hurst HC, Shioda T, Bhattacharya S: **Human CREB-binding protein/p300-interacting transactivator with ED-rich tail (CITED) 4, a new member of the CITED family, functions as a co-activator for transcription factor AP-2.** *J Biol Chem* 2002, **277**:8559-8565.
- Braganca J, Eloranta JJ, Bamforth SD, Ibbitt JC, Hurst HC, Bhattacharya S: **Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2.** *J Biol Chem* 2003, **278**:16021-16029.
- Shi Y, Lee JS, Galvin KM: **Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1.** *Biochim Biophys Acta* 1997, **1332**:F49-F66.
- Shrivastava A, Calame K: **An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator Yin Yang-1.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:5151-5155.
- Thomas MJ, Seto E: **Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key?** *Gene* 1999, **236**:197-208.
- Wu F, Lee AS: **YY1 as a regulator of replication-dependent hamster histone H3.2 promoter and an interactive partner of AP-2.** *J Biol Chem* 2001, **276**:28-34.
- Pellikainen J, Naukkarinen A, Ropponen K, Rummukainen J, Kataja V, Kellokoski J, Eskelinen M, Kosma VM: **Expression of HER2 and its association with AP-2 in breast cancer.** *Eur J Cancer* 2004, **40**:1485-1495.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A,

- Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF, American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists: **American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2007, **25**:118-145.
28. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T: **Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.** *Nature* 2001, **411**:494-498.
29. Friedrichs N, Jager R, Paggen E, Rudlowski C, Merkelbach-Bruse S, Schorle H, Buettner R: **Distinct spatial expression patterns of AP-2alpha and AP-2gamma in non-neoplastic human breast and breast cancer.** *Mod Pathol* 2005, **18**:431-438.
30. Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI, Hurst HC: **Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor-like role for the transcription factor AP-2 in invasive breast cancer.** *J Pathol* 1999, **189**:514-520.
31. Turner BC, Zhang J, Gumbs AA, Maher MG, Kaplan L, Carter D, Glazer PM, Hurst HC, Haffty BG, Williams T: **Expression of AP-2 transcription factors in human breast cancer correlates with the regulation of multiple growth factor signalling pathways.** *Cancer Res* 1998, **58**:5466-5472.
32. Li M, Wang Y, Hung MC, Kannan P: **Inefficient proteasomal-degradation pathway stabilizes AP-2alpha and activates HER-2/neu gene in breast cancer.** *Int J Cancer* 2006, **118**:802-811.
33. Creaser PC, D'Argenio DA, Williams T: **Comparative and functional analysis of the AP2 promoter indicates that conserved octamer and initiator elements are critical for activity.** *Nucleic Acids Res* 1996, **24**:2597-2605.
34. Yao YL, Dupont BR, Ghosh S, Fang Y, Leach RJ, Seto E: **Cloning, chromosomal localization and promoter analysis of the human transcription factor YY1.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**:3776-3783.

Ku proteins interact with AP-2 transcription factors and contribute to *ERBB2* overexpression in breast cancer cell lines

Running title: Ku and AP-2 proteins in breast cancer ERBB2 overexpression

Grégory Nolens¹, Jean-Christophe Pignon¹, Benjamin Koopmansch¹, Benaïssa Elmoualij², Willy Zorzi², Edwin De Pauw³, and Rosita Winkler¹

¹ Laboratory of Molecular Oncology, GIGA Cancer, University of Liège, Belgium

² Department of Human Histology-CRPP, University of Liège, Belgium

³ Laboratory of Mass Spectrometry; CART, GIGA, University of Liège, Belgium

Keywords: Ku, AP-2, ERBB2, breast cancer

Corresponding author: Grégory Nolens: Laboratory of Molecular Oncology, GIGA Cancer Research, University of Liege, B34, 4000 Liege, Belgium; email: gnolens@student.ulg.ac.be; fax: +3243664198

Grant support: G. Nolens and J.C. Pignon are recipients of Televie grants from the FNRS; B. Koopmansch is research fellow of the FNRS; B. Elmoualij and W. Zorzi are researchers financially supported by Région Wallonne, contract BA4 grant 114915, contract EPH331030000092-430001, EPH331030000022-130033, Fonds Social Européen contract W2002134, W1000346, contract 14531, iPCRq; E. De Pauw is professor at the University of Liege, director of the Mass Spectrometry Laboratory; R. Winkler is research director of the FNRS. Support is via FRSM Grant no. 3.4.542.04 and from the Centre anticancéreux at the University of Liège

Abstract

Introduction. AP-2 α and AP-2 γ transcription factors contribute to *ERBB2* gene overexpression in breast cancer. In order to understand the mechanism by which the *ERBB2* gene is overexpressed we searched for novel AP-2 interacting factors that contribute to its activity.

Methods. Ku proteins were identified as AP-2 α interacting proteins by GST-pull down followed by mass spectrometry. Transfection of the cells with siRNA, expression vectors and reporter vectors as well as ChIP assay were used to ascertain the implication of Ku proteins on *ERBB2* expression.

Results. Nuclear proteins from BT-474 cells overexpressing AP-2 α and AP-2 γ were incubated with GST-AP-2 α or GST coated beads. Proteins retained specifically on GST-AP-2 α coated beads were identified by mass spectrometry as Ku70 and Ku80 proteins. The contribution of Ku proteins to *ERBB2* gene expression in BT-474 and SKBR3 cell lines was investigated by downregulating Ku proteins through the use of specific siRNAs. Depletion of Ku proteins led to downregulation of *ERBB2* mRNA and protein levels. Furthermore, reduction of Ku80 in HCT116 cell line decreased the AP-2 α activity on a reporter vector containing an AP-2 binding site linked to the *ERBB2* core promoter, and transfection of Ku80 increased the activity of AP-2 α on this promoter. Ku siRNAs also inhibited the activity of this reporter vector in BT-474 and SKBR3 cell lines and the activity of the *ERBB2* promoter was further reduced by combining Ku siRNAs with AP-2 α and AP-2 γ siRNAs. ChIP experiments with chromatin extracted from wild type or AP-2 α and AP-2 γ or Ku70 siRNA transfected BT-474 cells demonstrated Ku70 recruitment to the *ERBB2* proximal promoter in association with AP-2 α and AP-2 γ . Moreover, Ku70 siRNA like AP-2 siRNAs, greatly reduced PolIII recruitment to the *ERBB2* proximal promoter.

Conclusion. Ku proteins in interaction with AP-2 (α and γ) contribute to increased *ERBB2* mRNA and protein levels in breast cancer cells.

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women in Europe [1]. Accumulation of different molecular alterations characterizes this complex disease. Five major breast cancer sub-groups have been distinguished according to gene expression signatures [2,3]. One of these subgroups is characterized by *ERBB2/Her2* gene amplification and overexpression. This alteration is present in about 20% of breast cancers and was found to be predictive of poor prognosis before the development of *ERBB2* targeted drugs [4-6].

The *ERBB2* gene codes for p185^{-erbB2}, a transmembrane protein with intrinsic tyrosine kinase activity, belonging to the EGF receptor (EGFR) family. No growth factor recognizing specifically *ERBB2* with high affinity has been identified. Consequently, p185^{-erbB2} is assumed to be activated by hetero-dimerization with another ligand-activated member of the EGFR family [6].

The high levels of p185^{-erbB2} measured in breast cancer cells result from gene amplification and increased transcription rates [7,8]. In order to investigate the biology of these specific breast cancers, we chose to study the deregulation of *ERBB2* gene expression. Analyses of the *ERBB2* promoter have led to the identification of several regulatory sequences through which the gene is overexpressed. AP-2, Ets and YB-1 transcription factor families bind to some of these regulatory regions and have been shown to play a role in *ERBB2* overexpression. Ets family transcription factors contribute to *ERBB2* overexpression by binding to the proximal promoter [9]. YB-1 factors act through binding sites located 815 to 1129 bp upstream the main transcription initiation site [10], whereas AP-2 binding sequences (AP2BS) have been identified in the proximal [11-13] and distal [14] regions of the promoter.

The AP-2 transcription factor family contains five members: AP-2 $-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$, $-\delta$ and $-\epsilon$. All have a similar 50 kDa apparent molecular mass and are able to form homo- and hetero-dimers. They bind specific DNA sequences, AP2BS, through their conserved helix-span-helix DNA binding domain.

The involvement of AP-2 α and AP-2 γ factors in *ERBB2* overexpression has been described in several breast cancer cell lines [11-13,15]. Besides the *ERBB2* gene, AP-2 factors control the expression of several target genes implicated in the control of cell growth, differentiation and carcinogenesis [16].

AP-2 factors control transcription in association with transcriptional cofactors [17]. Among them, PC4, PARP [18], CITED-2, CITED-4 and CBP/p300 [19], as well as YY1 [20],

have been shown to interact with and to contribute to AP-2 transcriptional activity. In our own research, we have observed a good correlation between p185^{erbB2}, AP-2 α and YY1 expression levels in primary breast tumor samples [21]. Besides their role in transcription, cofactors are also important for the protection of AP-2 against proteasomal degradation [22].

In order to improve the current understanding of AP-2 (α and γ) activity, we sought here to identify further AP-2 α interacting factors contributing to *ERBB2* gene overexpression in breast cancer cells. We used a proteomic approach to isolate proteins interacting with this transcription factor in a BT-474 breast cancer cell line. Ku70 and Ku80 were identified by mass spectrometry among the AP-2 α interacting proteins.

Ku 70 and Ku80 hetero-dimers are mostly known for their role, in association with DNA-PK, in the repair of DNA double strand breaks. However, it has been shown that Ku70 and Ku80 are involved in transcription regulation either by binding directly to DNA or through interaction with transcription factors [23]. Ku factors might also play a role in cancer [24].

We show that siRNAs targeting Ku mRNAs downregulate *ERBB2* mRNA and protein levels. The use of reporter vectors containing the *ERBB2* proximal promoter demonstrated that Ku70 and Ku80 proteins are involved in *ERBB2* transcription regulation. Moreover, we show by ChIP assays that Ku70 protein is recruited to the *ERBB2* gene promoter and its absence decreases AP-2 α and AP-2 γ recruitment. Furthermore, Ku70 recruitment is dependent on the expression of AP-2 α and AP-2 γ . These results contribute to a better understanding of the mechanism by which AP-2 factors upregulate *ERBB2* gene expression in breast cancer cells.

Experimental procedures

Cell lines – All the human cell lines (BT-474, ZR-75.1, MDA-MB-231, MCF-7 and SK-BR3, HepG2) were purchased from the American Tissue Culture Collection. HCT116 and the derived 70/32 (Ku80+/-) cell lines were gifts from Dr. EA Hendrickson [25]. All the cells were cultured in the recommended media supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 100 µg/ml penicillin/streptomycin (Lonza, Basle, Switzerland).

Antibodies – Mouse anti-AP-2 α (3B5) [20], rabbit anti-AP-2 α (C-18) [20], goat anti-Ku70 (C-19) [26], goat anti-Ku80 (C-20) [26], mouse anti-Ku80 (B-1) [27] and control mouse, goat and rabbit IgG antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (CA). Anti RNA Polymerase II (clone CTD4H8) and anti- β -actin (mAbcam 8226) antibodies were obtained from AbCam.

Plasmids and constructs – The pGEX2T-GST-AP-2 α and -GST vectors were gifts from Dr. Kannan [28]. The p86-AP2BS-Luc and p86-AP2BS mut-Luc plasmid reporter vectors (pGL3 basic reporter vector, Promega, Madison, WI) have been previously described by Vernimmen et al [13]. The SV40-Luc control vector (pGL3 control vector) was purchased from Promega. The AP-2 α and the corresponding control expression vectors [29] have been described previously [20]. Ku80 expression vector was a gift from Dr. Chen [30].

GST-pull-down – GST-fusion proteins were expressed and purified according to the procedures provided by Amersham Bioscience. Their purification and the pull-down assay were carried out by using the MagneGST™ Pull-Down System (Promega). The manipulation (incubation and washing) of the beads was automated by the KingFisher robot (Thermo Fisher Scientific, MA). Washing buffer was PBS/0,01% Tween. Final wash was repeated three times. The interacting proteins were finally eluted by 8 M urea.

Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry – These techniques were performed as described previously [31], except that the proteins were directly loaded onto IPG strips (non linear IPG strip pH 4-10; Amersham, GE Europe). Liquid chromatography was carried out in an UltiMate™ pump/detection module, FAMOS™ micro autosampler, Switchos™ micro switching module (LC Packings, Dionex, CA). The mass analysis was carried out in an ion trap Esquire HCT (Bruker Daltonics, Germany) mass spectrometer. The database search was performed using a Mascot local server (Matrix Science, London, UK).

Immunoblotting – Proteins were separated on an SDS-PAGE (10%) and transferred to a PVDF membrane (Millipore). Primary antibodies were used at a 1:1000 dilution. Secondary

antibodies coupled with peroxidase (DAKO) at a 1:4000 dilution were detected using the ECL system (Thermo Fisher Scientific, MA).

Immunoprecipitation – was carried out using Dynabeads Protein G (Invitrogen), according to the manufacturer's recommended protocol, using acetate sodium buffer for antibodies binding. Anti-AP-2 α (C-18), Ku70 (C-19), Ku86 (C-20) antibodies and control antibody were used.

Transient transfection assays of reporter vectors – HCT116, 70/32 (HCT116 Ku80 +/-), BT-474 and SKBR3 cells were transfected using FuGENE HD reagent (Roche Applied Science). The cells (3×10^5) were plated onto 24 mm tissue culture dishes, treated with FuGENE HD/DNA (ratio of 3:1) and incubated for 40 h in complete medium. Cells were then harvested. Lysis and enzymatic activity measures were carried out using the Luciferase Reporter Gene Assay kit (Roche Applied Science). Enzymatic activity was measured in a Victor Wallac luminometer (PerkinElmer, MA). The data were normalized to total protein content.

Transient siRNA transfection – siRNAs were transfected at a 30 nM final concentration using the Calcium Phosphate precipitation technique [32]. Cells were transfected twice at 48 h intervals. As a control, cells were transfected with the negative control siRNA OR-0030-neg05 (Eurogentec, Seraing, Belgium). The AP-2 siRNAs used were as previously described [14]. Other siRNAs were: Ku70-1, 5-GUGUGUACAUCAGUAAGAU; Ku70-2, 5-CAGGCAUCUCCUUGACUU; Ku80-1, 5-GAAGAGGCAUAUUGAAAUA; Ku80-2, 5-CUCCAUCCUGGUAUAGAA.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) – Total RNA was extracted after 90 hours of siRNA transfection treatment, using the High Pure RNA Isolation kit (Roche Applied Sciences). RNA quantification was carried out on a Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific, MA). Reverse transcription was performed on 1 μ g of total extracted RNA. Real time PCR analysis was performed on an ABI Prism 5700 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA,) using the standard protocol. All the results were reported to the β -2-microglobulin mRNA quantity. The primers used were as previously described [21], except for Ku70: 5-AGAAGCAAACCGCCTGTA and 5-CAAGCCTCCTCCAATAAAGC; and Ku80: 5-TGCAGCAAGAGATGATGAGG and 5-GAAAGGCAGCTGCACATACA.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) – was carried out using Dynabeads Protein G (Invitrogen). The previously described protocol [33] was adapted for higher chromatin

quantities. On average for each immunoprecipitation reaction, 30 µg of chromatin DNA was precipitated with 4 µg of antibody. Rabbit anti-AP-2α (C-18), goat anti-Ku70 (C-19) and mouse anti-Ku80 (C-20) were used. Immunoprecipitation with pre-immune sera from the same animal species (Ig) or mock immunoprecipitation (NoAb) served as negative controls. Recovered DNA was quantified by real time PCR or by end-point PCR followed by agarose gel electrophoresis and the results were compared to known quantities of chromatin. The gene-specific primer sequences were: -6900 primers: 5-GCAGTAGCAAGCATCGAGTT and 5-TGGATCATCACAAAGGTTTTCA (-6981 bp to -6780 bp); -500-bp *ERBB2* primers, 5-GACTGTCTCCTCCCAAATTT and 5-CTTAAACTTTCCTGGGGAGC (fragment -575 to -349 bp); -100-bp *ERBB2* primers, 5-GCGAAGAGAGGGAGAAAGTG and 5-GGGGAATCTCAGCTTCACAA; GCK primers, 5-GGTAGAGCAGATCCTGGCAGAG and 5-TGAGCCTTCTGGGGTGGAGCGCA. Dilutions of known quantities of input DNA were used to quantify the PCR products.

Results

Identification of novel AP-2 α interacting proteins

Our goal was to identify novel proteins interacting with AP-2, which contribute to the factor's transcriptional activity. Nuclear protein extracts from BT-474 breast cancer cells were incubated with a Glutathione-Serine-Transferase / AP-2 α (GST-AP2) hybrid protein, linked to glutathione (GSH) coated magnetic beads. Beads coated with expressed GST alone were used as a negative control. After washes, the proteins bound to GST-AP2 or GST coated beads were eluted and resolved on two-dimensional gel electrophoresis. Two proteins migrating with an apparent molecular mass comprised between 70 and 100 kDa were repeatedly detected among the proteins eluted exclusively from the GST-AP2 coated beads (Figure 1A). The corresponding spots were cut out of the gel, the proteins digested, and the resulting peptides analyzed by LC-MS/MS. The proteins were identified as Ku70 and Ku80 (Supplemental data, Table S.1). Most of the other spots on the 2D-gel recovered from the GST-AP-2 α pull down, were identified as GST or AP-2 α fragments.

The presence of Ku proteins among the proteins eluted from the GST-AP2 beads was confirmed by immunoblotting with Ku specific antibodies (Figure 1B). Moreover, the interaction between AP-2 and Ku proteins was controlled by co-immunoprecipitation, using AP-2, Ku70 and Ku80 specific antibodies (Figure 1C).

Ku70/80 depletion induces downregulation of ERBB2 expression

Figure 2 presents Ku70, Ku80 AP-2 α , AP-2 γ , and p185^{-erbB2} protein levels in the cytoplasmic and the nuclear fractions of breast cancer (BT-474, SKBR3, ZR-75.1, MCF-7, MDA-MB-231), colon cancer (HCT-116) and hepatoma (HepG2) cell lines. In most cells, Ku70 and Ku80 proteins were detected in both the nuclear and the cytoplasmic fraction, with the exception of MCF-7 and HepG2 cell lines where Ku80 was exclusively nuclear. In comparison, AP-2 α and AP-2 γ factors were detected only in the nuclear fraction of BT-474, SKBR3 and ZR-75.1 breast cancer cells that overexpress p185^{-erbB2} protein.

Next, we studied the consequence of Ku70 and Ku80 downregulation on the *ERBB2* expression level. For that purpose, Ku70 and Ku80 were inhibited by the transfection of specific siRNAs in two *ERBB2* overexpressing cell lines, BT-474 and SKBR3. In parallel, the cells were transfected with a combination of AP-2 α and AP-2 γ (AP-2 $\alpha\gamma$) siRNAs, previously shown to downregulate *ERBB2* expression [21]. The levels of Ku70, Ku80, AP-2 α , AP-2 γ and *ERBB2* mRNAs in BT-474 were assessed by semi-quantitative RT-PCR 90 h after

transfection (Figure 3A). The corresponding protein levels were estimated 96 hours after transfection by western-immunoblot (Figure 3B). Each siRNA inhibited its own target transcript and protein. Moreover, Ku70 and Ku80 siRNAs reduced both Ku70 and Ku80 protein levels, in agreement with published data [34,35].

Interestingly, the Ku70 siRNAs reduced by about 30-40% *ERBB2* mRNA levels, while p185^{erbB2} levels were decreased by about 90% (Figure 3C). In Ku80 siRNA transfected cells a significant reduction in *ERBB2* transcript and protein levels was also observed. However, the decrease in p185^{erbB2} level was more profound than that of the corresponding transcript, (Figure 3C) suggesting that Ku proteins might act at both the transcriptional and the post-transcriptional levels on *ERBB2* expression. The results of similar experiments on SKBR3 cells are presented in Supplemental Data Figure S.1. Ku70 and Ku80 siRNAs reduced p185^{erbB2} levels less efficiently in SKBR3 than in BT-474 cells. We have to stress that AP-2 α siRNAs were also less efficient in SKBR3 than in BT-474 cells.

In order to gain a more precise view of the cooperation between Ku and AP-2 proteins on *ERBB2* gene transcription, the *ERBB2* mRNA level was precisely quantified by real-time RT-PCR in Ku and AP-2 α siRNA transfected cells. The *ERBB2* transcript levels in cells transfected with the siRNAs were compared to the mRNA levels in cells transfected with the Negative (Neg) siRNA (Figure 3D, and Supplemental Data, Figure S.1C). *ERBB2* transcript levels were similarly reduced by Ku70 and Ku80 siRNAs in BT474 cells and the reduction was of the same order of magnitude as the inhibition observed in Figure 3C. The AP-2 α siRNAs were more effective, reducing the *ERBB2* transcript level by about 65%. Co-transfection of Ku and AP-2 α siRNAs did not reduce further the *ERBB2* mRNA level in these cells. While the Ku70 siRNA was as effective in SKBR3 as in BT-474 cells, Ku80 and AP-2 α siRNAs were much less effective. In contrast with BT-474 cells, in SKBR3 cells a combined effect of Ku70 and AP-2 siRNAs was observed (Figure 3.D).

Ku70/80 regulate ERBB2 promoter transcriptional activity

To investigate the transcriptional control of *ERBB2* gene expression by Ku and AP-2 proteins, we compared the HCT116 cell line and its derived 70/32 cell line, knocked out for one Ku80 allele [25]. Ku80 protein level in 70/32 cells was decreased by about 40-60% in comparison with the wild-type HCT116 cells (Figure 4C). The role of the interaction between Ku and AP-2 on *ERBB2* gene expression was studied by transfecting in both cell lines a luciferase- reporter vector containing a wild type or a mutant AP-2 binding site (Fig 4A). The

cells were cotransfected with AP-2 α and/or Ku80 expression vectors or the corresponding empty vectors. The luciferase activity in the cells transfected with the empty expression vector was considered as equal to one. As previously shown [13,20], AP-2 α stimulated the activity of the reporter containing the wild type AP2BS (Figure 4.B). However, the activation was reduced in 70/32 cells expressing less Ku80. Ku80 expression vector alone had no effect on the promoter activity. However, co-transfection of Ku80 with AP-2 α expression vectors induced a significant increase in the promoter activity in both cell lines. Interestingly, transfection of Ku80 restored the activation capacity of AP-2 α in 70/32 cell line. Figure 4.C presents the AP-2 α and Ku80 protein levels in the transfected cells.

To complete this investigation, the reporter vectors activities were measured in BT-474 (Figure 5) and SKBR3 (Supplemental Data, S.2) cells 72 hours after transfection of Ku and AP-2 siRNAs (Figure 5). The Luciferase activity in cells transfected with the negative siRNA was considered as equal to one in each condition. As expected, downregulation of AP-2 α and AP-2 γ inhibited only the activity of the reporter containing the functional AP2BS (p86-AP2BS-Luc). Ku70 or Ku80 siRNAs also inhibited significantly the activity of this reporter vector. Furthermore, when Ku70 or Ku80 siRNAs were co-transfected with the AP-2 $\alpha\gamma$ siRNAs, the activity of p86-AP2BS-Luc was further reduced. In contrast, AP-2 $\alpha\gamma$, Ku70 and Ku80 siRNAs did not modify significantly the activity of the vector containing the mutated AP2BS (p86-AP2BS mut-Luc). However, co-transfection of AP-2 $\alpha\gamma$ with Ku70 or Ku80 significantly reduced the activity of the reporter containing the mutant AP2BS.

Together, these results suggest that Ku proteins regulate *ERBB2* gene expression through the proximal promoter, by an AP-2 dependent mechanism.

Ku70/80 proteins are recruited to the ERBB2 proximal promoter

Next, we investigated Ku binding to *ERBB2* gene promoter by chromatin immunoprecipitation (ChIP). Cross-linked chromatin was extracted from BT-474 (Figure 6) and SKBR3 cells (Supplemental Data, Figure S.3). We also extracted chromatin from the same cell type transfected with Ku or AP-2 $\alpha\gamma$ siRNAs. Chromatin fragments were immunoprecipitated with antibodies recognizing AP-2 α and AP-2 γ (AP-2), Ku70, Ku80 and RNA Polymerase II (Pol II). The PolII antibody was used as a positive control for the recruitment of the transcriptional machinery on the *ERBB2* promoter [14,20,36]. Three regions of the *ERBB2* promoter were amplified (Figure 5B). The -500 bp region contains a

high affinity AP2BS [12]. The -100 bp region contains the CAAT and TATA boxes and corresponds to the *ERBB2* core promoter. The -6900 bp sequence was used as an AP2BS negative control [14]. The Ku binding sequence from the Glucokinase (GCK) gene promoter was used as a positive control for Ku proteins binding [36]. Experiments were repeated three times and the average quantities of DNA were reported to the “No antibody” (NoAb) condition (Figure 6C).

In untreated BT-474 cells, Ku70 antibody immunoprecipitated most efficiently the -500 bp DNA sequence of the *ERBB2* gene promoter (Figure 6C, black columns). In agreement with previously published data, AP-2 antibody also immunoprecipitated the same region [14,20]. Interestingly, AP-2 antibodies also immunoprecipitated the GCK sequence. The -500 bp, -100 bp and GCK sequences were efficiently recovered from Pol II specific immunoprecipitations. No DNA was recovered in the ChIP experiments using the C-20 Ku80 specific antibody (data not shown). Although the C-20 antibody has been successfully used in our immunoprecipitation experiments (Figure 1C) and published in ChIP data [26], we did not succeed to immunoprecipitate even the GCK control sequence with this antibody. As the -6900 bp region is devoid of an AP2BS, we consider this signal as background. Compared to BT-474 cells, immunoprecipitation with Ku70 and PolIII antibodies of the *ERBB2* and *GCK* promoter regions in SKBR3 was very poor (Supplemental Data, Figure S.3).

AP-2 α siRNAs reduced significantly the amount of DNA corresponding to the 500 bp region recovered after immunoprecipitation with the AP-2 antibody. Interestingly, AP-2 α siRNAs drastically reduced all DNA fragments recovered after ChIP using the Ku70 antibody in the BT-474 cell line. The recruitment of the DNA fragment from the GCK promoter after the Ku70 ChIP was also reduced. These siRNAs completely inhibited PolIII recruitment to the *ERBB2* and *GCK* promoters. In the two cell lines, Ku70 siRNA reduced AP-2 recruitment to the *ERBB2* and *GCK* gene promoters. This siRNA also completely inhibited the recruitment of Ku70 and PolIII to the promoters we had investigated in the BT-474 cell line.

The ChIP results suggest that both Ku and AP-2 proteins are recruited on the *ERBB2* proximal promoter in BT-474 cells. Moreover, the binding of both factors is necessary for the recruitment of transcription machinery on the *ERBB2* gene promoter in BT-474 and SKBR3 cell lines.

Discussion

The aim of this study was to identify novel proteins interacting with and contributing to AP-2 transcription factor activity. Using GST-pull-down coupled with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, Ku70 and Ku80 proteins were identified as AP-2 α interactors. AP-2 / Ku interaction was confirmed by co-immunoprecipitation. We showed that downregulation of Ku proteins by siRNAs induced a strong reduction in ERBB2 mRNA and protein levels in BT-474 and SKBR3 cells. These siRNAs also inhibited the activity of reporter vectors containing the *ERBB2* proximal promoter. CHIP experiments revealed that Ku70 proteins were recruited to the *ERBB2* promoter. Interestingly, the inhibition of AP-2 α and AP-2 γ expression by siRNA strongly reduced Ku70 recruitment to the *ERBB2* promoter. Ku70 siRNA reduced by half the recruitment of AP-2 factors to the -500 bp region of the *ERBB2* promoter containing a high affinity AP2BS. More importantly, Ku70 siRNA downregulated PolIII recruitment to the ERBB2 promoter. These results show that the Ku proteins are involved in *ERBB2* gene expression regulation by AP-2 in breast cancer cells.

In addition to their role in the repair of DNA double strand breaks, Ku proteins have been shown to control other important cellular processes such as transcription and apoptosis. Ku proteins modulate transcription by several mechanisms and these properties seem to be gene and cell specific. For example, DNA binding of the Ku70/Ku80 heterodimer is responsible for the downregulation of glycoprotein glycoporphin B in non erythroid cells [37]. In contrast, Ku binding to apolipoprotein C-IV promoter stimulates the expression of the gene [38]. Another study showed that interleukins -13/-4 induced expression of the lipooxygenase-1 gene is mediated by the binding of Ku dimmers to the promoter [39]. C-jun expression is also stimulated by Ku80 and possibly by Ku70 binding to gene promoter [40]. Ku proteins can also influence transcription by interaction with transcription factors or cofactors. So, Ku binding inhibits ESE1, an Ets family transcription factor, from binding to DNA and thus its transcriptional activity [41]. Ku proteins might also be involved in elongation [36] and transcription reinitialization [42].

Ku proteins were also shown to modulate gene expression by binding to PARP-1 and to YY1, which were shown to interact with and influence AP-2 transcription factor activity. Indeed, PARP-1 is necessary to preserve the transcriptional activity of overexpressed AP-2 transcription factors [18]. The Ku – PARP interaction has opposing effects on transcription. Ku proteins inhibit the transcriptional activity of β -catenin-TCF4 complex by interfering with PARP-1 binding [43]. In contrast, the Ku70/Ku80 dimer - PARP-1 complex stimulates the

expression of the S10019 gene [44]. Ku - YY1 interaction inhibits α myosin heavy-chain gene expression in the heart [45], contrary to the consequence of YY1 interaction with AP-2 on ERBB2 gene expression [20].

We detected Ku proteins in the cytosolic and nuclear fractions of most of the cell lines we tested. The presence of Ku proteins in the cytoplasm might have an important impact on cell behavior [24,46]. Indeed, Ku70 has been shown to protect cells against apoptosis by interacting with Bax and inhibiting its association with the mitochondria [47].

Conclusion

In summary, the present study contributes to a better understanding of the regulation of *ERBB2* gene expression in breast cancer cells, by demonstrating the implication of Ku proteins together with AP-2 transcription factors in the expression of the oncogene. Our results implicate Ku proteins in breast cancer by contributing to *ERBB2* gene overexpression and thus the accumulation of excessive amounts of the receptor. Understanding the mechanisms of *ERBB2* gene deregulation might help in the development of drugs that target further key elements responsible for this important deregulation. Among these, inhibiting Ku activity might be evaluated as an adjuvant for ERBB2 targeted therapy in breast cancer. However, more work is needed in models resembling the *in vivo* situation to confirm the implication of Ku proteins in the accumulation of excessive amounts of ERBB2 protein in cancerous cells.

Abbreviations

AP-2, Activator Protein 2, AP2BS = AP-2 binding site, bp = base pairs, ChIP = chromatin immunoprecipitation, GCK = Glucokinase, GSH = Glutathion, GST = Glutathione Serine Transferase, Luc = Luciferase, MS = Mass Spectrometry, PAGE = Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis.

Competing interests

The authors declare that they have no competing financial interests.

Author's contributions

GN carried out all the studies and drafted the manuscript. JCP and BK helped in the studies and interpretation of the results. BE, WZ and EDP participated in the study design, revised the manuscript and provided important intellectual support. RW conceived of the

study, participated in its design, coordination and interpretation of the results and finalized the manuscript.

All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr Kannan, Dr Hendrickson and Dr. Chen for their gifts. We thank Dr. Gabriel Mazzucchelli for his help in Mass Spectrometry analyses.

This work was supported by grants from Televie (Belgium), Anticancer Centre attached to the University of Liege (Belgium).

Bibliography

1. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P: **Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006.** *Ann Oncol* 2007, **18**:581-592.
2. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS et al.: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:10869-10874.
3. Sorlie T, Perou CM, Fan C, Geisler S, Aas T, Nobel A, Anker G, Akslen LA, Botstein D, Borresen-Dale AL et al.: **Gene expression profiles do not consistently predict the clinical treatment response in locally advanced breast cancer.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5**:2914-2918.
4. Ferretti G, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Cognetti F: **HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend.** *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007, **19**:56-62.
5. Hynes NE, Lane HA: **ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**:341-354.
6. Ross JS, Fletcher JA: **The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy.** *Oncologist* 1998, **3**:237-252.
7. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** *Science* 1987, **235**:177-182.
8. Pasleau F, Grootclaes M, Gol-Winkler R: **Expression of the c-erbB2 gene in the BT474 human mammary tumor cell line: measurement of c-erbB2 mRNA half-life.** *Oncogene* 1993, **8**:849-854.
9. Scott GK, Chang CH, Erny KM, Xu F, Fredericks WJ, Rauscher FJ, III, Thor AD, Benz CC: **Ets regulation of the erbB2 promoter.** *Oncogene* 2000, **19**:6490-6502.
10. Wu J, Lee C, Yokom D, Jiang H, Cheang MC, Yorida E, Turbin D, Berquin IM, Mertens PR, Iftner T et al.: **Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2.** *Cancer Res* 2006, **66**:4872-4879.

11. Boshier JM, Williams T, Hurst HC: **The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:744-747.
12. Grootclaes M, Vernimmen D, Plaza S, Pasleau F, Hodzic D, Winkler-Gol R: **A new cis element is involved in the HER2 gene overexpression in human breast cancer cells.** *Cancer Res* 1999, **59**:2527-2531.
13. Vernimmen D, Begon D, Salvador C, Gofflot S, Grootclaes M, Winkler R: **Identification of HTF (HER2 transcription factor) as an AP-2 (activator protein-2) transcription factor and contribution of the HTF binding site to ERBB2 gene overexpression.** *Biochem J* 2003, **370**:323-9.
14. Delacroix L, Begon D, Chatel G, Jackers P, Winkler R: **Distal ERBB2 promoter fragment displays specific transcriptional and nuclear binding activities in ERBB2 overexpressing breast cancer cells.** *DNA Cell Biol* 2005, **24**:582-594.
15. Boshier JM, Totty NF, Hsuan JJ, Williams T, Hurst HC: **A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma.** *Oncogene* 1996, **13**:1701-7.
16. Pellikainen JM, Kosma VM: **Activator protein-2 in carcinogenesis with a special reference to breast cancer--a mini review.** *Int J Cancer* 2007, **120**:2061-2067.
17. Kannan P, Buettner R, Chiao PJ, Yim SO, Sarkiss M, Tainsky MA: **N-ras oncogene causes AP-2 transcriptional self-interference, which leads to transformation.** *Genes Dev* 1994, **8**:1258-69.
18. Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA: **PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27**:866-74.
19. Braganca J, Swingler T, Marques FI, Jones T, Eloranta JJ, Hurst HC, Shioda T, Bhattacharya S: **Human CREB-binding protein/p300-interacting transactivator with ED-rich tail (CITED) 4, a new member of the CITED family, functions as a co-activator for transcription factor AP-2.** *J Biol Chem* 2002, **277**:8559-8565.
20. Begon DY, Delacroix L, Vernimmen D, Jackers P, Winkler R: **Yin Yang 1 cooperates with activator protein 2 to stimulate ERBB2 gene expression in mammary cancer cells.** *J Biol Chem* 2005, **280**:24428-24434.
21. Allouche A, Nolens G, Tancredi A, Delacroix L, Mardaga J, Fridman V, Winkler R, Boniver J, Delvenne P, Begon DY: **The combined immunodetection of AP-2alpha and YY1 transcription factors is associated with ERBB2 gene overexpression in primary breast tumors.** *Breast Cancer Res* 2008, **10**:R9.
22. Li M, Wang Y, Hung MC, Kannan P: **Inefficient proteasomal-degradation pathway stabilizes AP-2alpha and activates HER-2/neu gene in breast cancer.** *Int J Cancer* 2006, **118**:802-811.
23. Featherstone C, Jackson SP: **Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions?** *Mutat Res* 1999, **434**:3-15.
24. Gullo C, Au M, Feng G, Teoh G: **The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1765**:223-234.
25. Li G, Nelsen C, Hendrickson EA: **Ku86 is essential in human somatic cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:832-837.

26. Matheos D, Novac O, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M: **Analysis of the DNA replication competence of the xrs-5 mutant cells defective in Ku86.** *J Cell Sci* 2003, **116**:111-124.
27. Zhang S, Schlott B, Grolach M, Grosse F: **DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) phosphorylates nuclear DNA helicase II/RNA helicase A and hnRNP proteins in an RNA-dependent manner.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:1-10.
28. Buettner R, Kannan P, Imhof A, Bauer R, Yim SO, Glockshuber R, Van Dyke MW, Tainsky MA: **An alternatively spliced mRNA from the AP-2 gene encodes a negative regulator of transcriptional activation by AP-2.** *Mol Cell Biol* 1993, **13**:4174-4185.
29. Gaubatz S, Imhof A, Dosch R, Werner O, Mitchell P, Buettner R, Eilers M: **Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2.** *EMBO J* 1995, **14**:1508-1519.
30. Ishiguro A, Ideta M, Mikoshiba K, Chen DJ, Aruga J: **ZIC2-dependent transcriptional regulation is mediated by DNA-dependent protein kinase, poly(ADP-ribose) polymerase, and RNA helicase A.** *J Biol Chem* 2007, **282**:9983-9995.
31. Francis F, Gerkens P, Harmel N, Mazzucchelli G, De PE, Haubruge E: **Proteomics in Myzus persicae: effect of aphid host plant switch.** *Insect Biochem Mol Biol* 2006, **36**:219-227.
32. Chaplet M, Detry C, Deroanne C, Fisher LW, Castronovo V, Bellahcene A: **Zoledronic acid up-regulates bone sialoprotein expression in osteoblastic cells through Rho GTPase inhibition.** *Biochem J* 2004, **384**:591-598.
33. Dahl JA, Collas P: **A rapid micro chromatin immunoprecipitation assay (microChIP).** *Nat Protoc* 2008, **3**:1032-1045.
34. Bertolini LR, Bertolini M, Anderson GB, Maga EA, Madden KR, Murray JD: **Transient depletion of Ku70 and Xrcc4 by RNAi as a means to manipulate the non-homologous end-joining pathway.** *J Biotechnol* 2007, **128**:246-257.
35. Mayeur GL, Kung WJ, Martinez A, Izumiya C, Chen DJ, Kung HJ: **Ku is a novel transcriptional recycling coactivator of the androgen receptor in prostate cancer cells.** *J Biol Chem* 2005, **280**:10827-10833.
36. Mo X, Dynan WS: **Subnuclear localization of Ku protein: functional association with RNA polymerase II elongation sites.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:8088-8099.
37. Camara-Clayette V, Rahuel C, Bertrand O, Cartron JP: **The E-box of the human glycophorin B promoter is involved in the erythroid-specific expression of the GPB gene.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **265**:170-176.
38. Kim E, Li K, Lieu C, Tong S, Kawai S, Fukutomi T, Zhou Y, Wands J, Li J: **Expression of apolipoprotein C-IV is regulated by Ku antigen/peroxisome proliferator-activated receptor gamma complex and correlates with liver steatosis.** *J Hepatol* 2008, **49**:787-798.
39. Kelavkar UP, Wang S, Badr KF: **Ku autoantigen (DNA helicase) is required for interleukins-13/-4-induction of 15-lipoxygenase-1 gene expression in human epithelial cells.** *Genes Immun* 2000, **1**:237-250.
40. Jiang D, Zhou Y, Moxley RA, Jarrett HW: **Purification and identification of positive regulators binding to a novel element in the c-Jun promoter.** *Biochemistry* 2008, **47**:9318-9334.

41. Wang H, Fang R, Cho JY, Libermann TA, Oettgen P: **Positive and negative modulation of the transcriptional activity of the ETS factor ESE-1 through interaction with p300, CREB-binding protein, and Ku 70/86.** *J Biol Chem* 2004, **279**:25241-25250.
42. Woodard RL, Lee KJ, Huang J, Dynan WS: **Distinct roles for Ku protein in transcriptional reinitiation and DNA repair.** *J Biol Chem* 2001, **276**:15423-15433.
43. Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, Honda K, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Hirohashi S, Yamada T: **Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling.** *Cancer Res* 2007, **67**:911-918.
44. Grote J, Konig S, Ackermann D, Sopalla C, Benedyk M, Los M, Kerkhoff C: **Identification of poly(ADP-ribose)polymerase-1 and Ku70/Ku80 as transcriptional regulators of S100A9 gene expression.** *BMC Mol Biol* 2006, **7**:48.
45. Sucharov CC, Helmke SM, Langer SJ, Perryman MB, Bristow M, Leinwand L: **The Ku protein complex interacts with YY1, is up-regulated in human heart failure, and represses alpha myosin heavy-chain gene expression.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:8705-8715.
46. Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, Frye R, Ploegh H, Kessler BM, Sinclair DA: **Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis.** *Mol Cell* 2004, **13**:627-638.
47. Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, Frye R, Ploegh H, Kessler BM, Sinclair DA: **Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis.** *Mol Cell* 2004, **13**:627-638.

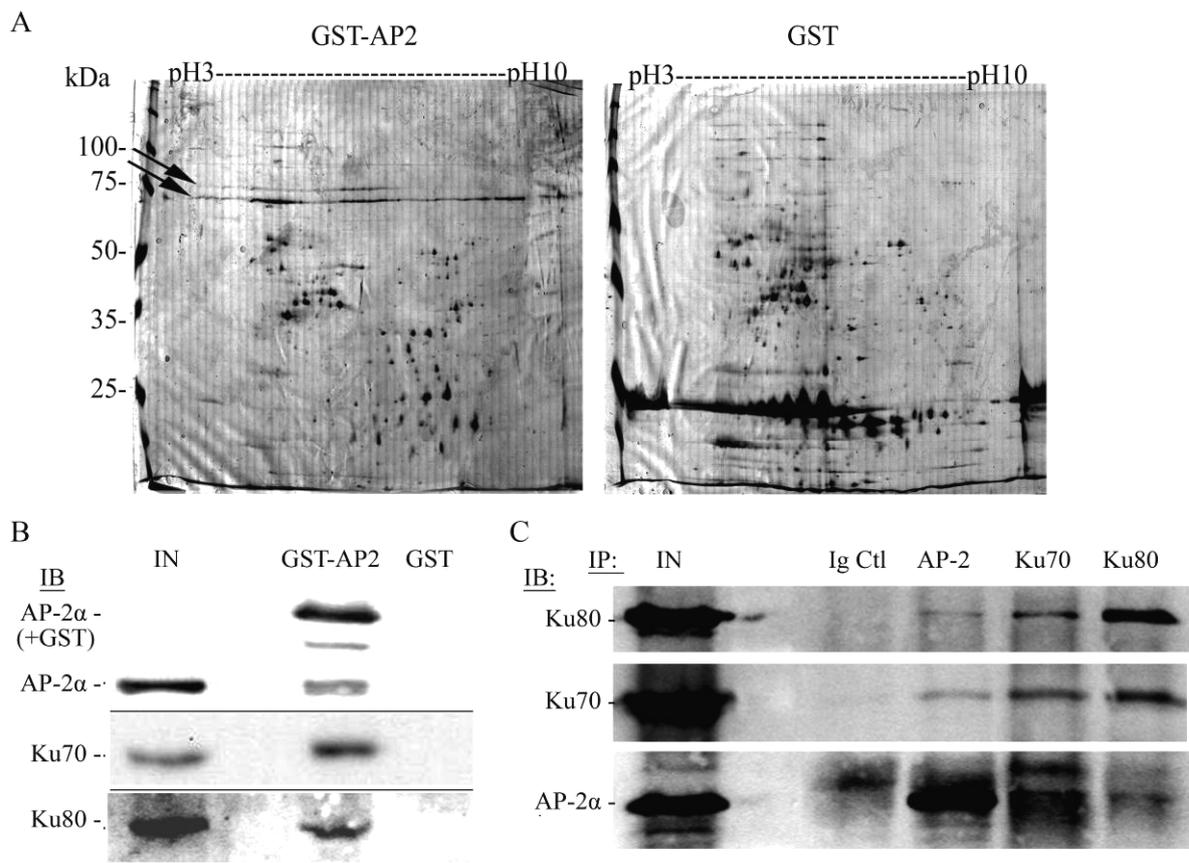


Figure 1. Identification of the Ku proteins interacting with AP-2 α

A. Two-dimensional gel electrophoresis of nuclear proteins eluted from GST AP-2 α coated beads or beads coated with GST alone (GST). The gels were silver stained and the proteins retained on GST AP-2 α beads were identified by mass spectrometry. Arrows show the location of Ku80 (up) and Ku70 (down). Molecular masses are indicated on the left and the pH scale on the top of the gels. **B.** The presence of AP-2 α and Ku proteins in the eluted fractions was verified by immunoblotting (IB) and compared to a fraction of the input (IN). **C.** Co-immunoprecipitation (IP) of AP-2 and Ku proteins by AP-2, Ku70 and Ku80 antibodies or an Ig control (Ig Ctl). The proteins were revealed by immunoblotting (IB).

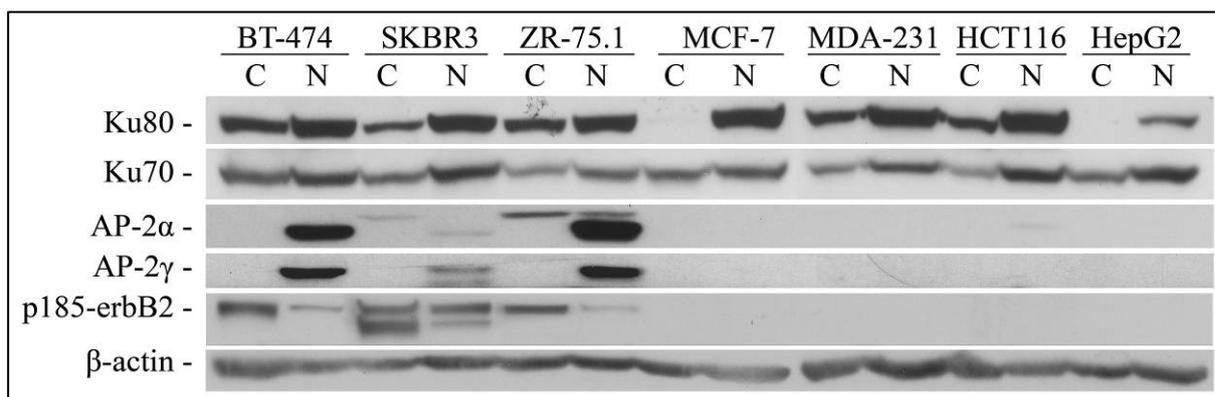


Figure 2. Ku70 and Ku80 protein levels in cytoplasm (C) and nuclei (N) of cancerous cell lines. 60 µg of nuclear and cytoplasmic proteins extracted from the cell lines were resolved by 10% PAGE. The Ku80, Ku70, AP-2α, AP-2γ and p185^{erbB2} proteins were revealed by immunoblotting. The antibodies are indicated on left. Beta-actin (β-actin) protein was used as a loading control.

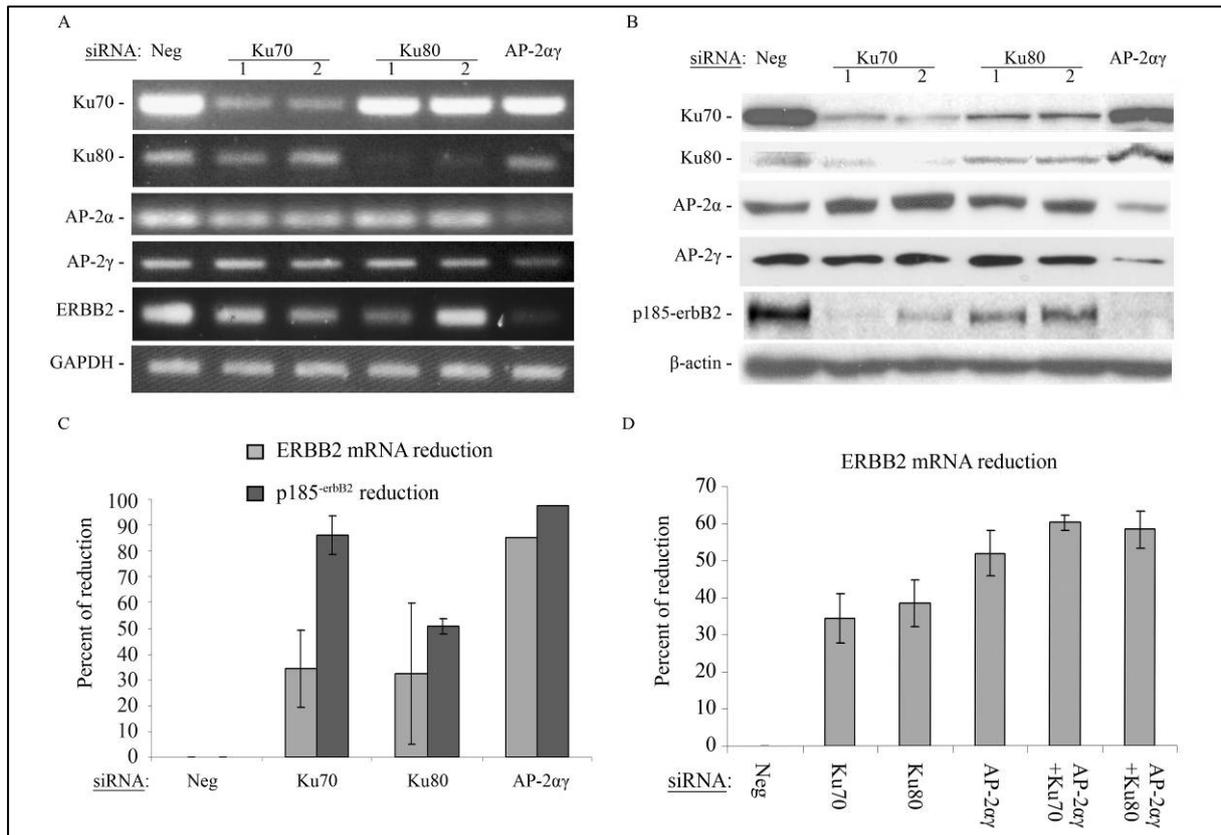


Figure 3. Effect of Ku70 / Ku80 and AP-2 downregulation on ERBB2 mRNA and protein levels in BT-474 cells

A. Ku70, Ku80, AP-2 α , AP-2 γ , GAPDH and ERBB2 mRNA levels in cells transfected with the siRNAs indicated above the photograph. The mRNA levels were estimated by RT-PCR, as described in the Experimental Procedures section. **B.** Immunoblot showing p185^{-erbB2}, Ku70, Ku80, AP-2 α , AP-2 γ and beta-actin (β -actin) protein levels in cells transfected with the siRNAs indicated above the photograph. **C.** Relative reduction in ERBB2 mRNA and p185^{-erbB2} levels calculated from the densitometric quantification of the signals from Figures A and B. The histograms show the reduction in the cells transfected with the different siRNAs compared to the Neg siRNA transfected cells. The signal intensities were corrected for the GAPDH (mRNA) or the β -actin (protein) levels. The mean values and their limits are shown for the Ku70 or Ku80 siRNAs. **D.** Percent reduction of ERBB2 mRNA levels compared to the Neg siRNA condition in cells transfected with the different siRNAs indicated below the figure. ERBB2 mRNA levels were quantified in triplicate by Real-time RT-PCR, and corrected for beta-2-microglobulin mRNA levels.

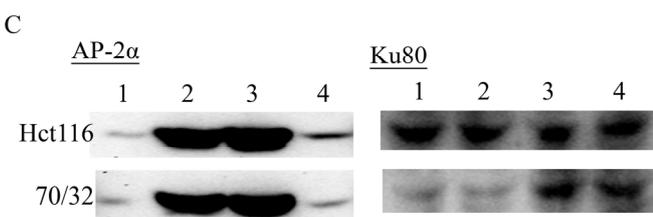
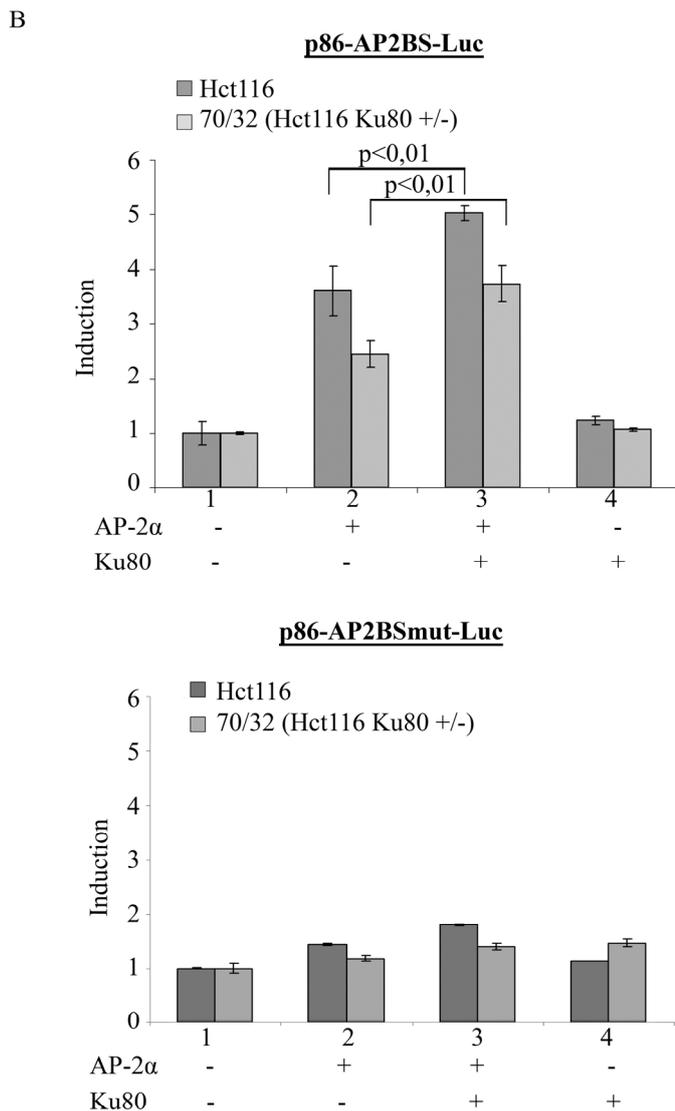
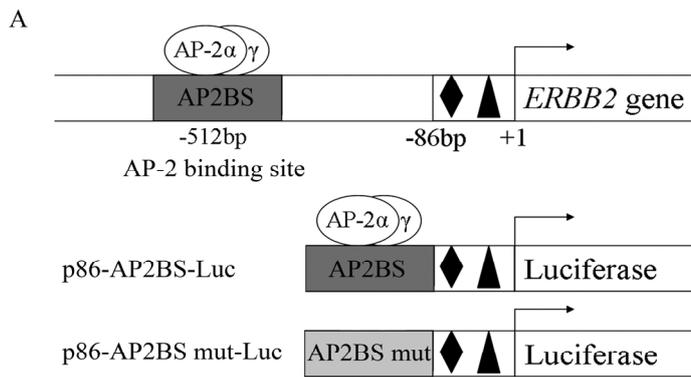


Figure 4. Influence of Ku80 on AP-2α transcriptional activity on *ERBB2* gene promoter. **A.** Schematic representation of the reporter vectors used in this study. All the reporter vectors contain 86bp of the *ERBB2* core promoter. The black diamond indicates the CAAT box; the black triangle the TATA box. The sequence of the AP2BS is that of AP-2 binding sites located at -512 bp from the main *ERBB2* transcription start site. Mutation of 3 nucleotides abrogates the binding of the transcription factor to AP2BSmut [25]. **B.** Variation of luciferase activity in cells transfected with (+) AP-α expression vector alone or with the Ku80 expression vector, in HCT116 and in 70/32 (HCT116 Ku80+/-) cell lines; compared with the activity in the cells transfected with the corresponding empty expression vectors (-). **C.** Western blot showing the levels of AP-2α and Ku80 proteins in the cells transfected with the corresponding expression vectors.

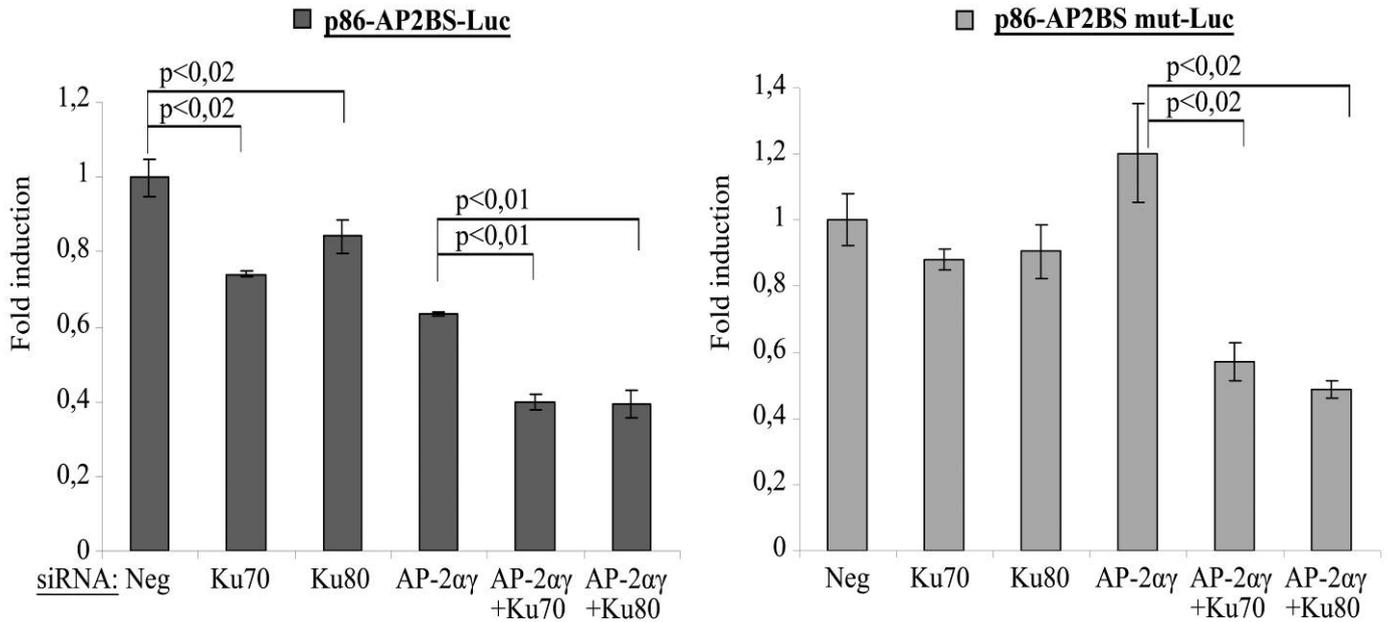


Figure 5. Ku70/80 proteins control *ERBB2* promoter activity in BT-474 cell line.

Relative luciferase activity in cells transfected with the reporter vectors indicated above the figure, 72 hours after transfection of the siRNAs shown under each bar. The fold induction is the ratio between the luciferase activities in the cells transfected with the siRNA of interest and the activity measured in cells transfected with siRNA Neg. Luciferase activity was normalized to total protein content.

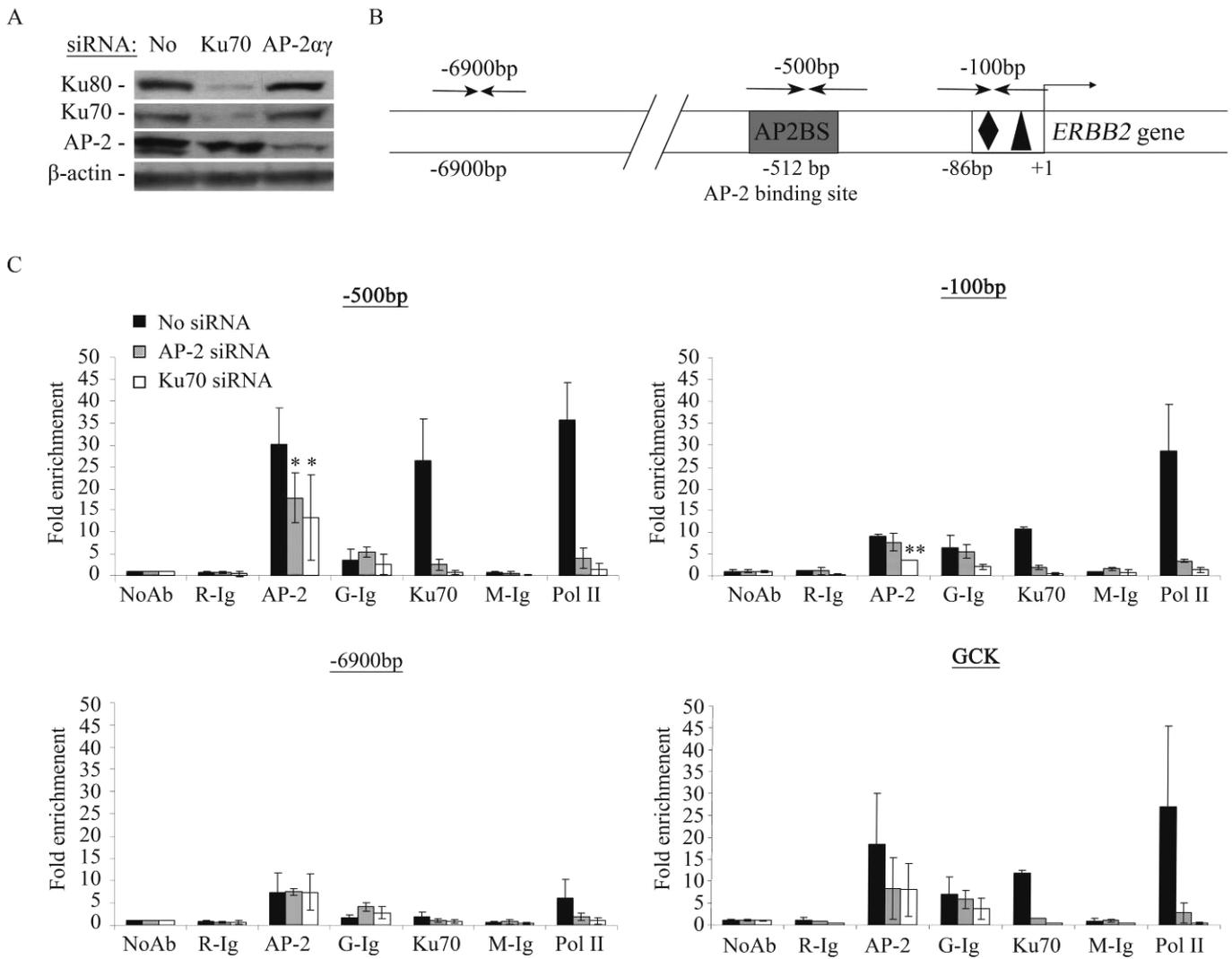


Figure 6. Ku70 is recruited to the *ERBB2* promoter and is necessary for the recruitment of AP-2 and of RNA Polymerase II

A. Chromatin was extracted from BT-474 cells transfected or not with AP-2 ($\alpha\gamma$) or Ku70 siRNAs (above). Protein expression was verified by immunoblot. **B.** Schematic representation of the *ERBB2* promoter illustrating the amplified regions. **C.** DNA amplified after chromatin immunoprecipitation with AP-2, Ku70 and RNA Polymerase II (Pol II) speantibodies. ChIP with control antibodies (Ig) are presented on the left of each experimental point (R: rabbit, G: goat and M: mouse). Graphs show the fold enrichment of the target sequence, compared to the no-antibody (NoAb) condition. GCK sequence corresponds to a positive control for Ku recruitment. * and **: p-values <0,05% compared to the No siRNA condition.

Supplemental Data

Table S.1. Mass Spectrometry identification of the Ku proteins interacting with AP-2 α

Accession number^a	Protein name	Mass^b	Peptides matched^c	Total score^d
P12956	ATP-dependent DNA helicase II, 70 kDa subunit	69953	7	209
P13010	ATP-dependent DNA helicase II, 80 kDa subunit	83091	13	499

a accession numbers of the identified proteins in the UniProtKB/Swiss-Prot data base.

b Predicted molecular masses of identified proteins.

c Numbers of peptides identified from the amino acid sequences of assigned proteins.

d Total probability scores from the Mascot search for identified proteins. Scores were >39 (limit).

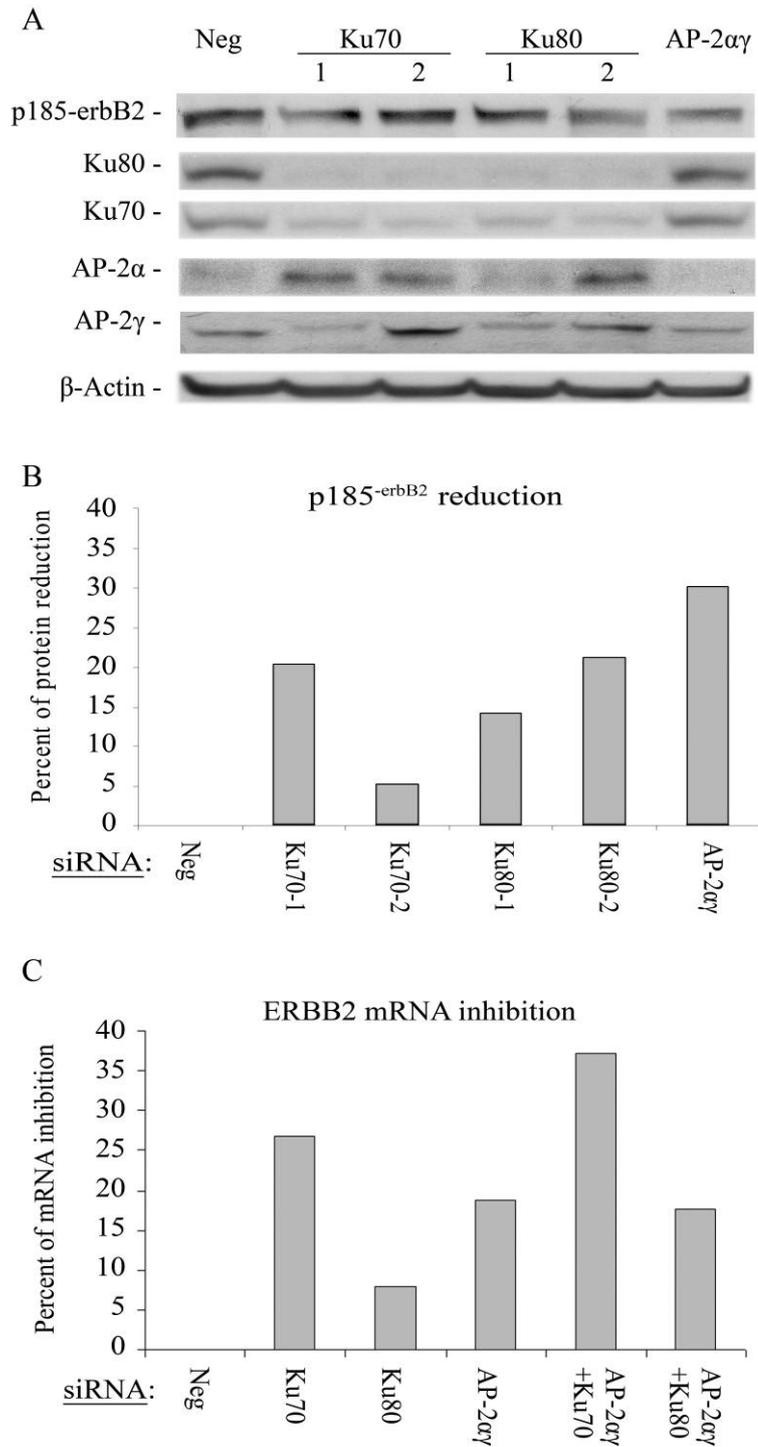
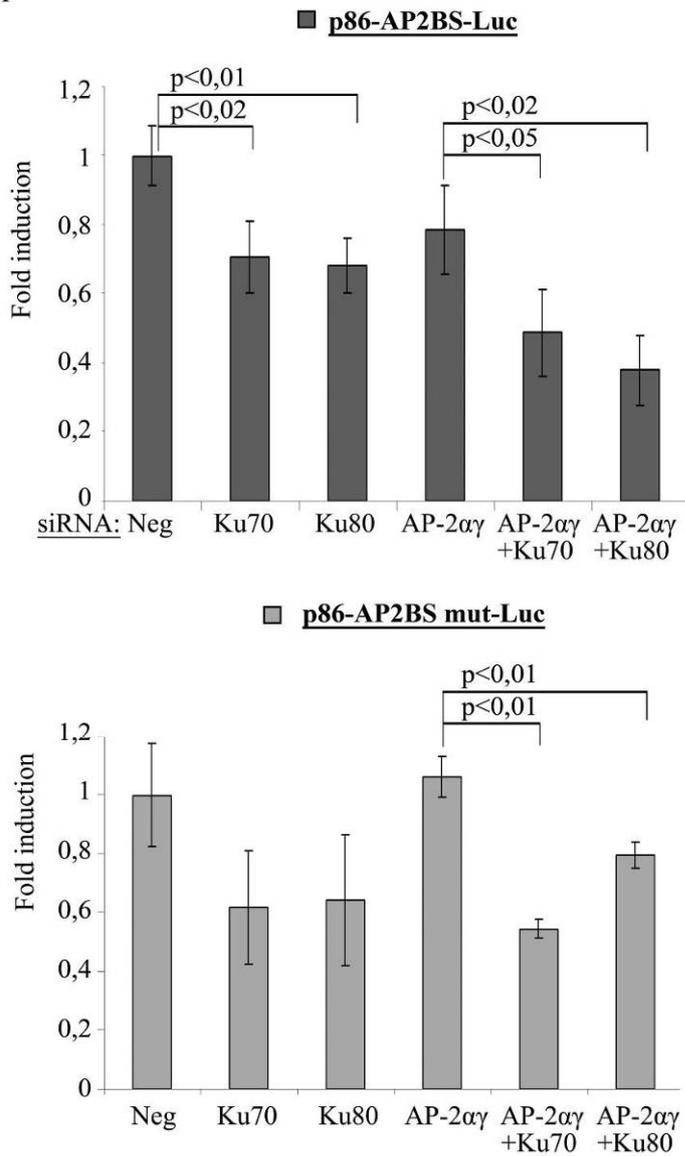


Fig. S.1. Effect of Ku70 / Ku80 and AP-2 deregulation on ERBB2 mRNA and protein expression in SKBR3 cells.

A. Immunoblot analysis of p185^{erbB2}, Ku70, Ku80, AP-2α, AP-2γ and beta-actin (β-Actin) protein expression from cells (BT-474) transfected with two different Ku70 or Ku80 siRNA (see above), compared to the negative siRNA (Neg) and AP-2α and AP-2γ siRNAs

(AP-2 α γ). **B.** Relative levels of the p185^{-erbB2} protein calculated on the density of the immunoblot on point A. Levels were corrected on the β -actin levels, and graph represents the p185-erbB2 protein level reduction siRNAs compared to the Neg siRNA condition. **C.** Real-time RT-PCR on the ERBB2 mRNA from SKBR3 cells transfected with different siRNAs (see down). Ku siRNA were combined with AP-2 α γ or not. The graph represents the percentage of ERBB2 mRNA expression inhibition compared to the Neg siRNA condition. ERBB2 mRNA expression was corrected on the beta-2-microglobulin mRNA expression,

A



B

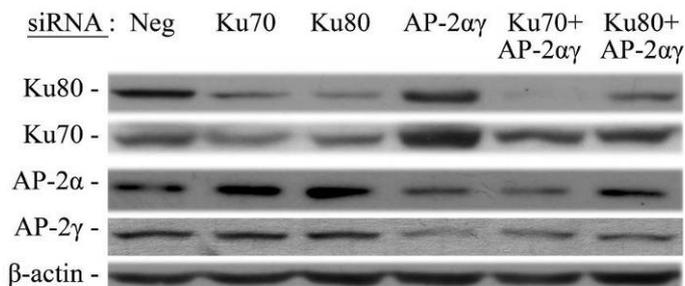


Fig. S.2. Ku70/80 proteins control *ERBB2* promoter activity in SKBR3 cell line.

A. Relative luciferase activity in cells transfected with the reporter vectors indicated above the figure, 72 hours after transfection of the siRNAs shown under each bar. The fold induction is the ratio between the luciferase activities in the cells transfected with the siRNA of interest and the activity measured in cells transfected with siRNA Neg. Luciferase activity was normalized to total protein content. **B.**

Immunoblot control of the different siRNAs conditions from the experiment on point A. Antibodies are indicated on the left and siRNAs above the figure.

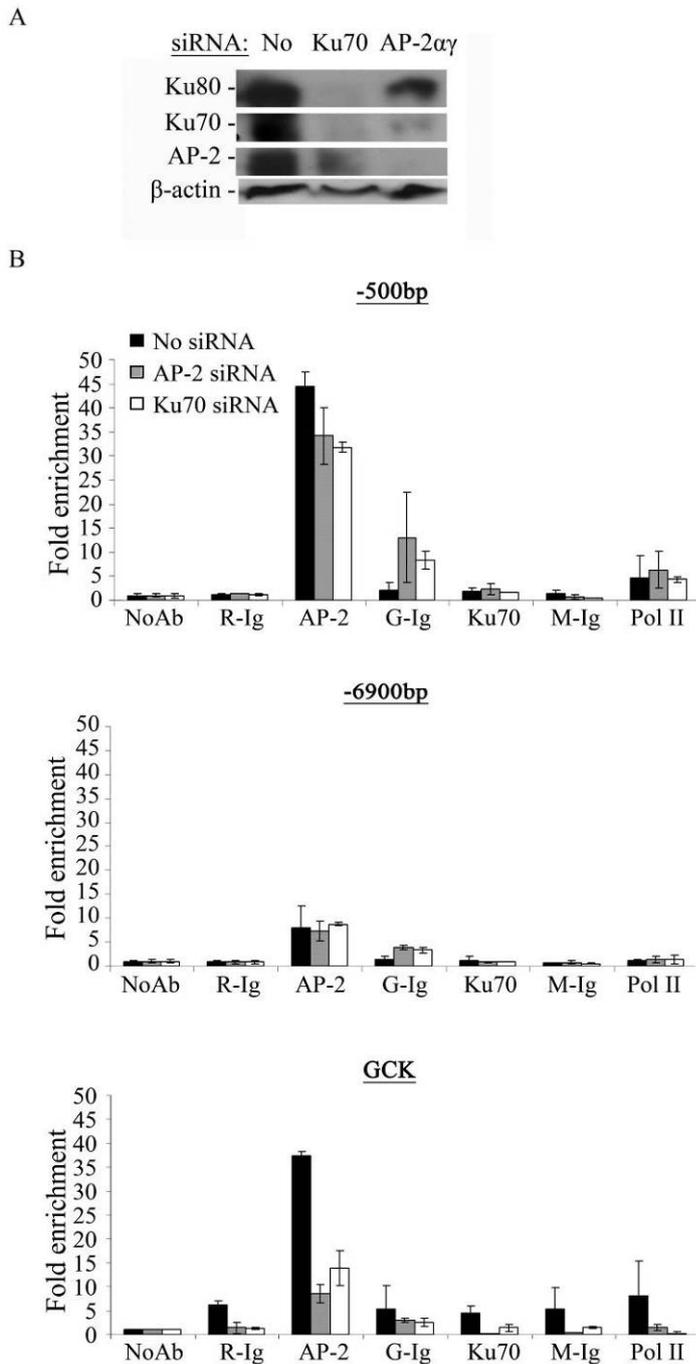
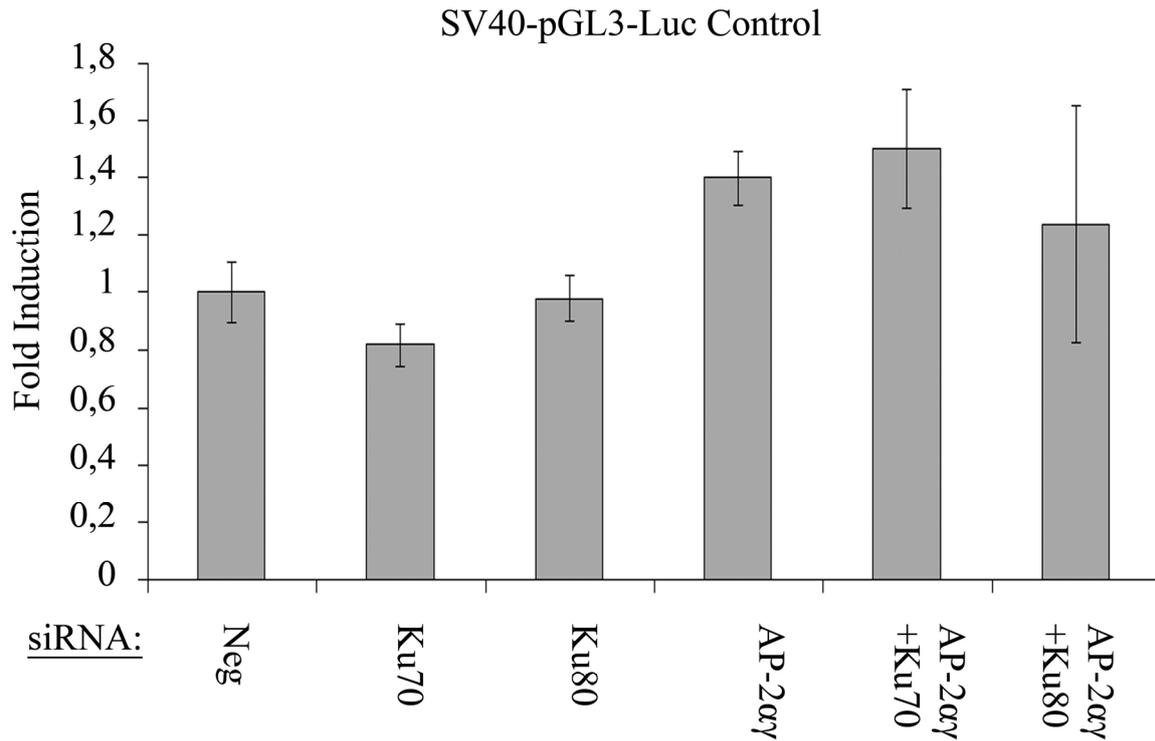


Fig. S.3. Ku proteins are necessary for the recruitment of AP-2 on the proximal *ERBB2* gene promoter in SKBR3 cell line.

A. Chromatin was extracted from SKBR3 cells transfected or not with AP-2 (α) or Ku70 siRNAs (above). Protein expression was verified by immunoblot. **B.** DNA amplified after chromatin immunoprecipitation with AP-2, Ku70 and RNA Polymerase II (Pol II) speantibodies. ChIP with control antibodies (Ig) are presented on the left of each experimental point (R: rabbit, G: goat and M: mouse). Graphs show the fold enrichment of the target sequence, compared to the no-antibody (NoAb) condition. GCK sequence corresponds to a positive control for Ku recruitment. *: p-values <0,05% compared to the No siRNA condition.



Supplemental data for Figure 5 (not published). Ku70/80 proteins control *ERBB2* promoter activity in SKBR3 cell line. Relative luciferase activity in cells transfected with the positive control SV40-pGL3 reporter vector, 72 hours after transfection of the siRNAs shown under each bar. This vector contains a constitutional transcription activator site, and is used as transcriptional control. The fold induction is the ratio between the luciferase activities in the cells transfected with the siRNA of interest and the activity measured in cells transfected with siRNA Neg. Luciferase activity was normalized to total protein content.