

Université de Montréal

**Étude de Necdin par un modèle de carcinogénèse lié à
l'antigène grand T du Virus du polyome**

par

Julie Lafontaine

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en biologie moléculaire

Septembre, 2010

© Julie Lafontaine, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude de Necdin par un modèle de carcinogénèse lié à l'antigène grand T du Virus du
polyome

présentée par :
Julie Lafontaine

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Manuella Santos, président-rapporteur
Dr Anne-Marie Mes-Masson, directeur de recherche
Dr Gerardo Ferbeyre, membre du jury
Dr Rashmi Kothary, examinateur externe
Dr Dindial Ramotar, représentant du doyen de la FES

Résumé

Les virus sont utilisés depuis longtemps dans la recherche sur le cancer et ont grandement contribué à l'avancement des connaissances de même qu'à l'établissement de préceptes importants encore valables aujourd'hui dans le domaine. L'un des défis actuels est de mieux définir les étapes menant à la transition d'une cellule normale à une cellule transformée et c'est sur cette problématique que nous nous sommes penchés. Pour ce faire, nous avons tiré profit de l'utilisation de l'antigène grand-T du virus de polyome (PyLT), un virus capable d'induire des tumeurs chez les rongeurs. Cet oncogène viral à lui seul possède des propriétés intéressantes qui suggèrent que, en plus de l'immortalisation, il peut également contribuer aux événements précoces de la carcinogénèse. Ceci repose principalement sur la capacité de PyLT à induire des tumeurs en souris transgéniques et ce, avec une certaine latence ce qui suggère que des événements supplémentaires sont nécessaires. Ainsi, l'utilisation de PyLT dans un modèle de culture cellulaire permet de disséquer les changements qui lui sont attribuables.

Dans un premier temps, l'établissement du profil d'expression génique associé à l'expression de PyLT dans un modèle murin nous a permis de sélectionner un bon nombre de gènes, parmi lesquels figurait Necdin. Nous avons choisi d'étudier Necdin plus en détail puisque peu d'attention était accordée à cette protéine dans le domaine du cancer, malgré que différentes données de la littérature lui suggèrent à la fois des fonctions suppresseurs de tumeur et oncogéniques. Nous avons démontré que, malgré sa fonction proposée de suppresseur de croissance, l'expression de Necdin n'est pas incompatible avec la prolifération dans la lignée cellulaire de souris NIH 3T3 et les cellules primaires humaines (IMR90), bien que l'inhibition de son expression par shARN confère un avantage prolifératif. Nous avons confirmé que Necdin est un gène cible de p53 induit par différents agents génotoxiques, toutefois son expression peut également être régulée de façon p53-indépendante. De plus, Necdin agit négativement sur l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à l'activation de p53. Ceci suggère que Necdin est impliqué dans une boucle de régulation

négative de la voie de p53 et que l'augmentation anormale de l'expression de Necdin pourrait contribuer à la perturbation la voie du suppresseur de tumeur p53.

L'activation de p53 permet l'arrêt transitoire du cycle cellulaire en condition de stress, mais est aussi impliquée dans l'établissement d'un arrêt permanent nommé sénescence. La sénescence est un mécanisme de protection contre l'accumulation de mutations qui peut contribuer à l'initiation du cancer. Vu l'intéressante implication de Necdin dans la régulation de l'activité de p53, nous avons transposé les connaissances acquises du modèle murin à un modèle humain, plus adapté pour l'étude de la sénescence. La caractérisation de l'expression de Necdin dans des fibroblastes primaires humains à différents passages montre que les jeunes cellules en prolifération active expriment Necdin et que son niveau diminue avec l'établissement de la sénescence réplivative. Le même phénomène est observé lors de la sénescence prématurée provoquée par l'expression d'un oncogène et par l'exposition aux radiations ionisantes. De plus, dans des conditions normales de prolifération, la modulation de Necdin par des essais de gain et de perte de fonction n'affecte pas la durée de vie des cellules primaires. Toutefois, en condition de stress génotoxique dû à l'exposition aux irradiations, les cellules surexprimant Necdin présentent une radiorésistance accrue de la même façon que lorsque p53 est inactivé directement. Ce résultat en cellules humaines vient appuyer l'effet observé dans les cellules de souris sur l'impact qu'aura le niveau de Necdin sur la réponse de p53 en condition de stress.

Un bref survol a été fait pour aborder de quelle façon nos résultats en culture cellulaire pouvaient se traduire dans des modèles de cancer chez l'humain. Nous avons caractérisé l'expression de Necdin dans deux types différents de cancer. D'abord, dans le cancer de l'ovaire, le niveau élevé de Necdin dans les tumeurs à faible potentiel de malignité (LMP) en comparaison aux cancers agressifs de l'ovaire de type séreux suggère que l'expression de Necdin se limite aux cellules de cancer LMP, qui présente généralement un p53 de type sauvage. Son expression est aussi retrouvée dans deux

lignées cellulaires du cancer de l'ovaire non-tumorigéniques en xéno greffe de souris, dont l'une possède un p53 fonctionnel. De plus, la caractérisation de Necdin dans les lignées cellulaires du cancer de la prostate suggère une relation entre son expression et la présence de p53 fonctionnel. Dans le cancer de la prostate, tout comme pour le cancer de l'ovaire, Necdin semble être présent dans les lignées représentant un stade moins avancé de la maladie.

L'utilisation de l'oncoprotéine virale PyLT nous a permis de révéler des propriétés intéressantes de Necdin. Nous proposons que dans certains contextes, l'expression constitutive de Necdin pourrait contribuer au cancer en retardant une réponse par p53 appropriée et possiblement en participant à l'augmentation de l'instabilité génomique. La fonction potentiellement oncogénique de Necdin quant à sa relation avec p53 que nous avons révélée requiert davantage d'investigation et les cancers caractérisés ici pourraient constituer de bons modèles à cette fin.

Mots-clés : Necdin, p53, Antigène grand T, Polyomavirus murin, carcinogénèse sénescence, cancer de l'ovaire, cancer de la prostate

Abstract

Viruses have been used extensively in cancer research and have contributed greatly to the advancement of knowledge as well as to the establishment of important concepts still valid in the field today. Currently, one of the challenges in cancer research is to better define the individual steps that contribute to the transition of a normal cell to a transformed cell. To address this important issue, we characterized a model system based on the expression of polyomavirus large-T antigen (PyLT), derived from a virus capable of inducing tumors in rodents. Importantly, PyLT is able to induce tumors in transgenic mice, although only after a latent period, suggesting that additional transforming events are necessary. Hence, the PyLT viral oncogene possesses several interesting properties, which suggest that, beside its role in immortalization, PyLT can contribute to the early events of carcinogenesis. Here, we used a cell culture model to dissect the early changes associated with the presence of PyLT.

The establishment of a gene expression profile associated with PyLT expression in a mouse cell line model allowed us to select a number of genes whose levels were modulated by the presence of this viral oncogene. Among candidate genes, we chose to further study Necdin in more details because even if only a limited number of reports existed for this protein, there was evidence suggesting that Necdin displays either tumor suppressor or oncogenic functions within different contexts. We demonstrated that, despite the proposed growth suppressor function of Necdin, its expression was not incompatible with the proliferation in the mouse NIH 3T3 cell line and in human IMR90 primary cells. Nonetheless, the inhibition of Necdin expression by shRNA conferred a proliferative advantage. We confirmed that Necdin was a p53 target gene inducible by different genotoxic stresses, although its expression was also regulated in a p53-independent manner. Moreover, Necdin acted negatively on cell cycle arrest in response to p53 activation. These results suggest that Necdin is involved in a negative feedback loop of the p53 pathway and

that abnormal elevation of Necdin expression could contribute to the disruption of the p53 tumor suppressor pathway.

p53 activation allows transitory cell cycle arrest under stress conditions and it is also involved in the establishment of a permanent growth arrest called senescence. Senescence represents a protective mechanism preventing the accumulation of mutations that could contribute to cancer initiation. As our research supports a role for Necdin in the regulation of p53 activity, we transposed the knowledge acquired from our mouse model to a human model more suitable to study senescence. The characterization of Necdin expression in human primary fibroblasts at different passages revealed that Necdin was expressed in actively proliferating young cells and its expression decreased gradually during the establishment of replicative senescence. The same phenomenon was observed during premature senescence induced by both oncogene expression and ionizing radiation exposure. Moreover, in normal growth conditions, Necdin modulation by gain- and loss-of-function assays did not affect the life span of primary cells. However, in a genotoxic stress conditions caused by irradiation, Necdin overexpressing cells presented an increase radioresistance comparable to when p53 was directly inactivated. These results in human cells supports the effect observed in mouse cells relative to the impact of Necdin levels on a p53 response under stress conditions.

We initiated preliminary experiments to address whether our results in cell culture could be translated to human cancer models. We characterized Necdin expression in two types of human cancers. First, in ovarian cancer, we observed elevated levels of Necdin expression in low malignant potential serous ovarian cancers (LMP) when compared to aggressive serous ovarian cancers. Our results suggest that Necdin expression was limited to LMPs, which usually present a wild type p53 gene. Necdin expression was also found in two ovarian cancer cell lines, which were both non-tumorigenic in a mouse xenograft assay, and interestingly one of the cell line had a functional p53. Moreover, the characterization of Necdin expression in four prostate cancer cell lines also suggested a

relationship between its expression and the presence of functional p53. In prostate cancer, as in ovarian cancer, Necdin expression seems to be detected in cell lines representing less aggressive forms of the disease.

The use of the PyLT viral oncoprotein allowed us to reveal interesting properties for Necdin. We propose that, in some contexts, the constitutive expression of Necdin could contribute to cancer promotion by delaying appropriate p53 responses and possibly promoting genomic instability. The potential oncogenic function of Necdin, and its relationship with p53 as revealed by the research described in this dissertation, requires more investigation. Preliminary results suggest that human ovarian and prostate cancers could be good models to address the role of Necdin in carcinogenesis.

Keywords : Necdin, p53, Large T antigen, murin Polyomavirus, carcinogenesis, senescence, ovarian cancer, prostate cancer

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	vi
Table des matières	ix
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des figures	xv
Liste des abréviations.....	xviii
CHAPITRE I.....	1
Introduction.....	1
1.1 Le cancer, une maladie complexe.....	1
1.1.1 Oncogènes et suppresseurs de tumeur	2
1.1.1.1 Le suppresseur de tumeur Rb.....	4
1.1.1.2 Le suppresseur de tumeur p53	6
1.1.2 Les préceptes de la carcinogénèse	9
1.1.2.1 La perturbation de la réponse aux signaux pro- et anti-préférentiels.....	10
1.1.2.2 La résistance à la mort cellulaire	10
1.1.2.3 La capacité à former de nouveaux vaisseaux.....	11
1.1.2.4 L'invasion et la formation de tumeurs à distance	12
1.1.3 La sénescence	13
1.1.3.1 Les mécanismes moléculaires impliqués dans la sénescence	14
1.1.3.2 La sénescence, l'immortalisation et la transformation	17
1.2 L'utilisation des virus pour l'étude du cancer	21
1.2.1 Les virus ou leurs composantes sont utilisés dans différents systèmes modèles	23
1.2.2 Les virus comme agents étiologiques du cancer chez l'humain	25
1.3 Les Polyomavirus	26

1.3.1	Les Polyomavirus humains.....	29
1.3.2	Le virus simien 40	30
1.3.3	Le Virus du polyome murin.....	31
1.3.4	L'antigène grand T.....	31
1.3.4.1	Transformation et immortalisation par PyLT	33
1.3.4.2	Les modèles pour l'étude de l'antigène grand T.....	36
1.4	Necdin.....	38
1.4.1	Necdin : un supprimeur de tumeur ou un oncogène?.....	40
1.4.1.1	Necdin agit sur la prolifération cellulaire	40
1.4.1.2	Necdin interagit avec p53 et affecte son activité	41
1.4.1.3	Necdin est un régulateur de la transcription	43
1.4.1.4	Necdin possède une activité anti-angiogénique.....	43
1.4.1.5	Necdin est une protéine anti-apoptotique	44
1.4.1.6	Necdin et la sénescence	47
1.4.1.7	Necdin dans les modèles <i>in vivo</i>	48
1.4.1.8	L'expression de Necdin dans les cancers	50
1.4.1.9	Les autres fonctions de Necdin.....	52
1.4.1.10	Sommaire sur les fonctions de Necdin	53
	CHAPITRE II	55
	Les objectifs.....	55
	CHAPITRE III.....	57
	Article I.....	57
	Large T-antigen expression analysis identifies Necdin, a p53-target gene, as an inhibitor of p53-mediated growth arrest.....	57
	Contribution des auteurs	57
	Abstract.....	58
	Introduction.....	59
	Results.....	62

Gene statement mapping of PyLT expressing mouse fibroblasts.....	62
Validation of a selected candidate gene, Necdin, on an extended NIH3T3 clone set. .	63
PyLT induced Necdin expression independently of Rb inactivation	64
Necdin overexpression does not affect NIH3T3 proliferation in long term experiments	64
PyLT allows bypass of p53-dependent growth arrest induced by nutlin-3	65
p53-dependent growth arrest is delayed by Necdin.....	66
Necdin is a p53-target gene induced by different genotoxic stress	68
Necdin upregulation in PyLT-expressing cells is independent of p53	68
Necdin is expressed in low malignant potential ovarian cancer	69
Discussion.....	69
Identification of functional activities associated with PyLT	70
Necdin regulation by PyLT-Ag	72
The p53-Necdin negative feedback loop	72
Necdin is expressed in the borderline ovarian cancer subtype	74
Conclusion	75
Acknowledgements.....	76
Materials and methods	76
Cell culture.....	76
Vectors and transfections.....	77
Lentiviral constructs and infections.....	77
RNA and Proteins extractions.....	78
Microarray analysis.....	78
Candidate gene expression validation.....	79
Western blotting and immunocytochemistry	79
Cell cycle analysis and proliferation.....	80
Quantitative Real-Time PCR.....	80
Bibliography	97

CHAPITRE IV	107
Article II.....	107
Necdin modulates proliferative cell survival in response to genotoxic stress	107
Abstract.....	108
Introduction.....	109
Results.....	111
SV40LT antigen does not induce Necdin expression in human fibroblasts	111
Necdin level decreases with replicative senescence	111
Premature senescence is accompanied by a decrease in Necdin level	112
Modulation of Necdin does not affect replicative aging.....	113
Necdin overexpression provides radio-resistance in human normal cells.....	115
Discussion.....	116
Necdin expression decrease as a marker of senescence	116
Necdin expression confers resistance to ionizing irradiation.	119
Conclusion	120
Acknowledgements.....	120
Materials and methods	120
Cell culture.....	120
Vectors and infection.....	121
Senescence	122
Growth arrest and FACS	122
Western blotting.....	122
Immunofluorescence.....	123
Colony formation assay	123
Bibliography	130
CHAPITRE V	136
5 Discussion.....	136
5.1 Quelle est l'importance de Necdin pour le Polyomavirus?	137

5.2	Necdin dans la carcinogenèse	140
5.2.1	Les événements entrainant la modulation de l'expression de Necdin.	141
5.2.2	Un niveau élevé de Necdin affecte la réponse anti-tumorale.	142
5.2.3	La relation entre Necdin et p53 dans la cancer	145
5.2.4	La perte de Necdin est favorable à la prolifération.....	147
5.2.5	Necdin dans le cancer de l'ovaire	150
5.2.6	Necdin dans le cancer de la prostate	152
	Conclusion	155
	Bibliographie	158
	ANNEXE I : Figures supplémentaires.....	I
	ANNEXE II : Signatures des co-auteurs	VI
	ANNEXE III : Droits d'auteurs	VII

Liste des tableaux

CHAPITRE III

Table 1 PyLT mediated changes in gene expression profile in NIH3T3 cells.	82
Supplementary data 1 Microarrays analysis containing 194 modulated genes	91
Supplementary data 1 (continued)	92

Liste des figures

CHAPITRE I

Figure 1 Le cycle cellulaire et la voie de signalisation de Rb/E2F.....	5
Figure 2 La voie de signalisation de p53	7
Figure 3 Le locus INK4 est au cœur de la sénescence.....	16
Figure 4 Le raccourcissement des télomères détermine la durée de vie des cellules humaines primaires.	19
Figure 5 Les protéines virales comme outil pour l'inactivation de p53 et Rb.....	19
Figure 6 Ligne du temps des découvertes reliées aux virus	23
Figure 7 Infection par SV40 et la transformation cellulaire	28
Figure 8 Structure protéique de l'antigène grand T du Polyomavirus (PyLT).....	32
Figure 9 PyLT lie Rb pour l'inactiver	32
Figure 10 Résumé de quelques fonctions de Necdin en lien avec la carcinogénèse	54

CHAPITRE III – Article 1

Figure 1 Validation of Affymetrix microarray data for selected genes in NIH3T3 and NIH1T clones.	83
Figure 2 Necdin as a relevant candidate.	84
Figure 3 Necdin influences the proliferation of NIH and NIH1T populations.	85
Figure 4 Nutlin-3 induces a p53-dependent growth arrest in NIH3T3 cells that is bypassed by PyLT expression.	87
Figure 5 Necdin confers resistance to p53-dependent growth arrest.....	88
Figure 6 PyLT-induced Necdin expression is p53-independent.....	89
Figure 7 Necdin expression is detected in LMP and is lower in TOV.	90
Supplementary data 1 Microarrays analysis containing 194 modulated genes by PyLT- expression in NIH3T3.....	91
Supplementary data 2 Western blot analysis of PyLT expression in selected clones used for microarrays analysis.	93

Supplementary data 3 Necdin induces growth arrest in short term experiment.	94
Supplementary data 4 More effects of Nutlin-3 stimulation	95
Supplementary data 5 Nutlin-3 stimulation of NIH and NIHLT population induce Necdin mRNA in a p53-dependent manner.	96

CHAPITRE IV – Article 2

Figure 1 Expression of SV40LT did not induce variation in Necdin levels.....	124
Figure 2 Necdin levels decrease in aging primary cells.	125
Figure 3 Premature senescence is characterized by Necdin downregulation.	126
Figure 4 Necdin modulation does not affect life span.	127
Figure 5 Depletion of Necdin expression does not induce premature senescence.	128
Figure 6 Necdin overexpression confers radioresistance.	129

CHAPITRE V

Figure 11 Modèle proposé représentant la variation du niveau de Necdin au cours de l'infection par le virus du polyome.....	140
Figure 12 La boucle d'autorégulation négative p53-Necdin	143
Figure 13 Mécanismes potentiels de régulation de la prolifération par Necdin	149
Figure 14 Expression de Necdin dans notre modèle de carcinogénèse	155
Figure 15 Dualité de la fonction de Necdin.....	156

ANNEXE I

Figure supplémentaire 1 La déplétion de Necdin dans des fibroblastes primaires humains augmente leur potentiel prolifératif en faible densité.	II
Figure supplémentaire 2 Le niveau basal de p21 est affecté par Necdin dans les NIH et NIHLT	III
Figure supplémentaire 3 Expression de Necdin dans différentes lignées cellulaires du cancer de l'ovaire.....	IV

Figure supplémentaire 4 Expression de Necdin dans différentes lignées cellulaires du cancer de la prostate.....V

Liste des abréviations

5AZA-dC	5-aza-2'-deoxycytidine
Abl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
APAF1	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>
APC	<i>Adenomatosis polyposis coli</i>
AR	Récepteur aux androgènes
ARF	<i>Alternate reading frame</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNT2	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2</i>
ATL	Mécanisme alternatif d'élongation des télomères
BAD	<i>Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter</i>
Bax	<i>BCL2-associated X protein</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BKV	Virus B.K.
Bmi-1	<i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i>
BRCA1	<i>Breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
BRCA2	<i>Breast cancer type 2 susceptibility protein</i>
CAK	Complexe Kinase activatrice de Cdk
Cbx7	<i>Chromobox homolog 7</i>
Cdc2	<i>Cell division cycle 2</i>
Cdk2	Kinase dépendante de cycline 2
Cdk4	Kinase dépendante de cycline 4
Cdk6	Kinase dépendante de cycline 6
Cdk7	Kinase dépendante de cycline 7
CDKI	Inhibiteur de Kinase dépendante des cyclines
CIP	<i>CDK-interaction protein 1</i>

CKII	Caséine kinase II
c-Myc	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CR1	Région consensus 1
CR2	Région consensus 2
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
Dnmt	<i>DNA methyltransferase</i>
DRG	<i>Dorsal root ganglia</i>
Dusp 4	<i>Dual specificity phosphatase 4</i>
E1A	<i>Early region 1A</i>
E2F1	<i>E2 promoter-binding factor 1</i>
E2F4	<i>E2 promoter-binding factor 4</i>
E6	<i>Early protein 6</i>
E7	<i>Early protein 7</i>
EBV	Virus de Epstein-Barr
ER- α	Récepteur à l'estrogène alpha
ERE	Élément de réponse à l'estrogène
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
Ets1	<i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1</i>
Ets2	<i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1</i>
FasR	Récepteur membranaire de Fas
FGF	<i>Fibroblast growth factors</i>
GSE22	<i>genetic suppressor element 22</i>
H2AX	<i>H2A histone family, member X</i>
HDAC	Histone déacétylase
HDF	<i>Human diploid fibroblast</i>
Hdm2	Homologue humain de <i>murin double minute 2</i>
Her2	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
HHV8	Herpèsvirus humain type 8

HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
hnRNP U	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U</i>
HPV	Virus du papillome humain
Hsc70	<i>Heat shock cognate protein, 70 kDa</i>
hTert	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i>
HTLV-1	<i>Human T cell leukemia virus 1</i>
Id1	<i>Inhibitor of DNA binding 1</i>
INK4	Inhibiteurs de CDK4
JCV	Virus de John Cunningham
kDa	Kilodalton
KCl	Chlorure de potassium
KO	<i>Knock out</i>
KIV	Virus KI
KSHV	Virus du Sarcome de Kaposi
LEMP	Leuco-encéphalopathie multifocale progressive
LMO4	<i>Lim only domain-4</i>
LMP	Tumeur à faible potentiel de malignité
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
LOI	<i>Lost of imprinting</i>
M1	<i>Mortality 1</i>
M2	<i>Mortality 2</i>
MAGE	<i>Melanoma antigen</i>
Mat1	Ménage à trois 1
MCV	Virus des cellules de Merkel
Mdm2	<i>Murine double minute 2</i>
MEF	Fibroblaste primaire de souris
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MMTV	<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>

Ndn	Necdin
Neu	<i>neuroblastoma/glioblastoma derived oncogene homolog</i>
NF1	Neurofibromin 1
NEFA	Nucleobindin 2
Nogo-A	<i>Neurite outgrowth inhibitor</i>
Noxa	Issue du latin pour dommage
OIS	<i>Oncogene-induced-senescence</i>
p14	Protéine de 14 kDa, correspond à ARF chez l'humain (INK4d)
p15	Protéine de 15 kDa (INK4b)
p16	Protéine de 16 kDa (INK4a)
p18	Protéine de 18 kDa (INK4c)
p19	Protéine de 19 kDa, correspond à ARF chez la souris (INK4d)
p21	Protéine de 21 kDa, aussi nommée CIP1
p27	Protéine de 27 kDa, aussi nommée KIP1
p53	Protéine de 53 kDa
p57	Protéine de 57 kDa, aussi nommée KIP2
p73	Protéine de 73 kDa
PcG	Groupe de gène polycomb
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PLC γ	Phospholipase C γ
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
Puma	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis</i>
PyLT	Antigène grand T du virus de polyome
PymT	Antigène moyen T du virus de polyome
PyV	Polyomavirus
QTL	Loci de caractères quantitatifs
Ras	<i>Harvey murine sarcoma virus protein p21</i>

RasV12	Forme mutée de Ras
Raf	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
REF52	<i>Rat embryo fibroblasts</i>
Rb	Protéine du rétinoblastome
RPA	<i>Replication protein A</i>
SA- β -Gal	<i>Senescence-associated Beta-galactosidase</i>
SAHF	<i>Senescence-associated heterochromatic foci</i>
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>
SERPINA1	<i>serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 1</i>
SERPINA5	<i>serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 5</i>
Shc	<i>Src homology and collagen protein</i>
SIPS	<i>Stress-induced premature senescence</i>
Sir2	<i>Silent information regulator 2</i>
Sirt1	Sirtuin 1
SLN	Signal de localisation nucléaire
Sp1	<i>Specificity transcription factor 1</i>
SPW	Syndrome de Prader-willi
SV40	Virus simien vacuolant 40
SV40LT	Antigène grand T du virus SV40
TDE	<i>Tumor differentially express</i>
TNF	<i>Tumor necrosis facteur</i>
TNFR1	Récepteur au TNF
TOV	Tumeur de l'ovaire
TP53	Gène codant pour le suppresseur de tumeur p53 (<i>tumor protein</i>)
TRAMP	<i>Transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate</i>
v-erbA	<i>Avian erythroblastosis virus protein A</i>
v-erbB	<i>Avian erythroblastosis virus protein B</i>
v-Kras	<i>Kirsten murin sarcoma virus protein</i>

v-myc	<i>MC29 avian myelocytoma virus protein</i>
v-sis	<i>Simian sarcomas virus protein</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine acquise
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>
WUV	Virus Wu

*« La sagesse, c'est d'avoir des rêves
suffisamment grands pour ne pas les perdre de
vue lorsqu'on les poursuit »*

Oscar Wilde

*À ma famille et mon amoureux Michel, parce que
leur amour et leur support a fait toute la différence*

Remerciements

Enfin la page est tournée. Ce fut un parcours parsemé d'embûches où j'ai appris beaucoup sur moi-même et sur la grande valeur des gens qui m'entourent. C'est pourquoi je tiens à remercier en tout premier lieu Michel Rodier, mon compagnon de vie, qui a été la première ligne de défense dans les bons et les moins bons moments. Un autre Rodier qui m'a été d'un grand secours tout au long de mes études, c'est le Dr Francis Rodier. À mes tout débuts, il m'a introduit dans le monde merveilleux de la recherche et a su me transmettre sa passion. Merci également pour m'avoir initié à l'utilisation des lentivirus, ce qui m'a grandement facilité la vie et ouvert de nombreuses portes.

L'institut du cancer de Montréal est considéré comme une grande famille. Je partage entièrement cette vision et je n'aurais pu trouver meilleur endroit pour ma formation. Dans cette famille on retrouve des chercheurs généreux de leur temps et de leur savoir qui m'ont fourni leur aide ce qui a été grandement appréciée. Il y a aussi les personnes formidables qui gravitent autour des étudiants, Maral, Nathalie et Julie, qui ne reculent devant rien pour organiser de spectaculaires levées de fond et qui favorisent notre visibilité. L'institut fournit également un support financier à ses étudiants, dont j'ai été bénéficiaire (Bourse Canderel, Fondation Marc Bourgie) et qui vient compléter les bourses du programme de biologie moléculaire et du CRCHUM, que je remercie également.

Malgré que j'ai constitué « l'unité polyome » pendant la majeure partie de mon projet, j'ai toujours été supportée par les membres de mon laboratoire qui m'ont fourni de bons conseils et un précieux coup de main. Au cours des années, j'ai rencontré à l'institut un bon nombre de personnages intéressants qui m'ont marquée de près ou de loin. Parmi ces gens qui nous marquent, il y a des amitiés qui se forgent. À Catherine, Isabelle, Katia, Lise, Philippe, Véro, « ces irréductibles » qui ne sont plus ce qu'ils étaient! Pour les bons moments passés en votre compagnie, les tapes dans le dos et l'entraide : merci!

Enfin, le plus important des remerciements s'adresse à ma directrice de recherche, le Dr Anne-Marie Mes-Masson, puisqu'un laboratoire n'a pas sa raison d'être sans son chef d'orchestre! Je la remercie infiniment de m'avoir donné le privilège de faire partie de son laboratoire et permis d'aller au bout de mes idées pour rendre cette thèse dont je suis satisfaite. La liberté qu'elle m'a accordée pour mener mon projet m'a permis de développer une grande autonomie et m'a fourni des appuis solides pour le futur.

CHAPITRE I

Introduction

1.1 Le cancer, une maladie complexe

À chaque jour, l'homme est exposé à de nombreux agents environnementaux susceptibles de provoquer des modifications génétiques. L'accumulation d'événements mutationnels successifs dans une cellule peut occasionner le développement d'un cancer, qui est une maladie qui implique plusieurs étapes indépendantes [1]. Essentiellement, une tumeur se développe lorsque les cellules se divisent de façon incontrôlée et ne meurent pas lorsqu'elles le devraient. Les efforts combinés d'un nombre grandissant de chercheurs aux quatre coins de la planète sont investis à la compréhension des mécanismes adjacents à cette maladie. Le principal obstacle réside dans la complexité de cette maladie qui peut toucher les différents tissus de l'organisme, obligeant la compréhension de divers contextes cellulaires, et implique une multitude de combinaisons de modifications moléculaires. Les efforts sont partagés pour élucider les causes, les mécanismes moléculaires, l'évolution et le traitement qui sont tous des volets qui ont leur importance dans cette maladie.

Les trois principaux facteurs de prédisposition au cancer sont l'exposition aux carcinogènes, l'hérédité et l'âge qui est le principal facteur puisque l'incidence et la mortalité augmente presque de façon exponentielle avec l'âge ce qui reflète une accumulation d'événements mutagéniques au cours de la vie [2,3,4]. L'hérédité comme facteur de prédisposition réfère entre autre aux cas familiaux de cancer qui se caractérisent par une forte incidence de cancers particuliers au sein d'une famille en raison d'une mutation transmise à la descendance [5]. Le patrimoine génétique d'un groupe ethnique peut aussi contenir certaines particularités partagées par une population qui la protège ou la prédispose à certaines maladies [6]. Par opposition au cancer dit héréditaire, le cancer sporadique est celui qui se développe sans prédispositions génétiques familiales apparentes suite à des modifications spontanées génétiques ou épigénétiques du génome et qui s'accumulent tout au long de la vie. Souvent, l'exposition d'une personne à divers agents

carcinogènes, tel que l'exposition aux rayons ultraviolets ou à des toxines présentes dans l'air, l'eau ou la nourriture, sera la cause de ces événements. La nature, la fréquence et l'intensité de l'exposition aux agents carcinogènes rencontrés privilégieront certains types de cancer [7]. À ces facteurs s'ajoute le style de vie qui est de plus en plus pointé du doigt. Le tabagisme en est un exemple connu, mais le régime alimentaire est maintenant considéré comme influent sur la prédisposition au cancer. L'obésité augmente le risque de plusieurs cancers alors que le contrôle du régime alimentaire offre un effet bénéfique dans la prévention de la maladie. Des études portant sur des modèles de rongeurs de même que sur des primates appuient l'affirmation qu'une restriction en calories a pour effet de prolonger la vie en retardant l'apparition de cancer [8,9].

La grande variabilité génétique qui est retrouvée d'un cancer à l'autre est un obstacle au développement d'un traitement polyvalent. Aujourd'hui, de nombreux efforts de recherche sont dédiés à la caractérisation du profil génétique des tumeurs afin d'identifier des voies communes rapprochant les différentes pathologies. Principalement, la mort du patient atteint d'un cancer survient dans 90% des cas lorsque la tumeur envahit d'autres sites (métastases) [10] ou encore que la tumeur affecte gravement le fonctionnement normal du ou des organes atteints. Par ailleurs, le dépistage précoce du cancer permet un meilleur pronostic en permettant de retirer ou de traiter la lésion avant qu'elle n'atteigne un stade plus avancé, donc plus difficile à traiter. Ainsi, pour aider à la prévention ou à un meilleur traitement du cancer, il est d'une grande nécessité de connaître les événements successifs qui se produisent tout au long de son développement pour permettre un meilleur dépistage et améliorer les traitements.

1.1.1 Oncogènes et suppresseurs de tumeur

Le cancer est une maladie qui prend naissance suite à des dérèglements génétiques. Deux catégories principales de gènes sont impliquées dans le processus de carcinogénèse : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur. Le proto-oncogène, c'est-à-dire la

forme normale du gène, est activé en oncogène suite à des mutations, amplification ou translocation. Dans une cellule normale, le proto-oncogène régule la prolifération en répondant aux signaux envoyés par différentes voies. Lorsque le proto-oncogène est modifié pour devenir un oncogène, il peut se retrouver sous une forme continuellement active, en quantité trop élevée ou former une chimère avec une autre protéine générant un produit avec des fonctions nouvelles ou altérées. Le mode d'action des oncogènes est généralement dominant, avec un seul allèle affecté pour générer un phénotype. À titre d'exemples, Ras, c-Myc, Her2/Neu, Cyclin D1 et Abl font partie des proto-oncogènes les plus connus qui se retrouvent modifiés en oncogènes dans différentes tumeurs.

À l'opposé des oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeur sont inactivés pour permettre le développement d'un cancer par des mutations (ponctuelles, non-sens), des délétions ou des modifications épigénétiques telle que la méthylation du promoteur qui rend le gène silencieux. Dans le cas des suppresseurs de tumeur, l'inactivation des deux allèles est souvent requise dans la carcinogénèse. C'est ce que décrit la théorie du double coup (*Two hits*) qui est venue d'évidences expérimentales lors de l'étude du rétinoblastome, un cancer héréditaire [11,12]. Dans ce cas de cancer familial, un allèle muté du gène codant pour la protéine du rétinoblastome (Rb1) est transmis de pair avec un allèle fonctionnel. Selon la théorie du double coup, c'est cet allèle normal qui maintient la fonction de suppresseur de tumeur et qui devra aussi être muté de façon sporadique pour que le cancer se développe. On parle alors de perte d'hétérozygotie (LOH pour *loss of heterozygosity*) pour décrire ce « deuxième coup » à l'allèle qui était jusque là fonctionnel. Ce modèle ne faisant intervenir que deux étapes se présente maintenant dans un tableau plus complexe où 4 à 6 événements successifs impliquant plus d'un gène sont requis pour le développement d'un cancer [13]. L'introduction de la notion d'haploinsuffisance est aussi venue étoffer la théorie du double coup de Knudson concernant les gènes suppresseurs de tumeur. L'haploinsuffisance est impliquée lorsque le produit d'un seul allèle normal n'est pas suffisant pour remplir la pleine fonction de suppresseur de tumeur, ce qui se traduit dans une tumeur par la présence d'un allèle normal et un inactif [14,15]. Parmi les multiples

suppresseurs de tumeur, mentionnons BRCA1 et 2, PTEN, VHL, APC, NF1 et WT1 pour lesquels le lien avec le cancer est clairement établi. Deux des nombreux suppresseurs de tumeur seront décrits plus en détail dans cet ouvrage : p53 et Rb. Ils ont été choisis en fonction de leur grande importance dans le domaine de même que dans notre modèle cellulaire puisque les voies qu'ils contrôlent sont dérégulées dans pratiquement, sinon, tous les cancers.

1.1.1.1 Le suppresseur de tumeur Rb

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases qui sont étroitement régulées par différentes composantes cellulaires (Figure 1, page 5). Les phases G1 et G2 (G pour *gap*) sont des phases préparatoires intercalées entre les étapes critiques S et M (synthèse de l'ADN et mitose). Lorsque des signaux mitogéniques sont transmis dans la cellule, une cascade de phosphorylations se met en place. Les Kinases dépendantes des cyclines (Cdk) fonctionnent comme leur nom l'indique en combinaison avec des cyclines et différents hétérodimères vont être présents pour réguler les phases distinctes du cycle cellulaire (Figure 1 page 5). Le complexe Cdk-Cyclin est activé via la phosphorylation par le complexe kinase activatrice de Cdk (CAK) qui est constitué d'une sous-unité catalytique Cdk7, une sous-unité régulatrice Cycline H et un facteur d'assemblage Mat1 [16,17]. Le suppresseur de tumeur Rb, faisant partie de la famille des pRb (Rb ou p105, Rb2 ou p107 et Rb3 ou p130), est encodé par le gène de susceptibilité au rétinoblastome et fait partie du point de contrôle qui régule le passage de la phase G1 à S. Rb contient de nombreux sites de phosphorylation. Dans sa forme active, Rb est hypophosphorylé et séquestre le facteur de transcription E2F sur lequel Rb exerce un effet inhibiteur [18] (Figure 1, page 5). Sous les signaux mitotiques en début de la phase G1, l'association de cyclinD/cdk4 et cyclinD/cdk6 amorce la phosphorylation de Rb. Plus tard en G1, la phosphorylation est complétée par le duo cyclinE/cdk2 et maintenue par cyclinA/cdk2 en début de la phase S. L'hyperphosphorylation de Rb l'inactive et ce faisant, libère E2F. La libération de E2F permet la transactivation des gènes requis pour la transition à travers les différentes phases,

tel que gènes codants des protéines de la machinerie nécessaire à la réplication de l'ADN soit la Thymidine Kinase, la DNA polymérase alpha et Dihydrofolate reductase; des cyclins et CDK soit Cycline E, Cycline A, CDK2 et CDC2 (CDK1). De plus, E2F1 régule sa propre expression ce qui constitue une boucle de régulation positive. L'activité CDK4 et CDK6 peut être inhibée par les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CKI) ce qui a pour effet l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 en conséquence de l'état d'hypophosphorylation de Rb. La famille des CKI se divise en deux groupes : les CIP/KIP qui rassemblent p21^{CIP}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2} et les INK4 qui incluent p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}, de même que p16^{INK4a} qui sera décrit plus loin (revue par [19,20]). La voie de signalisation de Rb/E2F est nécessaire pour le maintient d'une cellule normale et l'importance de son inactivation pour le développement d'un cancer est reflétée par la fréquence de mutations des composantes identifiées de la voie dans 90% des cancers [21].

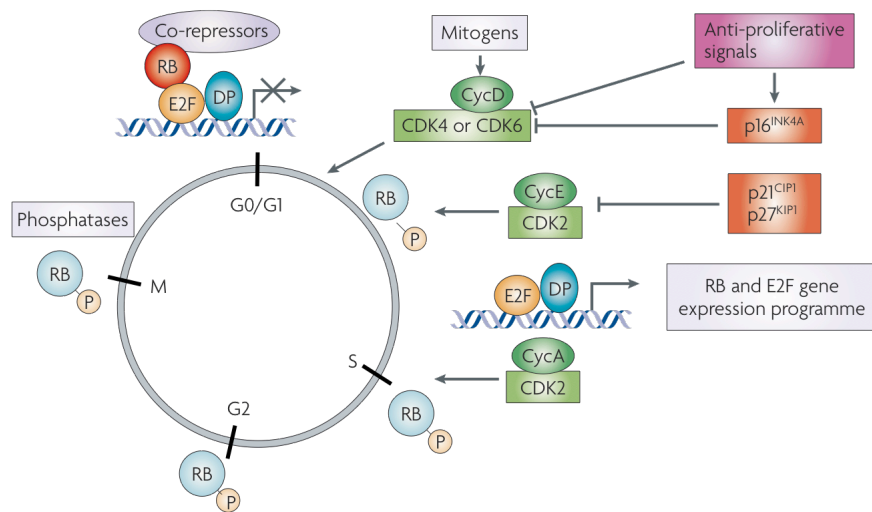


Figure 1 Le cycle cellulaire et la voie de signalisation de Rb/E2F

Les signaux mitogéniques entraînent l'activation du complexe cycline D/Cdk4 et Cdk6 qui initie la phosphorylation de Rb. Rb est maintenu phosphorylé tout au long du cycle cellulaire ce qui provoque le relâchement de E2F qui peut transactiver ses gènes cibles. La régulation de la progression dans le cycle est sous le contrôle d'inhibiteur de Cdk. (Adaptation de [22])

1.1.1.2 Le suppresseur de tumeur p53

L'intérêt initial pour p53 a été nourri par l'étude des mécanismes de tumorigénèse par le virus simien vacuolant 40 (SV40), un virus oncogénique à ADN. C'est à partir de ce modèle que p53 a été découvert par deux groupes [23,24]. D'abord identifié à tort comme un oncogène [25,26,27], le plus étudié des suppresseurs de tumeurs est maintenant largement caractérisé dans la littérature. p53 (produit du gène *TP53*) peut être considéré comme le noyau central des voies menant au contrôle de la prolifération. L'activation de p53, un facteur de transcription, résulte en une modulation de l'expression d'une centaine de gènes cibles qui agissent dans deux avenues fonctionnelles principales (Figure 2 page 7). La première implique la régulation du cycle cellulaire qui mène à l'arrêt de la prolifération [28] alors que la seconde vise à l'élimination des cellules par une mort contrôlée nommée apoptose [29]. La décision de la réponse appropriée dépend de la nature et de la force des signaux de stress qui sont captés et est largement dépendante du contexte cellulaire. p53 peut subir une multitude de modifications post-traductionnelles telles que la méthylation, l'acétylation et la sumoylation qui augmentent sa fonction apoptotique et de transactivation alors que l'ubiquitination et la neddylation inhibent l'activité de p53 (revue par [30]). Le type de modification arborée par p53 est spécifique aux signaux intrinsèques ou extrinsèques qu'il reçoit. Ainsi, après avoir reçu un signal de stress, p53 permet la production de protéines effectrices particulières à ce stress [31]. Parmi ces signaux, on retrouve une variété de dommages à l'ADN (cassures double ou simple brin, alkylation de bases, dépurination de l'ADN) qui indiquent que l'intégrité du génome est menacée et pour lesquels différents mécanismes de réparation sont employés. Ces voies de réparation contiennent des enzymes responsables de signaler le dommage à la voie de p53 (Figure 2, page 7).

Parmi les autres protéines responsables de la régulation de p53, se retrouve le régulateur principal Mdm2 (*murine double minute 2*, quelquefois appelé Hdm2 chez l'humain) [32]. Mdm2 provoque en condition normale la dégradation de p53 par un

mécanisme ubiquitine-dépendant ce qui a pour effet de maintenir un niveau basal de p53 relativement bas dans la cellule [33]. Par contre, en condition de stress, p53 subit des modifications post-traductionnelles ce qui occasionnent son relâchement de Mdm2. Ainsi, p53 libéré s'accumule dans le noyau ce qui mène à sa liaison directe à des sites spécifiques de l'ADN pour transactiver ou réprimer les gènes à proximité de ces sites (Figure 2, page 7). Mdm2 fait aussi partie des gènes cibles de p53 ce qui permet une boucle de régulation négative de la signalisation à travers la voie de p53 elle-même [34].

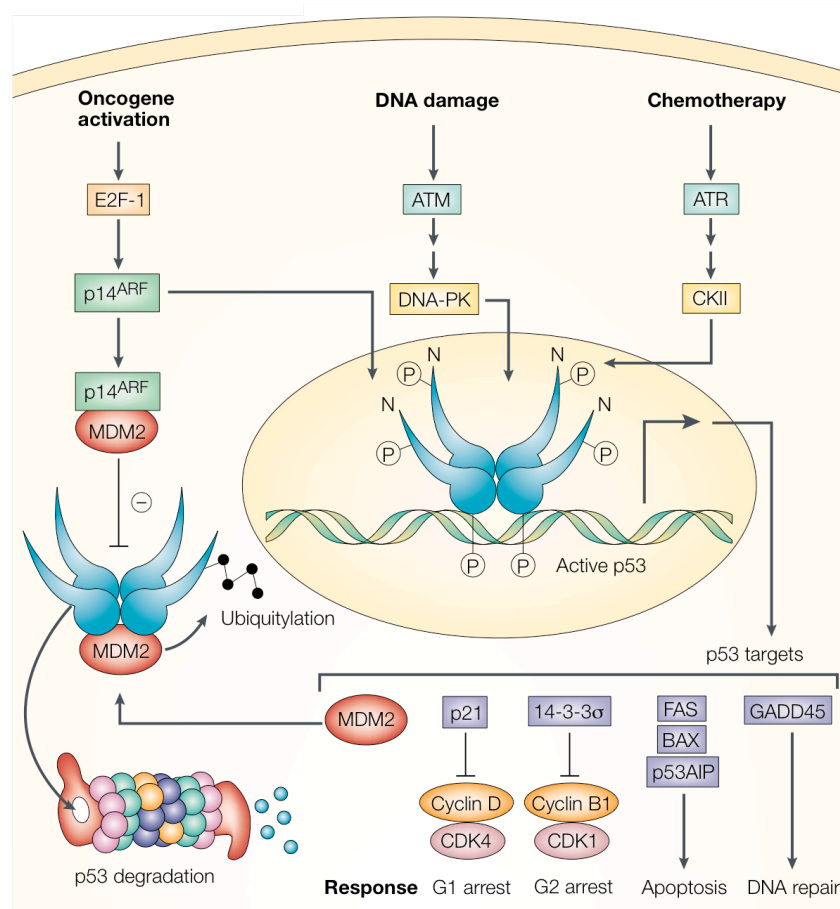


Figure 2 La voie de signalisation de p53

p53 est activé par une variété de signaux qui conduisent à son activation transcriptionnelle qui mènent à la l'expression de divers gènes cibles. Ces gènes cibles engagent différentes réponses selon la nature et l'intensité du signal. Mdm2, un gène cible de p53, est impliqué dans la boucle de régulation négative de la voie de signalisation en provoquant la dégradation de p53 par le protéasome. (Adaptation de [35])

Pour promouvoir une réparation adéquate des dommages à l'ADN, p53 a la capacité d'arrêter le cycle cellulaire en induisant l'expression de l'inhibiteur de Cdk, p21 [36,37]. p21 inhibe la plupart des Cdk régulatrices de la phosphorylation de Rb ce qui cause un arrêt du cycle cellulaire. Ce point de contrôle de la prolifération par p53 ajoute un niveau de régulation supplémentaire à la voie de Rb-E2F décrite précédemment (Figure 1, page 5). En plus de l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, p53 exerce aussi un point de contrôle dans la phase G2 [38,39,40]. p53 peut également induire un arrêt permanent de la prolifération, la sénescence [41], qui est abordée plus loin à la section 1.1.3.1 (page 14). De plus, p53 ne sert pas seulement l'expression des effecteurs en cas de dommages à l'ADN. Il semble aussi avoir un rôle actif dans la réparation des dommages en co-localisant sous sa forme phosphorylée directement aux sites de dommages en compagnie de la forme activée de l'histone H2AX (γ -H2AX) [42]. Dans certaines conditions, par exemple lorsque les dommages sont trop importants, la mort de la cellule est privilégiée plutôt que l'arrêt de la prolifération et la réparation. L'apoptose induite en réponse à l'activation de p53 peut être le résultat de l'activation transcriptionnelle de gènes pro-apoptotiques tels que *Bax*, *Noxa*, *Puma* [43] ou la répression de gènes anti-apoptotiques comme *Survivin* [44]. p53 peut aussi induire l'apoptose indépendamment de son activité transcriptionnelle en relocalisant à la membrane mitochondriale où il interagit avec Bax pour perméabiliser la membrane et enclencher le programme apoptotique [45].

L'arrêt de prolifération et l'apoptose sont deux fonctions de p53 qui ont un effet suppresseur de tumeur en prévenant la propagation de cellules potentiellement hasardeuses. Ceci est démontré dans divers modèles de souris transgéniques où l'inactivation de p53 n'affecte pas leur développement normal, toutefois ces souris présentent une susceptibilité accrue au développement de tumeurs spontanées ce qui soutient l'importance de p53 comme gardien du génome [46,47,48]. De plus, chez l'humain, une prédisposition à une variété de cancer, nommée le syndrome de Li-Fraumeni, est également retrouvée chez les individus porteurs d'une mutation germinale hétérozygote de *TP53* [49]. Ainsi, durant le

processus de tumorigenèse, la cellule doit perdre ce point de contrôle pour pouvoir survivre et proliférer, ce qui se produit dans la moitié des tumeurs [50,51]. Ce qui distingue le plus souvent la forme sauvage des formes mutées de p53 présentes dans les cancers est la perte de la capacité de liaison à l'ADN et de transactivation (revue par [52]) ce qui souligne l'importance des gènes cibles dans la réponse anti-tumorale de p53. De plus, la présence d'une version mutée de p53 peut agir en dominant négatif sur la protéine native [53]. Les conséquences de la mutation du gène *TP53* affectent directement la stabilité génomique en augmentant le taux de mutations et d'aneuploïdie qui résultent de la progression du cycle cellulaire malgré la présence de dommages non réparés et de la diminution de l'habilité à entrer en apoptose avec des dommages sévères [54].

1.1.2 Les préceptes de la carcinogénèse

Hanahan et Weinberg [1] ont publié en 2000 un résumé abondamment cité définissant les traits phénotypiques qu'une cellule normale doit acquérir pour devenir cancéreuse. Six traits y sont énoncés : 1) l'indépendance aux signaux prolifératifs, 2) l'absence de réponse aux signaux anti-prolifératifs, 3) l'évasion de l'apoptose, 4) la prolifération à l'infinie, 5) la capacité de former de nouveaux vaisseaux sanguins, et dans les cancers plus avancés 6) l'invasion du tissu et formation de tumeurs à des sites secondaires.

L'ensemble de ces capacités découle d'une accumulation de mutations uniquement possible lorsqu'une cellule montre au départ une augmentation de sa mutabilité parce qu'elle contient des défauts dans les mécanismes de réparation ou de maintien de l'intégrité du génome. La destinée d'une cellule à devenir un cancer est tributaire des avantages prolifératifs sélectifs qu'elle réussira à acquérir. Voici un survol de ces caractéristiques. La propriété de se diviser indéfiniment nécessite une plus grande entrée en matière vu son importance dans le projet de recherche décrit dans cette thèse et sera le sujet d'une prochaine section (1.1.3.2).

1.1.2.1 La perturbation de la réponse aux signaux pro- et anti-prolifératifs

En condition normale, les cellules sont gouvernées par leur environnement qui envoie des signaux prolifératifs et anti-prolifératifs qui limitent leur division. Le tout est d'assurer un équilibre entre les cellules qui meurent et celles qui se divisent pour assurer l'intégrité et la fonctionnalité d'un tissu ou d'un organe. D'importantes modifications doivent être apportées à la cellule pour lui permettre de se détacher de sa dépendance aux facteurs de croissance qui lui permettent de proliférer normalement. Différentes cascades de signalisation prennent naissance à la membrane cytoplasmique via les récepteurs membranaires et convergent vers les régulateurs du cycle cellulaire. Souvent, les tumeurs sont en mesure de générer leurs propres signaux de prolifération par des boucles autocrines ou encore miment le signal d'un récepteur engagé par un facteur de croissance par des mutations des récepteurs membranaires. La surexpression de ces récepteurs peut aussi permettre de répondre plus fortement à un niveau de signal habituel. L'inverse est applicable pour l'insensibilisation aux signaux anti-prolifératifs où une diminution de la quantité de récepteurs ou leur mutation permettent de contourner ces signaux. Les protéines qui transmettent les signaux dans une cascade qui relaye l'information jusqu'au cœur de la cellule sont aussi les cibles de mutations qui troublent leur fonctionnement habituel. Finalement, les signaux pro- ou anti-prolifératifs convergent vers la voie Rb-E2F qui maintient le contrôle du cycle cellulaire et qui est aussi inactivé de diverses manières lors de la tumorigénèse.

1.1.2.2 La résistance à la mort cellulaire

Lorsque les cellules subissent un stress excessif ou présentent un matériel génétique trop endommagé, un mécanisme d'auto-élimination de cette cellule est enclenché. L'apoptose est une mort cellulaire programmée dite « propre » puisqu'elle n'entraîne pas d'inflammation, contrairement à la nécrose, et envoie des signaux afin que d'autres cellules viennent phagocyter les corps apoptotiques générés. Deux voies principales d'activation

sont impliquées dans l'apoptose : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie extrinsèque sert à communiquer les signaux provenant de l'extérieur par l'intermédiaire de récepteurs situés à la membrane plasmique de la cellule et appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF (*Tumor necrosis facteur*) (revue par [55]). À titre d'exemple, cette voie est sollicitée par les cellules du système immunitaire pour provoquer l'élimination d'une cellule anormale. La voie dite intrinsèque va capter les signaux anormaux initiés à l'intérieur de la cellule et déclencher une cascade impliquant généralement la dépolarisation de la mitochondrie. Le dommage à l'ADN est un exemple de signal qui peut émerger de l'intérieur de la cellule [56]. Les deux voies apoptotiques vont converger vers l'activation de protéases spécialisées, les Caspases, qui sont responsables des manifestations observées au cours du processus de mort [57]. Les deux voies comprennent un bon nombre d'effecteurs qui représentent autant de possibilités de contournement de l'apoptose lorsqu'ils sont dérégulés mais la plus fréquente perte d'un régulateur de l'apoptose est celle du suppresseur de tumeur p53 [58]. En somme, une tumeur pourra prendre de l'expansion seulement si le taux de mort cellulaire n'est pas plus important que le rythme de division. La capacité d'une cellule à résister à l'apoptose aura aussi un impact clinique au moment du traitement de la tumeur puisque la chimiothérapie ou la radiothérapie reposent sur la capacité de la cellule à répondre à ces insultes par la mort.

1.1.2.3 La capacité à former de nouveaux vaisseaux

Même si une cellule acquiert la capacité de se diviser de façon anarchique et de résister à l'apoptose, elle sera à un moment limitée dans la formation de la tumeur par la diminution de l'apport en oxygène et de nutriments essentiels. La tumeur acquiert graduellement du volume suite à l'accumulation des divisions successives, pour finalement atteindre un diamètre critique où certaines cellules situées au centre de la masse ont un accès limité à ces ressources [59]. Pour assurer sa survie et continuer à croître, la tumeur à ce stade requiert la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par un processus appelé angiogenèse. L'hypoxie, c'est-à-dire la quantité insuffisante d'oxygène, va provoquer la

sélection de cellules capables d'envoyer des signaux pour recruter les cellules endothéliales nécessaires à la construction de ces vaisseaux [60]. De façon simplifiée, la tumeur provoque la formation de vaisseaux en changeant la balance entre l'inhibition de facteurs anti-angiogéniques tel que thrombospondine-1 et la sécrétion de facteurs angiogéniques comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF pour *Vascular endothelial growth factor*) et le facteur de croissance du fibroblaste (FGF ou *Fibroblast growth factor*) [61,62,63].

1.1.2.4 L'invasion et la formation de tumeurs à distance

Finalement, la dernière des capacités acquises par une tumeur décrite par Hanahan et Weinberg [1], est la capacité de quelques cellules de quitter la tumeur initiale et de former une ou des nouvelles tumeurs à un site secondaire. Ces tumeurs secondaires sont appelées métastases. Ceci réfère à une propriété qui n'est toutefois pas nécessaire pour le développement de la tumeur à proprement parler, mais qui caractérise plutôt son évolution. L'invasion de la tumeur de départ débute par des modifications du niveau d'expression des protéines d'adhésion cellule-cellule, les cadhérines, et d'adhésion à la matrice, les intégrines [64]. De plus, la sécrétion de protéases par les cellules tumorales ou par des cellules de l'environnement de la tumeur va permettre à la cellule de traverser la couche de matrice extracellulaire (ECM) pour pouvoir migrer à travers la circulation sanguine à la recherche d'un foyer secondaire propice [65]. L'intravasation du réseau lymphatique est aussi une porte d'accès vers un nouveau site qu'exploitent les cellules tumorales [66]. Les métastases associées à un cancer donné se retrouvent principalement dans des sites spécifiques comme c'est le cas du cancer du sein qui le plus souvent génère des métastases au cerveau et aux os [67], ce qui suggère que le site d'implantation n'est pas choisi aléatoirement.

1.1.3 La sénescence

Les cellules primaires humaines, lorsque mises en culture, ont une capacité limitée à se diviser après quoi elles entrent dans un état d'arrêt permanent de la prolifération nommé sénescence (M1 pour *Mortality 1*) [68]. À chaque division cellulaire se produit un raccourcissement progressif des télomères [69,70], une structure protectrice qui couvre le bout des chromosomes et en assure la stabilité. Suite à plusieurs cycles cellulaires, les télomères atteignent une longueur critique ce qui provoque de façon naturelle la sénescence. Le nombre de fois qu'une cellule humaine peut se diviser avant de s'arrêter de façon permanente est nommé la limite de Hayflick selon le chercheur qui l'a caractérisée le premier et représente en générale de 40 à 60 divisions [71]. Dans le cas des cellules primaires de souris mises en culture, la situation est légèrement différente. La sénescence est aussi observée après un certain nombre de division, mais n'est pas le résultat de l'érosion des télomères puisque chez la souris les télomères sont beaucoup plus long et la télomérase est présente de façon constitutive (revue par [72]). C'est la sensibilité des cellules murines aux dommages oxydatifs engendrés par les conditions artificielles de culture qui va provoquer l'arrêt de prolifération en fonction du temps [73,74]. Il semble que les cellules humaines présentent une moins grande sensibilité aux conditions oxydatives en raison des mécanismes de réparations plus efficaces et différents. Les cellules sénescents présentent une morphologie caractéristique élargie, aplatie et vacuolée. La présence de la beta-galactosidase (SA- β -Gal ou *senescence-associated beta-galactosidase*) qui est détectable en condition acide est un marqueur des cellules en sénescence autant *in vitro* que *in vivo* [75]. Les cellules sénescents, bien qu'elles ne se divisent plus, demeurent métaboliquement actives et sécrètent un bon nombre de facteurs capables d'agir sur leur microenvironnement et sur elles-mêmes [76,77].

Outre le raccourcissement des télomères qui caractérise la sénescence répliquative chez l'humain et les dommages à l'ADN induits par le fort taux d'oxygène chez la souris,

d'autres processus sont reconnus pour induire la sénescence des cellules en culture : c'est la sénescence prématurée (revue par [78]). Celle-ci se rapporte à la sénescence induite par un stress comme les dommages sévères à l'ADN ou l'exposition à des concentrations élevées en oxygène (*Stress-induced premature senescence* ou SIPS) [79,80] ou par l'activation d'oncogènes tels que Ras ou RAF qui mène à des signaux mitogéniques démesurés (*Oncogene-induced-senescence* ou OIS) [81,82]. Dans ce contexte, la sénescence agit comme un mécanisme anti-tumoral en prévenant la propagation de cellules potentiellement endommagées de façon irréversible ou en limitant la prolifération désordonnée engendrée par un oncogène. Les cellules en sénescence prématurée présentent les mêmes marqueurs phénotypiques que dans la sénescence réplivative et les mécanismes moléculaires responsables des deux formes de sénescence sont principalement les mêmes. Ce phénomène largement étudié *in vitro* a aussi été observé *in vivo* dans les tissus de mammifère (revue par [83]). *In vivo*, la sénescence est observée dans les lésions pré-néoplasiques alors qu'elle est principalement absente dans les tumeurs avancées [84,85,86]. Considéré comme un mécanisme essentiel pour limiter le développement de tumeur au cours de la vie, l'accumulation de cellules sénescents conduit au vieillissement et au développement de maladies associées tel l'athérosclérose (revue par [87]).

1.1.3.1 Les mécanismes moléculaires impliqués dans la sénescence

Il n'est pas étonnant que la sénescence soit reconnue comme un mécanisme anti-tumorigénique chez l'humain et la souris puisque les effecteurs principaux sont les voies des suppresseurs de tumeur p53 et Rb [41,88] qui sont rappelons-le les voies les plus fréquemment perturbées dans les tumeurs.

Dans la sénescence réplivative, la cellule perçoit le dysfonctionnement des télomères comme des dommages à l'ADN et enclenche la réponse appropriée via p53 [89]. Cette réponse aux dommages à l'ADN est également impliquée lors de la sénescence induite par les oncogènes [90,91]. p53 subit des modifications post-transcriptionnelles qui

résultent en un arrêt de la prolifération impliquant l'augmentation de p21 et l'hypophosphorylation de Rb [92]. L'apparition de certaines protéines dans les cellules sénescentes a orienté l'attention sur p16^{INK4a}, identifié comme un inhibiteur des Cdk [93,94]. p16^{INK4a} lie et inactive Cdk4 et Cdk6 ce qui conduit à l'inhibition de la phosphorylation de Rb (Figure 3, page 16). L'activité de p16^{INK4a} sur les Cdk, combinée à celle de p21, a un fort effet sur le maintien de Rb hypophosphorylé et bloque de façon irréversible la prolifération ce qui est caractéristique de la sénescence [95,96,97]. L'arrêt définitif des cellules sénescentes est relié à l'accumulation des structures hétérochromatiques dépendantes de Rb à différents sites spécifiques (*Senescence-associated heterochromatic foci ou SAHF*), entre autre aux sites des gènes cibles de E2F, pour les maintenir silencieux [98]. Ni le retrait de Rb, ni celui de p53, permettent de renverser ce phénotype une fois qu'il est établi.

Dans la sénescence non-téломérique, l'envoi de signaux mitogéniques supraphysiologiques par l'ajout de certains oncogènes, par exemple l'activation de la voie Ras-Raf-MEK, mène aussi à l'activation de p16^{INK4a}. Le tableau dressant la coordination des facteurs qui régulent l'expression de p16^{INK4a} n'est pas encore tout à fait clair, mais certains mécanismes semblent être acceptés pour la sénescence répllicative et prématurée. Les facteurs de transcription Ets1 et Ets2 sont responsables de l'induction de l'expression de p16^{INK4a} suivant l'expression d'oncogènes mitogéniques de même que dans la sénescence répllicative [99]. Id1 est un inhibiteur de Ets2 et son expression diminue avec la sénescence relevant la répression sur p16^{INK4a} [99]. De plus, certains membres du groupe de gène polycomb (PcG) agissent négativement sur le locus complet INK4/ARF tel que Bmi-1 et Cbx7. L'expression de chacun diminue avec l'apparition de la sénescence alors que tous deux rallongent la vie proliférative lorsque surexprimés dans des cellules humaines [100,101,102].

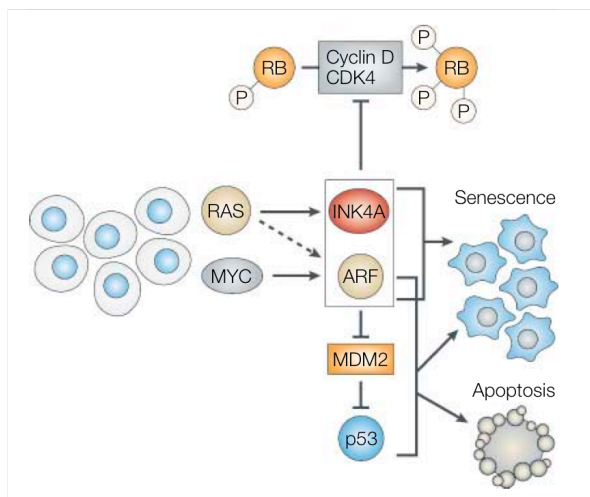


Figure 3 Le locus INK4 est au cœur de la sénescence

p14^{ARF} et p16^{INK4A} sont les produits du locus INK4 (dans l'encadré). En réponse à des signaux prolifératifs inappropriés, leur expression est induite et ils provoquent l'activation des suppresseurs de tumeur p53 et Rb respectivement. L'activation de ces voies est aussi impliquée lors de la sénescence répllicative ou causée par les dommages à l'ADN. (Adaptation de [103])

Des résultats contradictoires laissent planer le doute sur l'implication de p14^{ARF} dans la sénescence répllicative et non-téломérique chez l'humain [104,105]. p14^{ARF} ne semble pas induit par une stimulation oncogénique dérégulée [81,95,105] et son expression au cours de la sénescence répllicative demeurent inchangée [105] ou augmente [104] selon différents auteurs. La capacité de p14^{ARF} d'agir comme suppresseur de tumeur en induisant la sénescence est toutefois appuyée par un arrêt de prolifération permanent suivant sa surexpression dans les cellules primaires humaines [104] tout comme c'est le cas par exemple des inhibiteurs de CDK p16^{INK4a} et p21 [106]. De plus, il est clair que la surexpression de E2F1 induit la sénescence dépendante de la modulation de l'expression de p14^{ARF} [104], qui est un gène cible de E2F1 [107]. L'augmentation de p14^{ARF} contribue à l'activation de p53 en interagissant avec Mdm2 pour l'inactiver ce qui cause la stabilisation et l'activation de p53 [108] (Figure 3 page 16 et Figure 2 page 7). Ainsi, une intéressante chaîne de signalisation relie les deux principaux suppresseurs de tumeur Rb et p53 : à travers la signalisation de Rb-E2F1 émerge l'expression de p14^{ARF}, un inhibiteur de p53, alors que de la voie de p53 on obtient l'expression de p21 qui régule les inhibiteurs de Rb (Figure 3, page 16)

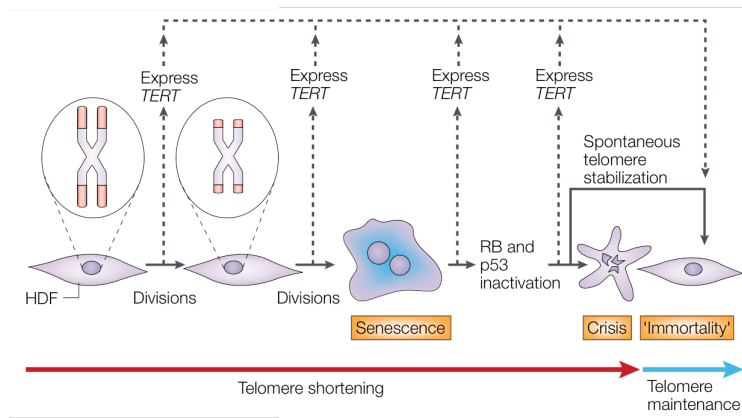
Il est intéressant de noter que les protéines p14^{ARF} (p19^{ARF} chez la souris) et p16^{INK4a} sont les produits d'un même locus (INK4/ARF) via épissage alternatif [109] qui vont agir sur deux voies distinctes : l'un menant à l'inactivation de p53 et l'autre à l'hypophosphorylation de Rb. La localisation de ces deux gènes sur le même locus constitue en quelque sorte une faiblesse dans le mécanisme anti-cancer de la cellule puisque la perte de ces gènes simplement par un seul événement entraîne un impact sur les deux voies majeures de régulation de la prolifération. Toutefois, l'importance de ces suppresseurs de tumeur semble être différentes selon l'espèce. Alors que les évidences montrent que la perte de p16^{INK4a} s'avère être le plus souvent impliquée dans les cancers chez l'humain, chez la souris c'est p19ARF qui semble être le plus important dans la sénescence et le cancer [105].

1.1.3.2 La sénescence, l'immortalisation et la transformation

Un des événements essentiels à la carcinogénèse est la capacité que la cellule doit acquérir de se diviser indéfiniment [1]. C'est ce que l'on nomme l'immortalisation et ce phénomène s'avère étroitement relié à la sénescence. Le raccourcissement des télomères, qui semble être le senseur du vieillissement de la cellule, limite la prolifération puisque les cellules humaines somatiques normales n'expriment pas la télomérase [110]. Il en est autrement dans les cellules cancéreuses humaines, où l'activité de la télomérase peut être détectée dans 85-90% des tumeurs [110]. Dans les cancers où la télomérase n'est pas retrouvée active, un mécanisme alternatif d'élongation des télomères (ATL) par recombinaison peut être employé [111]. L'activation de la télomérase permet d'allonger la durée de vie de certaines cellules humaines [112,113] (Figure 4, page 19) alors qu'inversement, l'inhibition de l'activité télomérase dans certaines cellules tumorales limite leur croissance [114]. La reconstitution de l'activité de la télomérase dans les cellules normales se fait par l'ajout de la sous-unité catalytique hTert (*Human telomerase reverse transcriptase*) [112]. Les exigences pour l'immortalisation sont différentes selon le contexte cellulaire dans les cellules normales et ce principe a largement été étudié *in vitro*.

Alors que des fibroblastes humains et certaines cellules épithéliales peuvent être immortalisés par le seul ajout de hTert, les kératinocytes et quelques cellules épithéliales humains requièrent des événements supplémentaires pour se diviser indéfiniment [112,115].

Le contournement de la sénescence répliquative dans les cellules humaines peut se faire par l'inactivation combinée des voies de signalisation de p53 et de Rb bien que l'inactivation d'une seule de ces deux voies aura pour effet d'allonger quelque peu la vie de certaines cellules primaires en permettant quelques doublements supplémentaires [41,88,116,117]. L'inactivation en simultanée de ces deux voies peut être réalisée par l'utilisation de protéines virales (Figure 5, page 19) tels que l'antigène grand T de SV40 (SV40LT) qui inactive à la fois les deux voies en interagissant avec Rb et p53 [118,119,120,121] ou avec une combinaison des protéines virales E6 et E7 du virus du papillome humain (HPV) qui ciblent p53 et Rb respectivement [41,122,123,124]. Ceci démontre d'ailleurs un contexte important dans lequel les protéines virales sont largement utilisées comme outil pour modéliser et comprendre des mécanismes moléculaires clés dans la sénescence et de ce fait de la carcinogénèse. Toutefois, même avec l'inactivation des deux suppresseurs de tumeur, la cellule qui peut proliférer plus longtemps va entrer dans une deuxième phase d'arrêt de la prolifération appelée crise (M2 ou *Mortality 2*) puisqu'en absence de la télomérase, les télomères continuent leur érosion graduelle à chacune des divisions [125] (Figure 4, page 19). Dans cet état instable de crise où beaucoup de cellules meurent, il est extrêmement rare d'observer l'émergence de cellules humaines immortelles [126,127].



cellulaire (ici en exemple les fibroblastes diploïdes humains (HDF)), l'ajout de la sous-unité télomérase à différent stade permet d'immortaliser les cellules. (adaptation de [128])

Figure 4 Le raccourcissement des télomères détermine la durée de vie des cellules humaines primaires.

La sénescence répliquative résulte du raccourcissement des télomères à chaque division. L'inactivation de Rb et p53 permet de prolonger la vie malgré l'érosion des télomères jusqu'à qu'ils atteignent une longueur critique. Alors la cellule entre en crise. Dans certain contexte

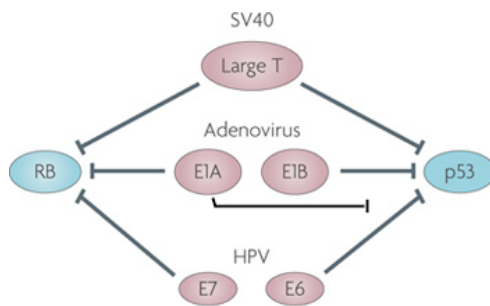


Figure 5 Les protéines virales comme outil pour l'inactivation de p53 et Rb

Les protéines de trois différents virus à ADN sont couramment utilisées pour inactiver indépendamment Rb et p53 ou de façon concomitante dans le cas de l'antigène grand T de SV40 (Large T) et de E1A. (Adaptation de [129])

Selon le modèle de la carcinogénèse, des événements supplémentaires à l'immortalisation surviennent dans la cellule pour atteindre la transformation. Toutefois, les principes de la transformation établis à partir de l'étude des cellules de rongeurs n'ont pu être transposés simplement aux cellules humaines. L'introduction de différentes combinaisons d'oncogènes s'est avérée inefficace pour rendre les cellules humaines transformées, alors que la collaboration de deux oncogènes tels que Ras et Myc transforme efficacement les cellules de rongeurs [130,131,132,133]. Ces évidences révèlent que chez l'humain, des mécanismes de défense plus complexes existent et passent par des voies redondantes. Ceci est appuyé par le fait que l'immortalisation de cellules de rongeurs peut

se produire de façon spontanée alors que chez l'humain, pour obtenir une population qui se divise indéfiniment la combinaison de plusieurs événements est souvent requise. Conscient que la différence majeure entre l'humain et la souris réside dans la longueur des télomères et que cette différence peut être délétère pour la transformation des cellules humaines, Hahn et ses collaborateurs [134] ont été les premiers à combiner RasV12 (une forme mutée de Ras) et SV40LT (qui inactive p53 et Rb) avec l'ajout de la sous-unité catalytique hTert. Ils démontrent ainsi que l'association de ces quatre événements est nécessaire et suffisante pour la transformation de fibroblastes humains normaux et appuient l'importance de l'immortalisation dans les étapes dans la carcinogénèse. La transformation oncogénique *in vitro* de cellules épithéliales mammaires (HMEC) [135], de rein [134], de poumons [136], de même que de l'épithélium de surface de l'ovaire (mésothélium) [137] est aussi possible par la même combinaison d'événements. Parmi les autres combinaisons d'oncogènes qui ont servi à la transformation de cellules primaires se retrouve aussi l'association de Mdm2, E1A de l'adénovirus et RasV12 [138]. Encore une fois, dans cette combinaison on retrouve un inhibiteur de p53 (Mdm2), un inhibiteur de Rb (E1A) et un activateur de la voie mitogénique qui permet l'indépendance aux facteurs de croissance (RasV12). Étonnement, dans cette étude la télomérase n'a pas été ajoutée, toutefois les tumeurs obtenues suite à l'injection de ces cellules à des souris immunodéficientes présentent toutes une forte activité télomérase ce qui suggère une pression sélective pour des cellules qui récupèrent cette activité [138].

Ainsi, l'inactivation de Rb et p53 est donc une règle de base pendant la carcinogénèse qui est simulée par l'utilisation de protéines virales dans ces modèles *in vitro* (Figure 5, page 19). Il existe de nombreuses façons d'inactiver les deux voies chapeautées par p53 et Rb par des altérations qui sont communément retrouvées dans le cancer. Parmi les principaux mécanismes d'inactivation de la voie de p53 se retrouvent la délétion ou « *silencing* » du locus INK4a (p14/p19^{ARF}), l'amplification de mdm2, la présence de la protéine virale E6 du virus du papillome humain, la mutation ou perte du gène p53 lui-même. En fait, les mécanismes qui ont pour conséquence la diminution de l'activité de p53

peuvent intervenir dans le développement d'une tumeur. La voie de signalisation de Rb aussi est dérégulée dans la majorité des cancers chez l'humain par les différents mécanismes suivants: la perte de p16^{INK4a}, l'amplification de cyclin D et/ou CDK4, la mutation ou la perte de Rb, la présence de la protéine virale E7 du virus du papillome humain et l'augmentation de E2F1 (revue par [139,140]).

1.2 L'utilisation des virus pour l'étude du cancer

Les virus sont depuis longtemps utilisés pour l'étude de la carcinogénèse et ont contribué grandement à l'avancement des connaissances de même qu'à l'établissement de concepts encore valables aujourd'hui. Il faut retourner loin en arrière pour rencontrer les premières démonstrations que les virus peuvent être un agent étiologique du cancer (Figure 6 page 23). Rous et ces collègues étudiaient, il y a longtemps, la formation de tumeurs aviaires qui étaient transmissibles à des poulets sains par un extrait filtré de ces tumeurs [141]. De la même façon, Richard Shope montre en 1932 qu'il peut transmettre d'un lapin à un autre la formation de fibrome en injectant un extrait issu d'un lapin malade à un animal sain qui développera la maladie [142]. Ils révèlent ainsi l'existence de virus oncogéniques à ARN et à ADN.

Le virus du sarcome de Rous découvert par Peyton Rous va mener, plusieurs années plus tard, à une grande avancée dans le domaine du cancer. C'est par l'étude de ce virus que le premier oncogène a été découvert et ce gène a été nommé v-src [143]. En identifiant ce qu'ils croyaient être une protéine virale au pouvoir transformant, ils ont mis à jour un gène qui correspondait en fait à une séquence appartenant au génome cellulaire de l'hôte qui a été intégrée dans la séquence du rétrovirus [144]. Cette séquence empruntée à la cellule n'est pas nécessaire à la réplication du virus comme l'a démontré la délétion ou la mutation de v-src qui rend le virus incapable de former des tumeurs malgré le fait qu'il puisse toujours se reproduire [145]. Suite à cette découverte, nombreux sont les chercheurs qui ont poursuivi la quête des oncogènes viraux et ont identifié une série de nouveaux oncogènes tels que v-sis (simian sarcomas virus), v-myc (MC29 avian myelocytoma virus),

v-erbA et v-erbB (Avian erythroblastosis virus) et v-Kras (Kirsten murin sarcoma virus). La nomenclature employée pour différencier le gène introduit dans la séquence virale de celui de l'homme utilise un « v » ou un « c » devant le gène selon l'origine. Dans le même ordre d'idée, la recherche du site d'intégration des rétrovirus dans des tumeurs a aussi permis de repérer des gènes avoisinant qui sont surexprimés sous l'effet des promoteurs forts de la séquence virale.

Dans le cas des virus oncogéniques à ADN, la situation s'est révélée différente ce qui a permis à l'étude des protéines virales de prendre un nouveau virage. Les virus à ADN ne transportent pas de séquences cellulaires dans leur génome, mais contiennent leurs propres oncogènes qui vont interférer avec les protéines cellulaires pour promouvoir les conditions favorables à la réplication virale en entraînant par la même occasion un dérèglement de plusieurs points de contrôle de la cellule. Les protéines qui régulent la prolifération sont des cibles privilégiées des protéines de virus à ADN ce qui a permis d'élargir les connaissances principalement sur les suppresseurs de tumeur. Comme mentionné plus tôt, le plus connu des suppresseurs de tumeur p53 a été découvert grâce à l'étude d'un virus à ADN. Toutes ces découvertes à propos des virus ont pavé la voie à l'élucidation des mécanismes impliqués dans les cancers humains, bien que majoritairement ceux-ci ne soient pas induits par des virus.

Les avancées actuelles des connaissances sur le cancer sont de plus en plus associées à l'utilisation de la génomique. La présence de protéines virales dans une cellule a assurément un impact au niveau transcriptionnel et à l'ère de la génomique, les nouvelles révélations que les virus peuvent nous livrer aujourd'hui le seront en partie par l'analyse du profil d'expression des cellules qui les contiennent.

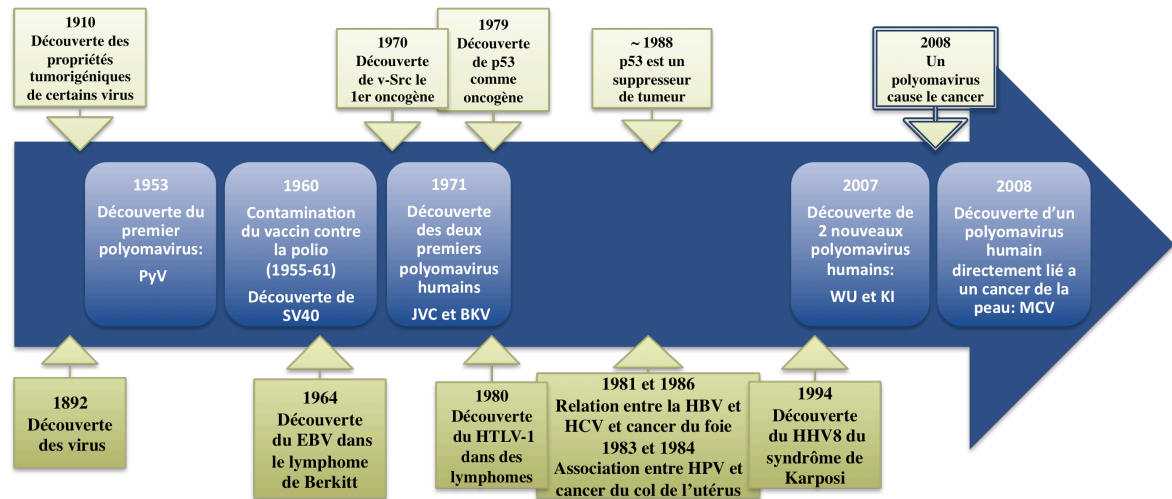


Figure 6 Ligne du temps des découvertes reliées aux virus

Sur la ligne principale figurent les dates importantes dans la découverte des différents Polyomavirus. Les encadrés du bas recensent l'apparition des autres oncovirus dans le temps. Les encadrés du haut mettent en valeur l'arrivée de certains concepts de la carcinogénèse.

1.2.1 Les virus ou leurs composants sont utilisés dans différents systèmes modèles.

Le besoin de comprendre les mécanismes sous-jacents de la carcinogénèse a poussé le développement de techniques et de modèles *in vitro*. La culture cellulaire en monocouche est un outil important pour l'étude du cancer et il existe de nombreux modèles de lignées cellulaires pour la plupart des types de pathologie. Souvent difficiles à obtenir, entre autre à cause du choc que génèrent les conditions artificielles de mise en culture, les lignées cellulaires émergent rarement naturellement d'un tissu ou d'une tumeur. C'est pourquoi certains chercheurs choisissent d'introduire dans ces cellules des protéines virales, par exemple SV40LT ou E6 et E7, pour permettre d'établir plus facilement les lignées cellulaires [146,147]. De plus, l'immortalisation de cellules primaires grâce aux protéines virales permet d'élargir l'éventail des modèles pour étudier différents stades de la maladie

comparativement aux cellules extraites d'une tumeur qui dépeignent une finalité particulière.

Pour évaluer le potentiel tumorigénique du gain ou de la perte de fonction d'une protéine d'intérêt, des changements phénotypiques peuvent être observés et mesurés suite à son expression dans un système modèle cellulaire. Ces techniques ont été largement utilisées et perfectionnées lors des premières études de carcinogénèse qui, rappelons-le, portaient essentiellement sur la transformation de cellules par les oncogènes viraux. Parmi les phénotypes étudiés, on retrouve la capacité de croître en faible quantité de sérum, la perte d'inhibition de contact visible lorsque les cellules poussent l'une sur l'autre pour former un foyer, la croissance en agar mou reflétant la capacité à proliférer en absence de support à une matrice, le potentiel migratoire et invasif. La plus convaincante des méthodes pour démontrer la transformation d'une lignée cellulaire est la formation de tumeurs lorsqu'injectée en souris dépourvues de système immunitaire. Cette technique a aussi été employée pour caractériser les virus oncogénique et pour mieux comprendre laquelle ou lesquelles de ses composantes étaient responsables du phénotype [148]. Enfin, la production d'animaux transgéniques est l'étape ultime pour confirmer le potentiel d'une protéine, mais demeure coûteuse et fastidieuse. À cette étape aussi, certaines composantes des virus sont mises à profit. Par exemple, le promoteur du virus MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) est couramment utilisé pour diriger l'expression d'un transgène dans les tissus mammaires puisqu'il contient des éléments régulateurs qui répondent aux hormones et permet d'atteindre des niveaux d'expression élevés du transgène [149]. Le modèle transgénique du cancer de la prostate TRAMP (*transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate*) [150] qui récapitule fidèlement le développement et l'évolution du cancer de la prostate humain tire aussi profit d'une protéine virale : l'antigène grand T du virus SV40. Certaines souris transgéniques combinent même à la fois promoteur et oncogène viraux comme c'est le cas du modèle murin MMTV-PyMT [151], l'un des modèles murins de cancer du sein les plus étudiés, qui rallie l'antigène moyen T du Polyomavirus au

promoteur MMTV. Ce ne sont ici que quelques exemples de la vaste utilisation des virus dans l'étude de la carcinogénèse.

1.2.2 Les virus comme agents étiologiques du cancer chez l'humain

Les virus ne sont pas que des modèles de cancer chez les animaux. Il est reconnu que certains virus sont des agents biologiques qui figurent parmi les agents carcinogènes chez l'humain. Il est estimé que de 10 à 15% de tous les cancers humains confondus sont reliés à l'infection par un virus alors qu'un autre 5% pourrait être attribué aux bactéries et parasites (revue par [152]). Il est parfois difficile de trancher sur la relation entre la présence de virus et le développement d'un cancer chez l'humain puisque plusieurs critères doivent être rencontrés et que même la nature de ces critères est sujet de débat (revue par [152]). Par exemple, la séquence du virus de même que des composantes du virus pour lesquelles des fonctions oncogéniques ont été mises en évidence doivent être retrouvées dans la tumeur. Il doit aussi exister une relation épidémiologique significative entre la présence du virus ou de ses composantes chez les individus atteints de cancer en comparaison aux individus exempts de maladie. Souvent, la relation entre l'immunodéficience et le développement de certains cancers fait suspecter l'intervention d'un virus oncogénique comme agent étiologique.

La relation entre le virus du papillome humain (HPV) et le cancer du col de l'utérus est maintenant une certitude. Les types identifiés comme haut risque, HPV-16 et HPV-18, sont l'agent causal dans 70% des cas de cancer du col de l'utérus alors que dans l'ensemble plus de 99% des tumeurs présentent la séquence d'un HPV [153]. Un vaccin a été récemment développé contre ce virus [154]. Une telle avancée est d'une grande importance pour diminuer le taux de cancers viro-induits puisque prévenir l'infection reste la meilleure défense pour éviter ce type cancer. Parmi les sept virus associés au cancer (Figure 6 page 23) se retrouve aussi HHV8 (aussi connu sous KSHV), un virus à ADN responsable du Sarcome de Kaposi [155]. Autrefois une maladie rare, l'incidence du sarcome de Kaposi

augmente drastiquement en parallèle avec l'augmentation des infections au virus de l'immunodéficience acquise (VIH), qui a été le premier virus pointé du doigt à tort comme cause du sarcome de Kaposi. La présence du VIH affaiblit le système immunitaire et rend l'hôte plus propice à l'infection persistante par un second virus. Les oncovirus peuvent aussi être reliés à des maladies généralement sans conséquence. C'est le cas du virus de Epstein-Barr (EBV) qui est l'agent étiologique de la mononucléose infectieuse mais qui est aussi à l'origine de certaines tumeurs, principalement le lymphome de Burkitt [156]. L'Hépatite virale est une maladie avec différents degrés de sévérité qui peut évoluer vers une forme grave comme le cancer et peut être associé aux virus. Alors que le virus de l'hépatite B est un virus à ADN, celui de l'hépatite C en est un à ARN mais tous deux sont associés au cancer du foie par des mécanismes qui sont différents [157,158]. Le HTLV-1 (*Human T cell leukemia*), le premier rétrovirus oncogénique trouvé chez l'homme, est lui responsable de deux maladies sévères soit la myélopathie et la leucémie [159,160]. Finalement, très récemment, soit en 2008, un nouveau Polyomavirus (MCV) responsable du cancer des cellules de merkel a été mis à jour [161]. Ceci laisse entrevoir que d'autres virus feront leur apparition dans le répertoire des oncovirus avec le perfectionnement des technologies à large spectre. L'existence de similarités quant aux mécanismes impliqués dans les cancers induits ou non par les virus permet d'affirmer que les découvertes faites dans l'un des deux domaines contribuent aussi à l'avancement des connaissances dans l'autre.

1.3 Les Polyomavirus

La famille des Papovaviridae regroupent deux genres distincts: les Papillomavirus, desquelles font partie le HPV, et les Polyomavirus qui nous intéressent. Les Polyomavirus sont des virus à capsidie icosaédrique non enveloppée qui contient un ADN circulaire double brin compacté sous forme de mini chromosome grâce aux histones cellulaires [162]. Il existe de nombreuses souches de Polyomavirus capable d'infecter une grande diversité de vertébrés incluant les oiseaux, les bovins, les primates, les rongeurs et l'humain [163].

Suite à l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule, le génome se libère de la capsid au niveau du cytoplasme et le contenu génétique est exporté au noyau où la réplication pourra être réalisée. La reconstitution de nouvelles particules virales se fait au sein du noyau et elles sont relâchées suite à la lyse de la cellule hôte ou, plus rarement, par bourgeonnement. Le cycle viral complet demande de 48 à 72h.

Le génome viral contient deux régions transcrites dans une orientation opposée qui génèrent le transcrit précoce et le transcrit tardif [164,165,166]. Les protéines précoces exprimées à partir de l'ADN virale sont le produit de l'épissage alternatif d'un même transcrit et sont nommées « T » pour « *tumor antigen* » : le minuscule (tT), le petit (sT), le grand T (LT) et le moyen (mT), ce dernier étant retrouvé uniquement chez la souche murine [167]. Tous les antigènes T contiennent une courte région amino-terminale commune dû à la superposition des séquences dans un génome viral concis (environ 5 Kb) et une région carboxi-terminale unique pour chacun qui est le résultat d'un décalage de cadre de lecture [168]. Ces protéines sont dites précoces parce qu'elles sont exprimées avant la réplication du génome viral et ont pour fonction de promouvoir la production de copies de l'ADN virale en prenant le contrôle de la machinerie cellulaire. Le transcrit tardif sert, quant à lui, à l'expression des protéines de structure de la particule virale VP1, VP2 et VP3. De plus, il a été énoncé récemment que les virus, tout comme les cellules de mammifère et les végétaux, pouvaient exprimer des micro-RNA (miRNA) (revue par [169]). La séquence génomique du PyV code pour 2 miRNA qui ont pour fonction de limiter l'expression du transcrit précoce, mais ces miRNA ne semblent pas intervenir dans la réplication virale ni dans la capacité de transformation *in vitro* [170].

Les Polyomavirus sont aussi qualifiées de petit virus à ADN oncogénique en raison de leur capacité à transformer les cellules *in vitro* [171]. Dans les cellules permissives, l'infection par le Polyomavirus donne lieu à la réplication de la particule virale, la lyse et la mort de la cellule hôte (Figure 7, page 28). Dans le cas où le virus infecte une cellule qui est non-permissive à sa réplication, la séquence peut être intégrée au génome à des sites

aléatoires et généralement, seulement le transcrit précoce sera exprimé (Figure 7, page 28). L'intégration de la séquence virale est un événement accidentel et peu fréquent puisque les Polyomavirus ne possèdent pas d'intégrase. De plus, des cellules infectées par un virus déficient peut aussi dégénérer en transformation. C'est principalement la protéine grand T qui confère les propriétés transformantes pour la plupart des Polyomavirus, à l'exception du virus du polyome murin qui contient un antigène grand T légèrement différent ne possédant pas cette capacité et qui sera décrit plus bas (Section 1.3.4). Sommairement, l'antigène grand T est capable de promouvoir la progression dans le cycle cellulaire en absence de signaux mitogéniques en inactivant Rb [121], il permet de résister à l'apoptose et à l'arrêt du cycle cellulaire en interagissant avec p53 en plus de causer de l'instabilité chromosomique [172,173] tous des éléments qui font de cette protéine un excellent oncogène.

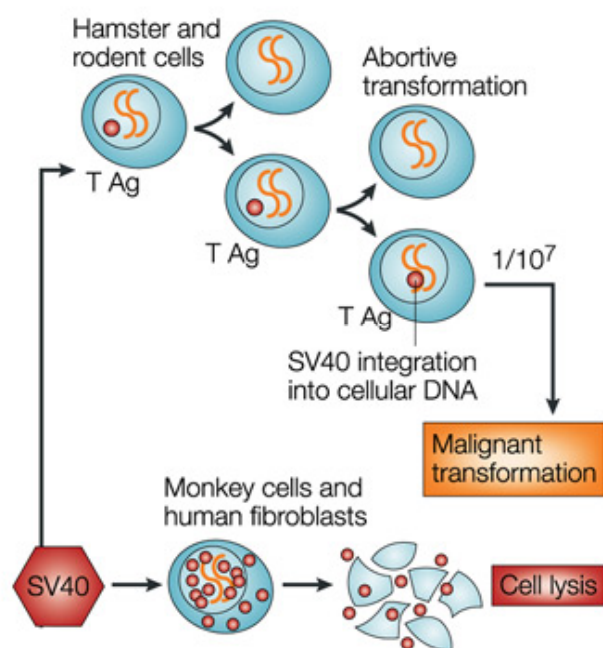


Figure 7 Infection par SV40 et la transformation cellulaire

Le virus SV40, un polyomavirus, provoque une infection lytique ou la transformation de façon type cellulaire spécifique. L'infection d'une cellule permissive se conclut par la lyse de la cellule et le relâchement de particules virales. Dans les cellules non-permissives, le génome demeure sous forme d'épisome et ne sera pas transmis aux cellules filles. La transformation se produit seulement si la séquence s'intègre au génome de la cellule hôte. (Adaptation de [174])

1.3.1 Les Polyomavirus humains

Le virus JC (JCV) a été découvert en 1971 et nommé par les initiales de John Cunningham, un patient atteint de leuco-encéphalopathie multifocale progressive (LEMP) [175]. Le virus BK (BKV), découvert dans la même année, a été isolé à partir de l'urine d'un patient dont les initiales étaient B.K. ayant subi une transplantation rénale et souffrant de néphropathie [176]. Le BKV subsiste dans l'organisme en infection persistante mais latente des reins et du système urinaire. Malgré que ces virus soient retrouvés de façon pratiquement ubiquitaire dans la population, ils provoquent la maladie seulement chez des personnes immunodéficientes ou immuno-supprimées. Le JCV et le BKV sont depuis longtemps suspectés comme agents étiologiques du cancer, mais les résultats contradictoires continuent de s'accumuler et ne permettent toujours pas de conclure à ce sujet. Par contre, l'infection par le JCV et BKV de rongeurs et de cellules en culture occasionne la formation de tumeur et la transformation respectivement, ce qui démontre leur réel potentiel oncogénique [177,178,179]. Dans les essais en culture cellulaire, l'antigène grand T de BKV transforme plus efficacement que celui de JCV et tout deux sont moins efficaces que celui de la souche simienne SV40, plus régulièrement utilisée [179].

Il fallut attendre jusqu'en 2007 pour la découverte de deux autres Polyomavirus affectant l'humain (Figure 6, page 23). Le troisième Polyomavirus nommé KI a été identifié dans le tractus respiratoire lors d'un criblage pour la découverte de nouveaux virus pouvant infecter l'humain [180]. Ce virus est retrouvé dans une faible proportion de la population étudiée (0,5-1%). Le quatrième Polyomavirus, Wu, a lui aussi été identifié à partir de sécrétions du tractus respiratoire. Le taux d'infection est faible (43/2135) et est dispersé géographiquement puisqu'on le retrouve en Australie autant qu'aux Etats-Unis [181]. Jusqu'à maintenant, aucune pathologie n'est associée aux virus KI et Wu.

La découverte récente du cinquième Polyomavirus humain a généré un regain d'intérêt pour ces virus et leur implication potentielle dans le cancer. Le MCV ou MCPyV (*Merkel cell virus ou Merkel cell polyomavirus*) a été découvert dans 8 cas sur 10 de cancer des cellules de Merkel [161] qui est une tumeur cutanée neuroendocrine maligne rare qui touche plus souvent les zones photoexposées. La séquence du virus de même que certaines protéines virales ont été détectées dans les tissus tumoraux et sont absents des cellules saines. De plus, sa séquence est aussi retrouvée dans des lignées cellulaires de carcinome des cellules de Merkel couramment utilisées en recherche [182]. Il est ainsi le premier des Polyomavirus à être officiellement reconnu comme agent étiologique d'un cancer chez l'humain.

1.3.2 Le virus simien 40

Bien avant la découverte de Polyomavirus pouvant directement infecter l'humain, la découverte du Virus simien vacuolant 40 (SV40) a été au cœur d'une grande controverse dans les années 1960. Ce virus a été isolé à partir des cellules primaires de rein de singe qui étaient utilisées pour la production des vaccins contre la poliomyélite. Ainsi, des millions de personnes qui ont reçu le vaccin Sabin ou Salk ont aussi potentiellement été contaminées par un virus qui, quelques temps plus tard, s'est montré capable d'induire des tumeurs aux hamsters ce qui a donné l'alarme [183,184,185]. Tout comme le BKV et le JCV, le rôle de SV40 comme agent étiologique du cancer chez l'humain demeure controversé (revue par [186]). Chez le singe, son hôte naturel, le virus demeure latent et cause une maladie semblable à la LEMP uniquement en condition d'immunodéficience [187]. Chez les petits rongeurs, particulièrement le hamster, l'infection au SV40 provoque la formation d'une variété de tumeurs [188,189]. Tel que mentionné plus tôt, l'antigène grand T de SV40 est grandement utilisé pour l'immortalisation de cellules primaires de même que pour inactiver p53 et Rb dans de nombreuses études portant sur la sénescence et la transformation [190].

1.3.3 Le Virus du polyome murin

Le premier des Polyomavirus découvert en 1953 est celui du Polyome murin (PyV) [191] et cette découverte fut le fruit du hasard. Alors qu'il tentait de démontrer que la leucémie pouvait être induite par un retrovirus chez les souris, Ludwig Gross a noté que certaines de ces souris développaient aussi diverses tumeurs à différents sites. Plus tard on découvrit que ces tumeurs étaient dues à la présence d'un autre virus dans sa préparation et ce virus fut nommé « poly » pour multiples sites et « ome » pour tumeurs [192]. Ainsi, il a été démontré expérimentalement que le Virus du polyome murin possède des capacités oncogéniques dans son hôte naturel de même que dans des modèles *in vitro* telles que les cellules de hamster [193,194,195]. Le Virus du polyome murin de même que la souche infectant le hamster (HaPV) sont les seuls de la famille des Polyomavirus à exprimer l'antigène moyen T (PymT) [163]. C'est cet antigène qui est responsable de la transformation par le virus du polyome murin [196]. De plus, la contribution de la protéine virale moyen T de Polyomavirus est immense dans la compréhension des voies de signalisation impliquant la phosphorylation de tyrosines et menant à la prolifération cellulaire (revue par [197,198]).

1.3.4 L'antigène grand T

Le plus grand des quatre antigènes du Virus du polyome murin, l'antigène grand T (PyLT), est une nucléophosphoprotéine de 785 acides aminés d'un poids moléculaire d'environ 100kDa. PyLT contient plusieurs domaines qui sont impliqués dans ses différentes fonctions menant à la réplication de l'ADN virale (Figure 8 page 32). En premier lieu, PyLT va forcer la cellule à entrer en phase de réplication pour permettre au virus de bénéficier de la machinerie cellulaire pour sa propre réplication. Pour ce faire, PyLT lie les membres de la famille de régulateurs du cycle cellulaire Rbs via les régions consensus 1 et 2 (CR1 et CR2) dont le CR2 contient le motif de liaison LXCXE [121,199]. Ce motif est commun aux autres protéines virales capables de lier Rb, comme E1a de

l'adénovirus et E7 du HPV, et est aussi présent dans des protéines cellulaires qui lie Rb tel que HDAC1 [200]. La localisation nucléaire est nécessaire pour l'interaction entre PyLT et Rb, c'est pourquoi la PyLT contient deux signaux de localisation nucléaire (SLN) dans sa structure. Le domaine CKII, adjacent au domaine CR2, contient des sites de phosphorylation par la Caséine Kinase II (CKII) qui aide également à la localisation de l'antigène grand T au noyau [201]. Ainsi, PyLT est majoritairement localisé au noyau mais une faible proportion se retrouve localisée à la membrane cytoplasmique. L'interaction de PyLT avec le domaine pochette de Rb hypophosphorylé [202] a pour effet de forcer le relâchement du facteur de transcription E2F1 et entraîne l'expression des gènes nécessaires à la transition vers la phase S [203] (Figure 9, page 32).



Figure 8 Structure protéique de l'antigène grand T du Polyomavirus (PyLT)

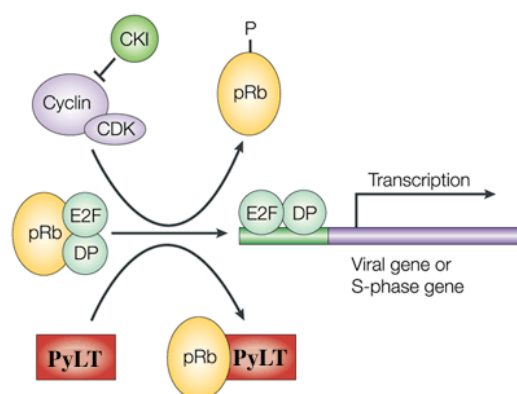


Figure 9 PyLT lie Rb pour l'inactiver

PyLT interagit avec Rb sous sa forme hypophosphorylée. La liaison provoque le relâchement de E2F ce qui mime l'effet de la phosphorylation lors de l'activation de Cycline /CdK et promeut la transition vers la phase S du cycle cellulaire. (Adaptation de [204])

PyLT lie directement l'origine de réplication du génome viral via son domaine de liaison à l'ADN et permet de dérouler l'ADN pour promouvoir l'avancement de la fourche de réplication avec l'aide de son domaine ATPase [205,206]. L'antigène grand T contient aussi un domaine contenant un motif en doigt de zinc dans sa partie C-terminale entre les résidus 452-472. Cette structure caractéristique de certaines protéines liant l'ADN et de plusieurs protéines virales, permet la formation de complexe moléculaire de haut poids regroupant plusieurs PyLT à eux-mêmes. C'est sous forme d'hexamère que PyLT lie l'ADN virale et le domaine ATPase joue un rôle dans la formation de cette structure [207,208]. Des protéines cellulaires sont recrutées par leur interaction directe avec PyLT à l'origine de réplication pour l'initiation de la synthèse de l'ADN telles que : DNA polymérase alpha, primase, topoisomerase et RPA (*Replication protein A*). Lorsque la concentration en PyLT est suffisante dans le noyau, PyLT a la capacité d'autoréguler la transcription du messenger précoce en se liant à la région régulatrice chevauchant l'origine de réplication du génome virale [209]. En même temps qu'il réprime le transcrit précoce, PyLT active la transcription du messenger tardif. Ce contrôle temporel par PyLT permet l'expression des gènes tardifs à la fin du cycle viral pour permettre la synthèse des protéines structurelles au moment de l'assemblage du virion.

1.3.4.1 Transformation et immortalisation par PyLT

Contrairement à son homologue simien, l'antigène grand T du Virus de polyome murin est incapable à lui seul de transformer les cellules primaires de rongeurs [210]. Une différence majeure entre PyLT et SV40LT réside dans la capacité de ce dernier à interagir directement avec p53 pour l'inactiver [211]. C'est ce qui explique en partie l'inaptitude de PyLT à la transformation, mais d'autres différences encore mal définies entre les deux protéines semblent aussi impliquées. Ceci a été démontré par l'expérience utilisant un hybride de PyLT à lequel le domaine de liaison à p53 de SV40LT est ajouté sans pour

autant lui conférer la compétence de transformation [212]. Chez le Virus du polyome murin, le pouvoir de transformation réside dans l'antigène moyen T, qu'il est le seul à posséder. L'antigène moyen T localise à la membrane plasmique où il interagit et active différentes protéines qui participent à la transmission des signaux mitogéniques induit par les facteurs de croissance, tel que Shc (*Src homology and collagen protein*), PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase), PLC γ (Phospholipase C γ) [213,214]. L'interaction de la protéine membranaire moyen T à ses partenaires est nécessaire pour la transformation et va résulter en induction de la prolifération même en absence de facteur de croissance. Ainsi, les mécanismes qui mènent à la transformation semblent légèrement différents dans le cas du Virus du polyome murin en comparaison avec le virus SV40 et ceux qui infectent l'homme.

Le moyen T peut transformer des lignées cellulaires établies [196] mais est inapte à transformer les cellules primaires de rongeurs [215]. Toutefois, la transformation par moyen T des cellules primaires est possible mais est dépendante de la présence de PyLT qui complémente le moyen T lors de la transformation [216]. Ceci est en accord avec l'hypothèse de la nécessité d'une coopération entre au moins deux oncogènes pour la transformation de cellules primaires de rongeurs [130] : PymT, qui a un effet comparable sur la voie de signalisation de Ras que la surexpression de Ras activé, peut être complémenté par la combinaison avec un autre oncogène, ici PyLT. Il est à noter que PyLT coopère aussi avec Ras dans la transformation de cellules primaires de rongeurs [130].

Un bon nombre d'évidences montrant que PyLT, bien qu'il n'interagisse pas avec p53, pourrait avoir la capacité d'interférer indirectement avec son activité. Ces évidences proviennent en partie des expériences de complémentation de PymT par PyLT pour la transformation. Lorsque PymT est exprimé seul dans des cellules primaires de souris (MEF) et de rat (REF52), la sur-activation de la voie mitogénique qu'il engendre entraîne l'arrêt du cycle cellulaire impliquant l'activation de p53 [217,218,219]. p19^{ARF} (Figure 3

page 16) semble impliqué dans cette activation de p53 puisque son niveau augmente avec l'expression de PymT [219]. De plus, PymT peut transformer efficacement les MEF p53^{-/-}, les MEF p19^{ARF}^{-/-} et les REF52 dans lesquelles p53 est inactivé par un mutant dominant négatif [217,219]. Ces résultats suggèrent que l'activation de p53 est l'étape limitant la transformation de cellules primaires par PymT puisque le fait d'inactiver p53 rend ces cellules permissives à la transformation par PymT seul. Ainsi, la collaboration de PyLT avec PymT pour la transformation implique que PyLT a la capacité d'interférer avec la voie de signalisation de p53 pour prévenir l'arrêt de la prolifération. Ceci est appuyé par les travaux de Marti et al. [218] qui montrent que la co-expression de PyLT et de PymT permet d'éviter l'arrêt de prolifération causé par PymT lorsqu'il est exprimé seul. De plus, l'expression de PyLT est suffisante pour surmonter un arrêt de prolifération qui est induit directement par une surexpression de p53 [220]. Le mécanisme par lequel PyLT permet ce contournement de p53 n'est pas entièrement élucidé, mais implique assurément la liaison à Rb. En effet, un mutant de PyLT incapable de lier Rb ne parvient pas à prévenir l'arrêt du cycle induit par la surexpression de p53 [220]. Le contournement de l'arrêt peut s'expliquer par l'intervention de p21, l'effecteur de p53, qui n'aura pas d'effet puisque Rb est maintenue inactif par sa liaison à PyLT (Figure 9, page 32). Toutefois, un mécanisme supplémentaire semble en cause puisqu'une portion de Rb reste phosphorylée malgré la présence de p21 [220]. La capacité de bloquer le signal entre p19^{ARF} et p53 semble associée avec l'antigène petit T, quoique l'effet de PyLT sur cette voie n'a pas été abordé [221].

PyLT, tout comme SV40LT, possède toutefois la propriété d'immortaliser les cellules primaires de rongeurs [222,223,224,225], c'est-à-dire de leur permettre de se diviser indéfiniment sans entrer en sénescence. La liaison de PyLT avec Rb est intimement reliée à sa capacité d'immortaliser les cellules comme le démontrent différentes expériences réalisées avec des formes mutantes de la protéine PyLT [225,226]. Le domaine J situé en position amino-terminale de PyLT (Figure 8, page 32) lui procure la capacité de recruter la chaperonne cellulaire Hsc70 qui est essentielle à la réplication de

l'ADN virale et est aussi nécessaire à l'immortalisation [226]. Ceci s'explique par l'importance de ce domaine J dans l'inactivation de Rb par PyLT puisqu'il permet le relâchement de E2F1 pour la transactivation des gènes E2F1-dépendants [227]. En somme, la liaison de PyLT à Rb a le même effet que la perte ou la mutation de ce gène suppresseur de tumeur qui sont retrouvées dans les cancers. Cette liaison est donc importante pour la tumorigénèse puisque la capacité de se diviser indéfiniment est une propriété que doit acquérir une cellule tumorale [1].

Une autre propriété importante de PyLT est sa capacité de permettre la croissance des cellules en condition où la concentration en sérum est faible [215,222]. Ceci rappelle la première capacité acquise par les cellules pour devenir une tumeur soit la capacité à croître indépendamment des facteurs de croissance [1]. Cette fonction semble impliquer un effet indirect de PyLT sur la phosphorylation de protéine de signalisation dans le cytoplasme tel que shc, une protéine adaptatrice qui transmet le signal partant des récepteurs membranaires tyrosines kinases et est en partie indépendante de la liaison de PyLT à Rb [228]. Ainsi, PyLT fournit la capacité à la cellule de proliférer avec un besoin moins grand de facteurs de croissance, mais ceci n'est pas suffisant pour transformer les cellules.

1.3.4.2 Les modèles pour l'étude de l'antigène grand T

Notre laboratoire a développé dans le passé des souris transgéniques exprimant l'antigène grand T du Polyomavirus dans le but de confirmer la capacité de PyLT à causer de l'hyperplasie ou des tumeurs *in vivo* [229,230,231,232]. Dans un premier modèle, Chalifour et al. [230] observent que l'expression de PyLT, qui est sous le contrôle du promoteur de la Métallothionéine, est visible au niveau du cœur. La présence du transgène résulte en une hypertrophie cardiaque ce qui suggère que PyLT affecte le contrôle de la prolifération dans ce tissu. Dans une deuxième publication, six autres lignées de cette souris transgénique sont caractérisées par le même auteur [231]. Dans ces souris, l'expression de PyLT, toujours sous le contrôle du promoteur de la Métallothionéine, est

détectée dans les testicules et pour certaines lignées dans les vésicules séminales. Trois de ces six lignées ont développés des adénomes des cellules de Leydig à l'âge de dix mois environ. Ce résultat est consistant avec le développement de tumeurs testiculaires dans les souris âgées exprimant PyLT sous le promoteur viral, rapporté plus tard par Paquis-Flucklinger et ses collaborateurs [233]. Afin de pouvoir mieux caractériser l'effet de l'expression de PyLT *in vivo*, une nouvelle génération de souris a été générée par notre laboratoire [232]. Cette fois le promoteur de la kératine 19 a été utilisé, ce qui permet de cibler l'expression de PyLT de façon plus ubiquitaire dans les cellules épithéliales, le type cellulaire impliqué dans la majorité des cancers. Cette approche a permis de générer 2 lignées de souris avec une expression de PyLT dans la plupart des tissus, notamment les poumons où elles développent des adénocarcinomes avec une bonne pénétrance (77% des souris) de neuf à douze mois après la naissance [232]. La conclusion qui peut être tirée de ces études, est que la présence de l'antigène grand T du Polyomavirus permet le développement de tumeurs *in vivo*. Cependant, la période de latence relativement longue laisse supposer que d'autres événements génétiques ou épigénétiques sont nécessaires pour la transformation complète.

Notre laboratoire s'est aussi intéressé précédemment à la capacité anti-apoptotique de l'antigène grand T [234,235]. Lebel et al. [234] montrent une diminution du récepteur membranaire Fas (FasR) dans des lignées de cellules Sertolli issues des souris transgéniques PyLT de même que la résistance de ces cellules à l'apoptose induite par la stimulation avec un anticorps agoniste du FasR. Partant de ces résultats, Rodier et ses collaborateurs [235] poursuivent la démonstration du potentiel anti-apoptotique de PyLT dans deux autres lignées cellulaires. Les TM4 et les NSO sont des lignées de souris qui entrent rapidement en apoptose suite à la stimulation du FasR. L'expression de PyLT dans ces lignées permet de les protéger de cette mort. En plus de la résistance à l'apoptose induite via le FasR, PyLT procure aussi une protection contre la mort induite par le taxol et TNF- α [235]. Cette propriété de l'antigène grand T s'apparente aux stratégies employées par d'autres virus afin de contourner les attaques du système immunitaire contre la cellule

hôte infectée ou la réponse de la cellule hôte elle-même face à l'infection, dans le but de compléter la production de nouvelles particules virales (revue par [236]).

En résumé, ces évidences qui montrent que PyLT contribue à des événements précoces de la transformation sont à la base de notre hypothèse de travail. L'antigène grand T du Virus du polyome murin possède des propriétés très intéressantes qui en font un outil pour l'étude d'étapes particulières de la carcinogénèse. C'est cette protéine virale que nous avons choisi d'utiliser comme outil dans le projet de recherche décrit dans cette thèse.

1.4 Necdin

Dans le but de mieux comprendre comment l'antigène grand T du Virus du polyome contribue à la carcinogénèse, nous avons réalisé une analyse de biopuce à ADN comparant des cellules exprimant différents niveaux de PyLT, tel que décrit plus en détail au chapitre III. Suivant cette analyse, nous avons choisi de nous pencher sur un candidat en particulier : Necdin (Ndn). Il nous paraît important de recenser un bon nombre des fonctions de Necdin dans cette section afin de d'exposer l'incertitude qui persiste encore aujourd'hui sur la réelle implication de cette protéine dans le cancer.

La séquence sans intron de *NDN* se retrouve sur le chromosome 15q11.2-q12 chez l'humain [237] et sur le chromosome 7 de la souris [238]. Le gène contient une empreinte maternelle et est donc exprimé seulement à partir de l'allèle paternel [239]. Son promoteur contient de nombreux sites CpG susceptibles à la méthylation ce qui régule en partie l'expression du gène. La région chromosomique qui contient *NDN* se retrouve délétée dans le syndrome de Prader-willi (SPW) [239,240], un désordre neuro-développemental qui se manifeste par un retard développemental global, un retard mental, un profil d'apprentissage avec des aptitudes particulières et des faiblesses, des troubles obsessionnels compulsifs, l'hypogonadisme et de l'hyperphagie qui résultera en obésité morbide [241]. *NDN* fait ainsi partie des gènes potentiellement impliqués dans ce désordre multigénique.

Structurellement, cette protéine de 321 acides aminés (325 résidus chez la souris) fait partie de la famille des MAGE (pour *melanoma antigen*) puisqu'elle en contient le domaine caractéristique en carboxy-terminal [242]. La famille des MAGE se divise en deux groupes [243]. Le type I contient les groupes MAGE-A, -B et -C et représente des protéines qui ne sont exprimées dans aucun tissus normaux, à l'exception des testicules, et sont présentes dans différentes cellules tumorales. Les MAGE de type II comprennent les MAGE-D et Necdin, qui sont exprimés de façon ubiquitaire chez l'humain. Necdin a d'abord été découvert dans le cerveau et, à ce moment, il a été considéré qu'il s'agissait de l'unique site d'expression. Toutefois, son expression a été rapportée par la suite dans les muscles squelettiques [244] et plus faiblement dans les ovaires [245], les poumons [245,246], les reins, le cœur [246], le cartilage et les adipocytes [247].

Le principal groupe à étudier Necdin est celui du Dr Kazuaki Yoshikawa qui s'intéresse aux mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation, la survie et la mort des neurones. *Ndn* (pour *neurally differentiated embryonal carcinoma-derived protein*) a été identifié par soustraction de bibliothèques de cDNA de la lignée cellulaire P19, issue de carcinome embryonnaire de souris, différenciée en neurones par l'ajout d'acide rétinoïque [242]. Necdin est exprimé dans les neurones post-mitotiques qui sont des cellules en arrêt permanent du cycle cellulaire, d'où la liaison établie entre Necdin avec la suppression de croissance. Ce groupe a aussi élargit son champ d'intérêts en réalisant entre autre des études de double hybride de levure pour trouver des partenaires cellulaires de Necdin tels que NEFA [246], hnRNP U [248], p75 neurotrophin receptor [249], MAGE-D1 [244], Tropomyosin-related kinase A [250], Nogo-A [251] et d'autres qui seront discutés plus bas (E2F1, p53). Des partenaires cellulaires localisant tant au niveau cytoplasmique que nucléaire ont été révélés pour Necdin reflétant sa capacité de loger dans ces deux compartiments. Comme Necdin ne possède aucun signal de ciblage organelle-spécifique, sa distribution dans la cellule pourrait varier en fonction de la disponibilité de ces différents partenaires.

1.4.1 Necdin : un suppresseur de tumeur ou un oncogène?

Lorsque l'on considère les différentes fonctions de Necdin recensées dans la littérature, il est difficile de trancher entre les propriétés suppresseurs de tumeurs et les caractéristiques qui pourraient promouvoir la tumorigenèse, quel est le vrai visage de cette protéine. Dans la présente section, un résumé des propriétés pro- et anti-cancers est présenté.

1.4.1.1 Necdin agit sur la prolifération cellulaire

Au cours des premières caractérisations de la protéine, la capacité de Necdin à inhiber la prolifération a été montrée dans la lignée cellulaire immortelle de souris NIH 3T3 par un système inductible d'expression [252], dans la lignée non tumorigénique d'ostéosarcome humain SAOS-2 par un essai de formation de colonies [253,254], dans la lignée de cellules embryonnaires humaines de rein HEK293 en mesurant le niveau de cellules en répliation active [254] et dans la lignée de neuroblastome murin N1E-115 par la même méthode [255].

Il est suggéré que Necdin puise sa propriété antiproliférative de sa capacité à lier E2F1 pour le maintenir inactif [253], à la manière de Rb, pour empêcher la progression du cycle cellulaire. Ces études avaient principalement pour but de supporter le rôle de Necdin pour le maintien des cellules neuronales dans un état postmitotique, et révèle la capacité de Necdin à limiter la prolifération dans certains contextes. Bien que Necdin ne contienne aucun domaine homologue à Rb, il apparaît fonctionnellement semblable au suppresseur de tumeur Rb, du moins pour sa capacité de lier E2F1. Andrieu et ces collègues [256] questionnent toutefois ce rôle de Necdin comme suppresseur de croissance observé *in vitro* avec la démonstration que dans un modèle de souris transgénique *Ndn* KO, ils ne mesurent aucune augmentation de la prolifération dans le système nerveux en absence de Necdin [256]. Il est aussi à noter que la presque totalité de ces publications ne rapporte pas

l'utilisation d'ARN interférence pour déterminer l'effet réel de la perte de Necdin sur la prolifération. Seul Takazaki et al. [257] utilisent un ARN antisense de *Ndn* et n'observent aucune augmentation de la prolifération en absence de *Ndn* dans les cellules neuronales de ganglion des racines dorsales (DRG ou *Dorsal root ganglia*) contrairement à l'effet d'une déficience en Rb qui provoque, dans le même système, une réentrée des cellules en phase S.

De plus, Kobayashi et al. [255] rapportent que la suppression de croissance induite par Necdin dans les N1E-115 peut être antagonisée par la surexpression de E2F1. Une très grande proportion sinon toutes les tumeurs présentent une perturbation de la voie de signalisation de Rb. Cette perte entraîne un dérèglement de E2F1 qui devient suractivé. Le résultat de Kobayashi nous suggère que dans ce contexte, la présence de Necdin pourrait avoir un effet moindre sur la prolifération. Necdin interagit aussi avec E2F4 [255], qui agit comme répresseur des gènes cibles de E2F, mais l'impact de Necdin sur l'activité de E2F4 de même que la possibilité que Necdin interagisse avec d'autres membres de la famille E2F reste à définir.

Inversement, Necdin est exprimé dans des cellules à haut potentiel de prolifération telles que les cellules précurseurs myogéniques [258]. Ces précurseurs musculaires en prolifération expriment un haut niveau de Necdin qui diminue avec l'apparition des marqueurs de différenciation et la diminution du marqueur de prolifération PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) [258].

1.4.1.2 Necdin interagit avec p53 et affecte son activité

L'une des découvertes les plus attrayantes reliant *necdin* au cancer est la démonstration que Necdin interagit directement avec p53 [254]. Toutes les activités reliées à cette interaction pointent en réalité vers un rôle inhibiteur de Necdin sur l'important suppresseur de tumeur. En premier lieu, Tanuira et al. [254] montrent que la liaison entre Necdin et p53 n'affecte pas la capacité de ce dernier à lier l'ADN mais diminue toutefois son efficacité à activer un gène rapporteur couplé au promoteur de p21. Par contre, les

auteurs proposent que malgré le fait que Necdin affecte l'expression de p21, il ne bloque pas l'arrêt de croissance induit par p53 qui serait alors p21-independent. Dans cette même publication, les auteurs révèlent que la présence de Necdin bloque l'apoptose qui est induite par la surexpression de p53 dans un modèle cellulaire couramment utilisé pour ce type d'essai : la lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome U2OS.

Plus récemment, Hasegawa et Yoshikawa [259] ont montré que Necdin pouvait aussi modifier l'activation de p53 en le régulant par modification post-transcriptionnelle via Sirtuin 1 (Sirt1). Sirt1, l'homologue chez le mammifère de Sir2 de la levure, est une histone deacétylase de type III (HDAC) qui régule négativement l'activité de p53 en le déacétylant, ce qui permet de protéger certaines cellules de la mort cellulaire induite en réponse aux dommages à l'ADN [260]. Sirt1 est coexprimé avec Necdin dans différentes régions du cerveau et forme un complexe avec Necdin dans les neurones [259]. Cette interaction a pour effet de faciliter la liaison de Sirt1 à p53 et résulte en une plus forte diminution du niveau d'acétylation de p53. *In vitro*, l'induction de p53 par un agent causant des dommages à l'ADN engendre une plus forte réponse apoptotique dans des cellules neuronales déficientes en Necdin où ils mesurent un plus haut niveau d'acétylation de p53. Ce résultat se reflète aussi *in vivo*, dans un modèle de souris déficientes en Necdin, par une détection de p53 acétylé plus élevé dans les tissus neuronaux de ces souris [259]. Cette fonction de Necdin comme régulateur négatif du statut d'acétylation de p53 qui amortit l'activité proapoptotique de p53 suite à une insulte à l'ADN a été caractérisée uniquement au niveau des cellules neuronales dans cet article. Toutefois, comme Necdin est présent dans d'autres tissus en combinaison avec Sirt1, il pourrait s'agir d'un mécanisme plus général. Necdin pourrait contribuer aux modifications post-transcriptionnelles qui régulent l'activation de p53 pour contourner l'apoptose et survivre à un dommage à l'ADN.

1.4.1.3 Necdin est un régulateur de la transcription

Tel que mentionné précédemment, des résultats suggèrent que Necdin a la capacité d'affecter négativement l'expression de p21 par l'intermédiaire de sa liaison à p53 [254]. Matsumoto et ses collègues [261] ont contribué à élargir les connaissances à propos des effets de Necdin sur la transcription. Necdin lie une séquence de l'ADN riche en Guanine qu'ils ont nommée le motif GN-box. Cette séquence est retrouvée dans le promoteur de c-Myc qu'ils ont pris en exemple pour montrer l'effet répresseur de Necdin sur ce promoteur couplé à un gène rapporteur. L'effet répresseur de Necdin sur c-Myc est dépendant de la présence de la protéine activatrice Sp1 (*Specificity transcription factor 1*), puisqu'en son absence Necdin présente plutôt un léger effet activateur sur le gène rapporteur de façon dose dépendante [261]. L'activité activatrice que possède Necdin sur la transcription est aussi appuyée par le fait que lorsque la protéine complète (fusionnée au domaine de liaison à l'ADN) est utilisée dans un système de double hybride de levure, elle transactive le gène de sélection à elle seule, en absence de partenaire (couplé à un domaine de transactivation) [253]. Il est à noter que le promoteur de c-Myc est aussi sous le contrôle de E2F1 et que Necdin pourrait avoir un effet négatif sur sa transactivation via son interaction avec E2F1 comme le suggère un essai rapporteur [245]. Ainsi Necdin pourrait, selon la présence de cofacteur, inhiber ou activer l'expression de c-Myc dont l'augmentation de l'expression fait partie de la genèse de nombreux cancers (revue par [262]).

1.4.1.4 Necdin possède une activité anti-angiogénique

La formation de nouveaux vaisseaux dans une tumeur est activée par la variation de la balance entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques. Le facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor*) est régulé par la concentration en oxygène et entraîne l'expression de VEGF. Un criblage par double hybride de levure a montré que Necdin interagit avec l'important facteur de transcription HIF-1alpha [263]. En condition hypoxique, Necdin promeut la dégradation de HIF-1alpha ce qui a pour conséquence de

diminuer l'expression de VEGF. Fonctionnellement, le pouvoir anti-angiogénique de Nectin a été montré par deux essais soit la formation *in vitro* de tubes par les cellules endothéliales et *in vivo* par la vascularisation de la membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet (CAM) [263]. Friedman et al. [264] ont confirmé cette interaction et ont approfondi la caractérisation du complexe formé entre Nectin et HIF-1alpha qui comprend aussi ARNT2. Ce groupe confirme aussi que Nectin diminue l'expression d'un promoteur artificiel couplé à un rapporteur. Ces résultats suggèrent que la présence de Nectin ne serait pas favorable au développement d'une tumeur au delà d'un certain stade.

1.4.1.5 Nectin est une protéine anti-apoptotique

L'apoptose est un mécanisme de sauvegarde qui prévient qu'une cellule contenant des aberrations de progresser vers la formation d'une tumeur. Le lien entre Nectin et l'apoptose est maintenant clair puisque de nombreuses publications ont montré son pouvoir anti-apoptotique dans différents modèles tant *in vitro* que *in vivo*.

E2F1 est un facteur de transcription qui promeut la prolifération par l'induction de gènes responsables de la transition G1 à S, mais l'expression ectopique de E2F1 induit aussi des gènes qui auront pour effet de promouvoir l'apoptose [265]. Trois publications présentent l'effet inhibiteur de Nectin sur cette apoptose induite par E2F1 [245,255,266]. Les cellules de neuroblastome N1E-115 différenciées sont sensibles à la surexpression de E2F1 et entre en apoptose peu de temps après sa surexpression. L'expression de Nectin dans ces cellules précédant l'expression de E2F1 antagonise l'apoptose normalement induite [245,255]. Pour soutenir le concept selon lequel Nectin peut inhiber l'apoptose via son interaction avec E2F1, Kurita et ses collègues [266] poursuivent ces travaux en montrant que le gène cible proapoptotique de E2F1, *cdc2* (*cell division cycle 2*), est affecté par la présence de Nectin. Nectin endogène est capable de s'associer au promoteur de *cdc2* de façon E2F1-dépendante dans les neurones granulaires différenciées où Nectin est normalement fortement exprimé. Cette association provoque une diminution du niveau de *cdc2* en condition de stress (généralisé par une diminution de la concentration de KCl) et

protège les cellules neuronales de l'apoptose. Ce résultat se reflète concrètement *in vivo* par l'augmentation du nombre de cellules neuronales apoptotiques dans des souris déficientes en Necdin [266]. Dans cette étude, seulement l'effet sur cdc2 a été abordé puisqu'il est reconnu comme un joueur important de l'apoptose neuronale dans les conditions expérimentales employées [267]. Toutefois, E2F1 possède un grand nombre de cibles pro-apoptotiques plus classiques telles que APAF1, BAD, BID, p73 et même les Caspases [268,269,270]. La conséquence au niveau transcriptionnel de la présence de Necdin sur ces autres cibles de E2F mériterait également d'être abordée.

L'activation de la caspase 3 par clivage est une étape clé dans la voie apoptotique conventionnelle. Plusieurs auteurs montrent que l'apoptose qui est induite par la perte de Necdin est caractérisée par une activation de la caspase 3 dans des cellules neuronales de ganglion des racines dorsales (DRG) [257], dans les neurones granulaires [266], dans le système nerveux de souris déficientes en *Ndn* [250] et dans l'ensemble de l'embryon *Ndn* KO [256]. Deponti et ses collègues [258] montrent que l'activité anti-apoptotique de Necdin ne sert pas simplement au maintien des cellules neuronales, mais peut aussi s'appliquer aux cellules musculaires sous l'effet de différents agents. La staurosporine, le peroxyde d'hydrogène et l'irradiation aux rayons ultra-violet causent la mort des myoblastes *in vitro*. La mort induite par tous ces stimuli est diminuée lorsque Necdin est surexprimé et inversement est augmentée en absence de Necdin en comparaison avec les cellules sauvages. Les effecteurs caspase 3 et 9 sont activés au cours de cette mort, synonyme d'une apoptose médiée par la voie mitochondriale. Dans toutes les expériences décrites ici, seul le niveau de caspases sous leur forme activée est mesuré. Ces caspases étant des gènes cibles de E2F [270], la modulation de leur niveau basal par Necdin aurait pu être explorée par les auteurs.

La cytokine TNF-alpha (*Tumor necrosis factor alpha*) fait partie, en plus de l'interleukine-1, l'interleukine-6 et l'interferon- γ , des facteurs responsables de la cachexie qui consiste en une atrophie musculaire qui est observée chez des patients atteints d'un

cancer avancé. Ces cytokines peuvent être sécrétées par la tumeur ou indirectement par les cellules immunitaires stimulées par les cellules tumorales. Scoriati et al. [271] utilisent un modèle murin bien défini de cachexie d'origine cancéreuse pour déterminer l'impacte de Necdin sur la dégénérescence musculaire causée par la présence d'une tumeur, puisque Necdin est exprimé dans les muscles squelettiques. Leurs travaux montrent que l'augmentation de Necdin affecte la signalisation engendrée par une stimulation au TNF-alpha à au moins trois niveaux: 1) Necdin diminue le niveau de récepteur TNFR1, 2) diminue le niveau et l'activité de p53, un effecteur en aval du récepteur qui est normalement induit par la stimulation au TNF-alpha, et 3) Necdin affecte l'activité de la caspase 3 et 9. Ainsi, dans les cellules musculaires, Necdin est impliqué dans le maintien de la masse musculaire en diminuant l'apoptose induite par TNF-alpha. Bien que ce n'était pas le but de l'étude, ils montrent aussi que la modulation de Necdin procure un environnement ni favorable ni inhibiteur sur le développement de xénogreffe puisqu'ils n'observent aucune variation du volume de la tumeur xénogreffée pour chacun des génotypes de souris utilisés (wt, *Ndn*^{-/-}, *Ndn*⁺) [271]. Le TNF-alpha possède des activités contradictoires quant à la promotion du cancer, mais sa fonction anti-cancer repose en partie sur sa capacité à induire la mort des cellules [272]. Necdin diminue la capacité de TNF-alpha à agir comme agent apoptotique dans les myoblastes et cet effet serait aussi avantageux pour une cellule tumorale. L'impact de Necdin sur les autres effets complexes de TNF-alpha reste à définir.

Finalement, tel que mentionné précédemment, Necdin prévient l'apoptose induite par la surexpression de p53 dans les U2OS [254] et l'absence de Necdin rend les neurones corticaux sensibles à l'apoptose induite par la camptotecin de façon p53-dépendante [259]. La capacité d'inhiber l'apoptose induite par p53 est d'une grande importance et pourrait procurer à Necdin le potentiel de promouvoir la carcinogénèse. Il en est de même pour tous les autres mécanismes anti-apoptotiques de Necdin recensés ici.

1.4.1.6 Necdin et la sénescence

Aucune publication ne traite de la relation possible entre Necdin et la sénescence. Puisqu'une bonne proportion des protéines régulatrices et effectrices de p53 sont impliquées dans la sénescence, ceci suggère que Necdin pourrait influencer ce mécanisme suppresseur de tumeur.

L'analyse du profil d'expression génétique comparant le muscle squelettique de souris adultes (5 mois) à celui de souris âgées (30 mois) montre que le niveau de Necdin diminue avec l'âge dans ce tissu [273]. De plus, Necdin est augmenté chez les souris âgées par la restriction calorique [273], le seul facteur connu pour prolonger la vie chez la souris mises à part les modifications génétiques. Ce résultat peut être interprété de différentes façons selon le point de vue de l'observateur. Le produit du gène INK4A, un important effecteur de la sénescence, suit un profil d'expression complètement inverse soit une augmentation avec l'âge et une diminution par un apport nutritif réduit en calories [274]. Du point de vue de l'auteur, il s'agit d'un indicateur de l'implication possible de ce gène dans le processus de vieillissement [274]. Ainsi, la disparition de Necdin soulève la possibilité que la protéine pourrait avoir un rôle inhibiteur dans le processus de vieillissement ou encore n'aurait pas de fonction. L'expression de certains gènes ayant comme fonction la promotion de la prolifération diminue avec la sénescence, comme par exemple E2F1, Id1, cyclin A et E et c-fos, alors que des gènes suppresseurs de croissance, principalement p16^{INK4a} et p21, se trouvent augmentés [94,95]. Necdin, qui est principalement rapporté comme un suppresseur de croissance, ne semble pas respecter cette généralité.

Bien que son expression semble diminuer au cours du vieillissement, rien ne prouve qu'il s'agisse d'un mécanisme retardant la sénescence. Toutefois un des partenaires de Necdin, SIRT1, dont Necdin augmente l'activité [259], est reconnu pour prolonger la vie répliquative des cellules vieillissantes et augmenter les risques de cancer [275]. Necdin

augmente la capacité de SIRT1 à interférer avec l'apoptose p53-dépendante [259], mais l'impact de Necdin sur la fonction de SIRT1 d'inhiber la sénescence p53-dépendante [276] n'a jamais été exploré. De la même façon que Necdin, l'expression de SIRT1 est aussi augmentée par la restriction calorique chez les rongeurs [277].

Puisque Necdin a un effet inhibiteur sur le facteur de transcription E2F1 tel que mentionné ci-haut, ceci suggère que Necdin pourrait aussi avoir un impact sur l'expression de p14/p19^{ARF}, un des gènes cibles de E2F1 [107]. L'augmentation de p14/p19^{ARF} suite à la suractivation de E2F1 permet de protéger contre une prolifération anormale et entraîne la stabilisation et l'activation de p53 puis survient la sénescence [104]. Ainsi, Necdin pourrait aussi affecter ce mécanisme de protection tout comme il affecte l'apoptose induite par E2F1. Ceci est suggéré par la disparition de Necdin avec l'âge dans les tissus musculaires de souris ce qui aurait pour effet de lever la répression sur p14/p19^{ARF} et d'enclencher le mécanisme normal de sénescence répllicative. Ce lien entre Necdin et p14/p19^{ARF} n'a pas encore été étudié.

1.4.1.7 Necdin dans les modèles *in vivo*

Le syndrome de Prader-Willi est la seule maladie chez l'humain pour laquelle la perte de l'expression de *NDN* est associée à l'étiologie. Si l'on considère *NDN* comme un suppresseur de tumeur, ces patients ayant perdu le seul allèle fonctionnel de Necdin devraient présenter une prédisposition au cancer. Une seule étude a porté sur l'incidence du cancer et de la leucémie sur une cohorte de 1160 participants atteints du SPW et les compare au taux attendu de la population générale étasunienne. Aucune variation avec le taux de cancer normalement observé dans la population générale n'a été mesurée. Par contre, trois cas de leucémie myéloïde ont été rapportés chez les patients atteints du SPW versus 0,075 leucémie attendue [278]. Il apparaît donc qu'il y ait un risque potentiellement accru de leucémie, mais d'aucun autre cancer, chez les patients atteints du SPW.

L'implication uniquement de la perte de *Necdin* ne peut être affirmée puisque le SPW est le résultat de la perte d'une région chromosomique contenant plus d'un gène.

Dans le but d'explorer l'implication de *Necdin* parmi le groupe de gènes fréquemment délétés dans la maladie de Prader-Willi, Matthieu Gérard et ses collègues [279] ont généré un modèle de souris transgéniques dans lequel ils ont remplacé *Ndn* par le gène reporteur *lacZ*. Les descendants héritant de l'allèle paternel mutant présentent un haut taux de létalité post-natale relié à une détresse respiratoire ce qui reflète certains aspects de cette maladie génétique retrouvés chez l'humain. Ce résultat fait contraste avec celui rapporté précédemment où aucune anomalie phénotypique n'était constatée dans les souris déficientes en *Ndn* [280]. La divergence observée par ces deux groupes peut en partie s'expliquer par la différence de pénétrance du phénotype selon la souche de souris utilisée. Un troisième modèle de souris est venu appuyer les résultats de Gérard et ses collaborateurs en montrant que les souris *Ndn*-déficientes présentent un plus faible taux de survie néonatale dû à une défaillance respiratoire [281]. Ils démontrent en plus que ces souris présentent des altérations au niveau de l'hypothalamus et au niveau comportemental [281]. Pour aucun de ces modèles le développement de tumeur n'est rapporté en absence de *Necdin*, même avec des périodes d'observations s'étendant jusqu'à 18 mois.

La seule lignée de souris transgéniques surexprimant *Ndn* générée contient le transgène sous le contrôle d'un promoteur limitant l'expression aux myoblastes squelettiques et aux muscles squelettiques [258,271]. Les souris obtenues ne montrent aucune différence en terme de poids, de comportement, de fertilité ou de durée de vie comparativement à la lignée parentale. Dans ces modèles, aucun développement de tumeurs n'est mentionné, toutefois la surexpression est dirigée dans un seul type cellulaire où *Necdin* est naturellement exprimé. Ces résultats ne permettent pas de statuer sur l'implication possible de la surexpression de *Ndn* dans le développement de cancer dans d'autres types cellulaires.

En résumé, les modèles *in vivo* utilisés pour étudier Necdin semblent suggérer que la perte de Necdin n'est pas reliée à l'augmentation de l'incidence des leucémies observée chez les patients atteints du syndrome de Prader Willi ou à d'autres cancers et lèvent le doute sur sa fonction suppresseur de tumeur.

1.4.1.8 L'expression de Necdin dans les cancers

Necdin a été caractérisé pour la première fois dans des cellules de carcinome embryonnaire différenciées en neurones par l'ajout d'acide rétinoïque, ce qui a amené les auteurs à caractériser l'expression de Necdin dans les lignées cancéreuses issues du cerveau. Aucune des lignées tumorales observées (phéochromocytome, neuroblastome, gliome) ne présentent d'expression de Necdin [282]. Mise à part cette étude, peu de publications tentent de faire de lien entre Necdin et le cancer. Cependant quelques études de micropuces à ADN ont rapporté Necdin comme gène candidat dans différents contextes. D'abord, Hoek et ces collaborateurs [283] montrent que le niveau de Necdin est plus faible dans les mélanomes comparés à un seul échantillon de mélanocytes, ce qu'ils confirment dans six lignées cellulaires de mélanome sur huit. Un autre groupe, celui de Tan et ses collègues [284], se penche sur le cancer du pancréas et dresse le profil de méthylation global de ce cancer en comparaison avec le tissu normal pour identifier des gènes modifiés de façon épigénétique importants pour ce cancer. Parmi leurs candidats, ils observent l'hypométhylation du promoteur de Necdin dans les cancers accompagné d'une corrélation avec l'augmentation du niveau d'expression de son ARNm. Ils suggèrent qu'une perte d'empreinte génétique (LOI) des gènes qu'ils ont identifiés pourrait contribuer à la genèse du cancer du pancréas [284]. Ces deux études montrent donc des profils différents pour l'expression de Necdin dans deux contextes cellulaires distincts avec une perte de Necdin dans les mélanomes et un gain dans les cancers du pancréas.

Une panoplie de traitements est utilisée pour combattre le cancer. Les avancées en génomique permettent de mieux comprendre la biologie de la maladie et de définir le

traitement approprié. Necdin a été rapporté comme candidat dans ce genre d'étude [285,286]. D'abord, Necdin fait partie des gènes différentiellement exprimés identifiés dans une étude visant à discerner les gènes impliqués dans la radiosensibilité dans les cas de cancer de l'œsophage [285]. Dans cette étude, Ndn est présent en moins grande quantité dans les cellules présentant une haute sensibilité aux irradiations en comparaison aux autres lignées radorésistantes où il est plus fortement exprimé. Dans une autre étude pour comprendre les phénomènes impliqués dans la résistance au traitement à l'oxaliplatine, un agent chimiothérapeutique employé pour le traitement de nombreux cancers, Varna et ses collaborateurs [286] dressent le profil d'expression d'un clone résistant de la lignée ovarienne humaine A2780. Dans ce clone, l'expression de Necdin est diminuée [286]. Ceci suggère des mécanismes différents impliqués dans la résistance à ces traitements en ce qui a trait au rôle de Necdin qui est modulé de façon inverse selon la résistance.

Le cancer du sein peut être catégorisé en 2 types selon la présence ou l'absence du récepteur à estrogène alpha (ER- α) ce qui a des conséquences sur le pronostic et le choix de traitement à envisager pour la patiente. Bien que la présence du ER- α laisse envisager une réponse aux traitements hormonaux, une meilleure caractérisation de ces tumeurs permet de conduire à de nouvelles approches en matière de traitement. Abba et al. [287] ont identifié Necdin comme faisant partie du profil d'expression global caractéristique des tumeurs du sein positives pour la présence du ER- α . De plus, une analyse des promoteurs des gènes identifiés dans cette étude révèle la présence d'un élément de réponse à l'estrogène (ERE) dans la séquence de Necdin, toutefois la fonctionnalité de cette séquence reste à être déterminée.

Une autre étude se rattachant au cancer du sein a rapporté Necdin comme candidat [288]. L'analyse complexe menée par Crawford et ces collègues visait à identifier des loci de caractères quantitatifs (QTL) définissant la prédisposition aux métastases dans le cancer du sein. Necdin fait partie des 7 gènes qu'ils ont décelés pouvant affecter les marqueurs reliés au phénotype métastatique. L'expression ectopique de Necdin dans une lignée

hautement métastatique de tumeur mammaire de souris (Mvt-1) inhibe la formation de métastase et diminue la progression de la tumeur en xénogreffe, sans toutefois affecter la prolifération cellulaire de la lignée *in vitro*. Ils montrent aussi qu'une plus forte expression de Necdin corrèle significativement avec la survie dans le cancer du sein chez l'humain. Ainsi, Necdin semble avoir un effet protecteur concernant la progression d'un cancer vers un stade avancé métastatique.

Ces études comparent le niveau d'expression entre les tumeurs, mais ne font pas références au niveau en comparaison aux tissus sains. Il est donc difficile de statuer si de façon générale Necdin est perdu ou augmenté dans ces tumeurs par rapport aux tissus sains. Ces évidences expérimentales suggèrent néanmoins que le niveau de Necdin peut varier d'une tumeur à l'autre et être associé à différents phénotypes.

Finalement, la caractérisation moléculaire d'un modèle de souris transgénique de cancer des cellules neuroendocrines prostatiques causé par l'expression de l'oncogène virale SV40LT, a aussi identifié Necdin comme candidat [289]. Dans ces souris transgéniques, le niveau d'expression de Necdin augmente au cours de la progression du cancer de la prostate et se retrouve même dans les tissus métastatiques [289]. On ne peut toutefois pas trancher à partir de ce modèle sur l'implication directe de Necdin dans la formation de la tumeur, cependant il est clair que la présence de son expression n'empêche pas la formation de tumeur ou de métastases dans ce modèle.

1.4.1.9 Les autres fonctions de Necdin

Tanaira et al. ont montré que Necdin pouvait lier deux protéines virales : l'antigène grand T de SV40 et E1A de l'adénovirus [253]. Cette observation a attiré notre attention puisque le domaine impliqué dans cette liaison avec Necdin est le même que celui requis pour l'interaction avec Rb qui est conservé dans l'antigène grand T de polyome que nous utilisons. La fonctionnalité de cette interaction n'a toutefois pas été décrite plus en détail.

La différenciation cellulaire de certaines lignées est affectée par Necdin. D'abord, dans le système nerveux, Necdin facilite la différenciation post-mitotique et la spécification des neurones [290]. L'implication de la présence de Necdin dans la différenciation des cellules musculaires lisses et squelettiques a également été démontrée [244,291]. Par contre, dans le cas des cellules adipeuses, Necdin présente un effet inhibiteur pour la transition des pré-adipocytes en adipocytes bruns [247]. Ceci démontre un pouvoir de Necdin qui est contexte cellulaire spécifique.

1.4.1.10 Sommaire sur les fonctions de Necdin

En résumé, la dualité de propriétés pro- et anti-cancéreuses qui définissent Necdin (Figure 10, page 52) contribue à faire planer le doute sur le réel potentiel de cette protéine. Necdin semble posséder une fonction suppresseur de tumeur en limitant la prolifération de certaines cellules lorsque surexprimé et détenir une activité anti-angiogénique et anti-métastatique. En contre partie, la présence de Necdin bien qu'il ne semble pas promouvoir la prolifération, ce qui est l'effet des oncogènes à proprement parler, permet aux cellules de résister à l'apoptose. De plus, plusieurs évidences s'opposent qu'en à son niveau d'expression dans les cellules tumorales. L'approfondissement des connaissances sur Necdin est nécessaire afin de concilier les différentes fonctions décrites ci haut dans un modèle de carcinogenèse.

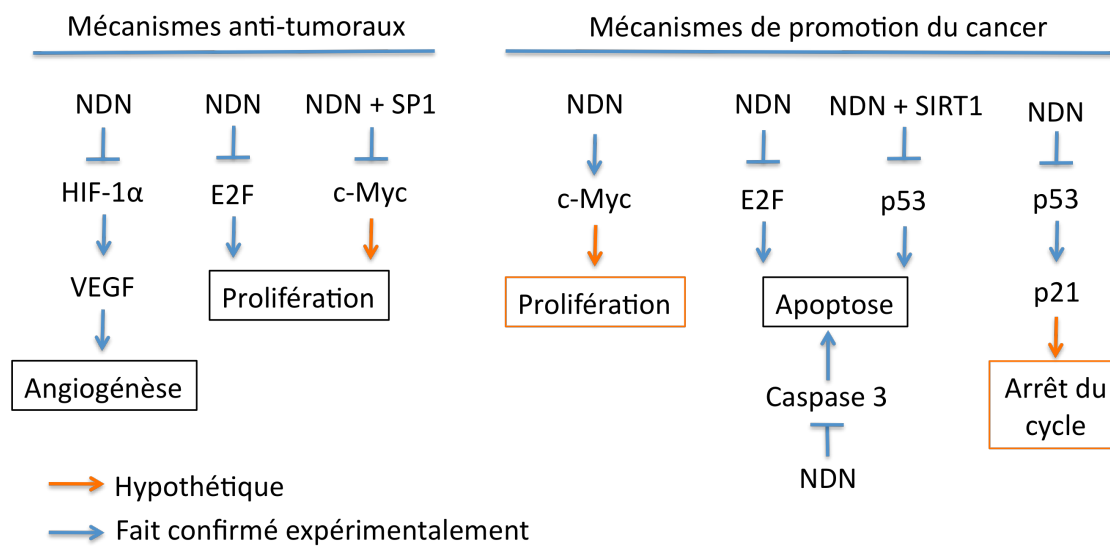


Figure 10 Résumé de quelques fonctions de Necdin en lien avec la carcinogénèse

CHAPITRE II

Les objectifs

L'antigène grand T du Virus du polyome murin est utilisé depuis longtemps par notre laboratoire pour mettre en lumière des événements précoces de la carcinogénèse. Ceci est fondé sur le principe que l'antigène grand T, en plus de son potentiel immortalisant, confère une résistance à l'apoptose [235], permet la croissance en condition limitée en facteurs de croissance [215], et surtout, les souris transgéniques exprimant l'antigène grand T développent des tumeurs toutefois avec une certaine période de latence [231,232,292]. Ainsi, l'antigène grand T contribue au développement de tumeurs spontanées chez la souris en générant des événements précoces qui initient la transformation.

Le point de départ de ce projet de doctorat était de mettre en lumière ces événements précoces associés à la présence de l'antigène grand T du Virus du polyome murin par l'utilisation d'une approche génomique. Le premier objectif a donc été de choisir, parmi l'ensemble des candidats générés par l'analyse du profil d'expression d'une lignée cellulaire de souris (NIH 3T3) exprimant PyLT, un ou des gènes d'intérêt. Entre les candidats sélectionnés, notre choix s'est arrêté sur Necdin. Peu de choses étaient connues à propos de Necdin au moment où ce projet de recherche a été amorcé. Toutefois certaines fonctions intéressantes, entre autres sa fonction similaire à Rb et sa capacité d'interagir avec p53 [253,254] ont attiré notre attention et méritaient d'être approfondies.

Le Chapitre III de cette thèse rapporte la démarche que nous avons entreprise pour en apprendre davantage sur l'impact de Necdin dans une lignée cellulaire immortalisée exprimant PyLT ou non. Dans le premier volet de cette étude, nous nous sommes penchés sur les aspects biologiques de la cellule en commençant par la prolifération pour comprendre comment ce gène proposé comme suppresseur de croissance pouvait se retrouver exprimé dans notre modèle cellulaire contenant une protéine virale. De façon

générale, un virus a évolué pour acquérir des caractéristiques qui favorisent sa réplication. De ce fait, nous avons tenté de déterminer pour quelle fonction de PyLT la modulation de Necdin pouvait être favorable. Comme Necdin interagit avec p53 [254], cette voie de signalisation a été notre centre d'intérêt puisqu'il est connu que PyLT permet le contournement de la réponse p53-dépendente, mais par un mécanisme encore mal défini. Cette étude a démontré que Necdin est un gène cible de p53 suivant différents stress génotoxiques et qu'il a un effet négatif sur la réponse induite par p53.

À la lumière des résultats obtenus du modèle murin exprimant PyLT, révélant l'implication de Necdin dans la régulation de l'activité de p53, nous proposons que la modulation de l'expression de Necdin pourrait aussi affecter la sénescence, ce qui constitue le fondement du chapitre IV. Le passage à un modèle cellulaire différent nous a permis de compléter la caractérisation de Necdin dans un système qui convient mieux à l'étude des mécanismes reliés à la sénescence : les cellules primaires humaines (IMR90). L'expertise que j'ai introduite dans le laboratoire pour la production et l'utilisation de lentivirus comme système de livraison de différents vecteurs a permis la transition rapide à ce nouveau modèle cellulaire complémentaire. De plus, cette compétence que j'ai acquise m'a permis de collaborer à différents projets de notre laboratoire, de même qu'avec d'autres groupes de recherche dans des projets qui ne sont pas décrits dans cette thèse.

Le troisième volet du projet était de définir dans quelle mesure l'expression de Necdin pouvait se retrouver dans le cancer chez l'humain. Nous avons donc caractérisé son expression dans des modèles dans lesquels le statut de p53 était défini tels que des lignées cellulaires du cancer de l'ovaire et de la prostate, de même que dans le cancer de l'ovaire à faible malignité en comparaison avec des tumeurs agressives de l'ovaire (Chapitre III et données supplémentaires en annexe I).

CHAPITRE III

Article I

Large T-antigen expression analysis identifies Necdin, a p53-target gene, as an inhibitor of p53-mediated growth arrest

Julie Lafontaine¹, Francis Rodier^{1,2}, Véronique Ouellet¹ and Anne-Marie Mes-Masson^{1,3}

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal and Institut du cancer de Montréal, 1560, rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1,

²Département de radiologie, radio-oncologie et médecine nucléaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

³Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

Running title: PyLT/Necdin affects p53 response

Sera soumis au journal PLoS One

Contribution des auteurs

Francis Rodier a exécuté les expériences se rapportant à la réalisation, l'analyse et la confirmation du profil d'expression génique c'est-à-dire établissement des clones, extraction d'ARN, Southern blot et Western blot. J'ai réalisé toutes les expériences fonctionnelles reliées à Necdin à l'exception de la caractérisation de l'expression de Necdin dans les tissus tumoraux de l'ovaire qui a été accomplie par Véronique Ouellet. Le manuscrit a été rédigé principalement par moi, révisé et corrigé par chacun des co-auteurs.

Abstract

In vitro, cellular immortalization and transformation define a model for multistep carcinogenesis and current ongoing challenges include the identification of specific molecular events associated with steps along this oncogenic pathway. Based on the expression of Polyomavirus Large-T antigen (PyLT), an immortalizing oncogene, we identified transcriptionally related events associated with its expression in NIH3T3 cells, and we propose that a subset of these alteration in gene expression may be related to the early events that contribute to carcinogenesis. The proposed tumor suppressor Necdin was within a group of genes that was consistently upregulated in the presence of PyLT. While Necdin is induced following p53 activation with different genotoxic stresses, Necdin induction by PyLT did not involve p53 activation or the Rb-binding site of PyLT. Necdin depletion by shRNA conferred a proliferative advantage to NIH3T3 and PyLT-expressing NIH3T3 (NIHLT) cells. In contrast, our results demonstrate that although overexpression of Necdin induced a growth arrest in NIH3T3 and NIHLT cells, a growing population rapidly emerged from these arrested cells. This population no longer shows significant proliferation defects despite high Necdin expression. Moreover, we established that Necdin is a negative regulator of p53-mediated growth arrest induced by nutlin-3, suggesting that Necdin upregulation could contribute to the bypass of a p53-response in p53 wild type tumors. To support this, we characterized Necdin expression in low malignant potential ovarian cancer (LMP) where p53 mutations rarely occur. Elevated levels of Necdin expression were observed in LMP when compared to aggressive serous ovarian. We propose that in some contexts, the constitutive expression of Necdin could contribute to cancer promotion by delaying appropriate p53 responses and potentially promote genomic instability.

Keywords: Necdin/Polyomavirus/Large T-antigen/transcriptome/carcinogenesis/p53/
/growth arrest/NIH3T3/Ovarian cancer/LMP/Borderline

Introduction

Carcinogenesis is a multistep process defined by uncontrolled cell growth and neoplastic progression leading to invasive tumors and metastasis. Cancer progression models dictate that normal cells undergo a variety of genetic/epigenetic alterations which can be summarized *in vitro* by two major phenotypic changes: immortalization and transformation. Normal cells need to overcome cell cycle checkpoints and their limited division potential to achieve immortalization. Interlaced with this process, additional events contribute to cellular transformation and move cells toward the complete neoplastic phenotype [1]. Human lung and colon cancers, genetically altered mice, mouse and human cell culture models, have all been extensively used to support the multistep progression model [2,3,4].

Normal human epithelial or fibroblast cell transformation can be obtained with the sequential expression of a series of oncogenes, often including the viral proteins SV40LT (simian virus 40 Large-T antigen) or adenovirus early protein E1A [5,6]. Some E1A domains conserved in SV40LT, including the CR1/CR2 Rb family (pRb's) binding domains and the p300/400-binding pocket are absolutely required for this transformation process [7]. Despite the importance of these domains, the characterization of other viral oncogenic domains involved in transformation remains incomplete and additional activities could contribute to the carcinogenesis process.

Polyomavirus (Py), an oncogenic member of the papovaviruses, causes tumors in rodents and transforms primary cells in culture [8]. In Py-induced carcinogenesis, Large-T antigen (PyLT) is responsible for inappropriate cell cycle promotion and immortalization of mouse primary cells in culture [9,10]. This ability is mediated principally through the binding and inactivation of pRb's by the CR1/CR2 amino-terminal domains [11,12]. PyLT genetically and functionally shares extensive homology with the closely related SV40LT, although critical differences exist. As an example, while both proteins can bind p300 and

inactivate the pRb family of tumor suppressors, only SV40LT can bind and inactivate p53 [13]. Functionally, SV40LT is a dual oncogene able to immortalize and transform primary rodent cells as a single event while PyLT appears limited to immortalization in vitro [14]. Thus, differences between PyLT and SV40LT render these LT-Ags useful in studying different aspects of oncogenesis.

Congruent with its in vitro activity, PyLT drives tumor formation when expressed under various promoters in transgenic mouse models, but the lower frequency and longer latency suggest a requirement for additional secondary events [15,16,17]. While PyLT alone cannot transform cells in culture, it can confer resistance to growth arrest in low serum condition [10] and protect cells against Fas and TNF- α induced apoptosis [18]. This ability to evade apoptotic signals could potentially promote growth and allow cells to evade cellular-mediated immunity; important events in multistep carcinogenesis [2,19,20]. Moreover, while PyLT does not bind p53 directly, it has the ability to overcome some effects of this master tumor suppressor, notably p53-induced cell cycle arrest [21,22,23]. Finally, all E1A domains known to be essential to human cell transformation are not only conserved in SV40LT but are also found in PyLT [7]. Based on this evidence, we hypothesized that, in addition to its immortalizing activity, PyLT also modulates important functions in early mouse cell transformation.

Here, we present a strategy where PyLT induced immortalization-independent events can be revealed using NIH3T3 immortal mouse embryonic fibroblasts which already harbor immortalization-associated events that have occurred prior to PyLT introduction. Using gene expression microarray analysis, we identified Necdin among a set of genes that were consistently upregulated following PyLT expression in NIH3T3 cells. Necdin was first identified as a neuronal differentiation marker associated with growth arrest [24,25,26], but has since been found in several normal tissues [27,28,29,30,31]. Necdin interacts with the viral oncoproteins SV40LT and E1A [32] and is functionally similar to pRb since it can promote growth arrest by interacting with E2F1 to repress its

transcriptional activity [32,33]. In accordance with this function, Necdin overexpression shows growth inhibitory properties in NIH3T3 and SaOS cell lines [26,32]. However, it is also expressed in myogenic precursors that have a high proliferating potential [34]. Necdin is a p53 target gene and physically interacts with the p53 protein product suggesting a functional relationship [35,36]. Furthermore, the expression of Necdin can protect cells from apoptosis in different models [29,33,34,37,38,39], including p53-induced apoptosis [35]. Therefore we hypothesize that during carcinogenesis, and depending on the cellular context, Necdin could possess opposing functions and may act as a tumor suppressor based on its similarity with pRb proteins, or as an oncogene through its capacity to inhibit apoptosis and p53-dependent tumor suppressive cell fates.

Results reported here support this dual functionality for Necdin. We show that despite the growth suppressive functions of Necdin, it was possible to derive growing cell populations expressing constitutively high levels of Necdin. These high levels of Necdin interfered with p53 activity and contributed to an ineffective growth arrest in response to stress. Overall, we provide evidence suggesting that upregulation of Necdin expression could provide advantages for p53 wild type cells during early carcinogenesis through its ability to decrease signaling downstream of the p53 pathways. Interestingly, we found higher Necdin expression to be associated with low malignancy potential (LMP) ovarian tumors, where p53 mutations are rare, compared to high grade invasive ovarian cancer (TOV).

Results

Gene statement mapping of PyLT expressing mouse fibroblasts

NIH3T3 mouse fibroblasts were transfected with a PyLT non-episomal expression plasmid and the selected clones were assessed for stable PyLT expression at the mRNA and protein level (Figure 1, Supplementary data 2). Selected clones were used for microarray analysis comparing PyLT-expressing clones to a second group composed of parental NIH3T3 cells as well as clones that did not express a detectable amount of PyLT. A variation cut-off set to > 1.5 -fold with a P value of ≥ 0.02 generated 194 candidates significantly modulated by PyLT, composed of 160 upregulated and 34 downregulated genes (Supplementary data 1). To refine candidate selection, we imposed a further selection criteria on the 194 genes selected in the primary analysis based on the observation that genes displaying co-transcriptional regulation often interact by functional relationships [40]. Levels of PyLT were correlated to the amplitude of fold-change expression (either up- or down-regulation) which identified 26 candidate genes whose expression varied proportionally to PyLT (Table 1). As an example, note the correlation between the variation in Necdin gene expression and PyLT (Table 1, inset). These genes represented the strongest candidates with 15 upregulated and 11 downregulated genes.

The generated data was validated by Northern blot analysis using a selected number of genes. Expression levels on Northern blots were compared to corresponding microarray expression values (Figure 1 and data not shown). Gene expression variations observed on Northern blots with full-length cDNA probes were highly similar to the data generated by the Affymetrix oligonucleotide microarray for all probes and clones tested (Figure 1). Some full-length cDNA probes generated more than one band by Northern blots although at least one band closely followed the expected microarray pattern (see α -sm-actin and Necdin, Figure 1). These bands may represent transcript variants or closely related genes. Gapd,

Dohx as well as Rsp2 showed little variation across all clones and were used as loading controls.

Validation of a selected candidate gene, Necdin, on an extended NIH3T3 clone set.

Among all candidates identified, the gene encoding Necdin was selected for further study. Microarray analysis showed an upregulation of mRNA up to five-fold (T-test, $P < 0.001$) (Table 1 inset). In addition, a second probe set was associated with the Necdin gene (94811_s_at) and also revealed a 3.6-fold upregulation, although with a P value of 0.04 (see supplementary material). To further validate the microarray data, Necdin expression was analyzed on an extended set of six NIH3T3 sub-clones and nine independent PyLT-expressing NIH3T3 stable clones not included in our initial analysis (Figure 2A). The higher expression levels of Necdin observed when PyLT is expressed, as determined by Northern blot analysis, correlated well with the data derived from microarray analyses. Moreover, the use of a nonradioactive Dig-labeled probe gave only one specific band around the expected size of 1.6 kb, confirming the identity of the lower band in Figure 1 as Necdin. Some clones with variable levels of PyLT expression were also used to confirm that the variation measured at the RNA level was visualized at the protein level for Necdin (Figure 2B). Furthermore, when we derived a new heterogeneous population of NIH3T3 cells expressing PyLT (NIHLT), we again observed an upregulation of Necdin expression compared to vector-transfected population control (NIH) (Figure 2C and Figure 3A inset). Necdin variation could be seen as early as 72hrs post-transfection of PyLT. These results show that elevated Necdin expression levels were a reproducible and constant phenotype in PyLT-expressing NIH3T3 cells and not caused by a clonogenic effect thus suggesting that Necdin may be involved in some of PyLT oncogenic functions.

PyLT induced Necdin expression independently of Rb inactivation

In order to understand the underlying mechanisms behind the increase in Necdin expression upon PyLT expression, we used different well-characterized mutants of important PyLT domains (Figure 2D). Rb binding deficient LT-c/s is unable to immortalize primary cells while LT-CKII has an increased Rb binding capacity compared to wild-type and demonstrates twice the immortalization potential [12]. Deletion of the zinc finger in mutant LT-delZ does not affect Rb binding but enhances the immortalization potential of the protein [41]. The amount of protein expressed from transfection of these three mutants in NIH3T3 cells was variable, with the mutant LT-c/s exhibiting the lowest level of expression (Figure 2D). However, it was clear that the LT-delZ mutant, even with a high level of expression, did not induce Necdin when compared to other mutants. The LT-c/s mutant was able to reproduce the increase in Necdin expression even with an overall lower protein level. The LT-CKII mutant also showed similar increases in Necdin expression (Figure 2D).

These results suggest that Necdin expression is not associated with the immortalization function of PyLT since the mutation of PyLT affecting the modulation of Necdin expression (LT-delZ), does not compromise its immortalization potential.

Necdin overexpression does not affect NIH3T3 proliferation in long term experiments

Necdin has been reported as a growth suppressor [26], and it is counterintuitive that its expression would be stimulated by a viral protein such as PyLT whose main function is to stimulate cell cycling to promote viral DNA replication [9,42]. NIH3T3 and PyLT-

expressing NIH3T3 cells were thus compared. No differences in cell proliferation were observed (Figure 3A), suggesting that PyLT could prevent Necdin-induced growth arrest, perhaps through a direct interaction as proposed for SV40LT [32]. However, expression of a Necdin-GFP fusion revealed that Necdin localized in punctuate nuclear structures while PyLTGFP was diffusely dispersed throughout the nuclei and was excluded from similar structures (Figure 3B).

To further assess the effect of Necdin modulation in our model, we used either gain or loss of function experiments. Three different shRNAs were transduced in NIH and NIHLT cell populations resulting in decreased Necdin expression (Figure 3C). Consistent with a role for Necdin as a growth suppressor, removing Necdin expression by shRNA increased cellular proliferation of NIH and NIHLT cell populations (Figure 3D and 3E). Additionally, no cell death was observed in NIHLT cells after Necdin removal indicating that its expression was not necessary to maintain a PyLT-expressing cell population. While NIH and NIHLT cells proliferate at the same rate, it remained possible that Necdin levels were not elevated enough to cause growth arrest in these cell lines. Therefore, we overexpressed Necdin in NIH and NIHLT cells using a lentiviral transduction system (Figure 3F). A decrease in growth rate was observed shortly after the expression of Necdin (Supplementary data 3), as previously shown by others [26]. However, maintaining these populations for longer periods of time in culture allowed us to derive populations that still expressed high levels of Necdin without any growth defects (Figure 3G and Figure 3H). These populations stably expressing Necdin were further characterized.

PyLT allows bypass of p53-dependent growth arrest induced by nutlin-3

Necdin interacts with p53 and possibly modulates its activity [35,39], which raises the possibility that PyLT exerts its inhibitory effect on p53 through Necdin induction. Nutlin-3 is a small molecule antagonist of MDM2, which prevents the interaction between

MDM2 and p53, thus promoting the accumulation of p53 in cells [43]. It has been recently shown that nutlin-3 can efficiently induce cell cycle arrest or apoptosis in different cancer cell lines with functional p53 [44]. To assess which response was induced in our model, the NIH3T3 cell line was treated with nutlin-3 and proliferation was followed by flow cytometry. Stimulation of NIH cells with nutlin-3 resulted in the activation of p53 resulting in p21 induction (Supplementary data 5A) and a gradual growth arrest (Figure 4A). We did not detect apparent cell death as evaluated by the sub-G1 content (Figure 4B). When PyLT-expressing NIH3T3 cells were treated with the same dose of nutlin-3, we observed an important delay in growth arrest without a significant elevation in the amount of cell death (Figure 4A and 4B). To confirm that growth arrest obtained in our model was actually dependent on p53, we used a dominant-negative p53 peptide, GSE22 [45,46] delivered by lentivirus. As revealed by immunostaining, high infection efficiencies were reached with lentivirus use since almost all cells showed expression of GSE22, which resulted in an accumulation of non-functional p53 in the nucleus (Figure 4C). Inactivation of p53 by GSE22 expression (NIH-GSE22) conferred almost complete resistance to nutlin-3 (Figure 4D) thereby showing the p53-dependence of nutlin-3 induced cell cycle arrest in NIH3T3 cells. These results show that PyLT expression clearly protects against a p53-dependent growth arrest, which supports previous reports on the inhibitory activity of the viral protein on p53 [21,22].

p53-dependent growth arrest is delayed by Necdin

To address the question of whether the presence of elevated Necdin levels in PyLT expressing cells may play a role in the delayed p53-response, we examined cell cycle status upon nutlin-3 treatment in cells where Necdin expression was decreased by the use of three different shRNA (Figure 3C). In response to nutlin-3 treatment for 48 hours, an increase in cell cycle arrest was observed when suppressing Necdin expression in NIHLT cells

compared to NIHLT infected with the control recombinant virus, shGFP (Figure 5A). It was observed that shNdn 3, which repressed Necdin less efficiently (Figure 3C), only showed a limited effect (Figure 5A). Thus, the reduced presence of Necdin in NIHLT cells sensitized them to p53 cell cycle arrest. We did not notice significant changes in FACS assays in NIH cells expressing shNdn constructs presumably due to the fact that the parental cells already expressed very low levels of Necdin, and were very sensitive to cell cycle arrest (Supplementary data 4B).

To validate these results, we also used Wst-1 assays to assess the effect of Necdin loss on cell growth. Again, reduction of Necdin levels by shRNA sensitized NIHLT to cell proliferation arrest induced by nutlin-3 (Figure 5B). Significant changes were observed for shNdn 1 and 2 at a dose of 10 μ M while shNdn 3 did not vary significantly. In all experiments, targeting Necdin in NIHLT did not rescue the sensitivity of NIH cells (Figure 5B). With Wst-1 assays, a significant increase in arrested cells after p53-induction was detected in NIH when Necdin was depleted (Supplementary data 4C).

Conversely, Necdin overexpression delayed p53-mediated growth arrest both in NIH and NIHLT as evaluated by DNA content (Figure 5C). Consistent with flow cytometry, Wst-1 assays revealed that the ectopic expression of Necdin appeared to attenuate the effect of nutlin-3 in NIH and NIHLT (but only at the 5 μ M concentration for NIHLT), although this reached statistical significance only in NIH cells (Figure 5D). It should be noted that the mere overexpression of Necdin did not confer to NIH cells the equivalent response to nutlin-3 seen in the NIHLT cells (Figure 5C and 5D). These results suggest that the acquired resistance to growth arrest in PyLT-expressing NIH3T3 cells was in part mediated by Necdin expression but that other factors are presumably also involved. Nevertheless, Necdin could confer growth arrest resistance even in the absence of PyLT.

Necdin is a p53-target gene induced by different genotoxic stress

Interestingly, we noticed in the course of experimentation that Necdin was induced upon nutlin-3 stimulation. As shown in Figure 6A, a dose-dependent elevation of Necdin protein levels in NIH and NIHLT cells were observed after exposure to nutlin-3. This increase was also observed at the RNA level (Supplementary data 5A and 5B) suggesting transcriptional regulation, rather than a protein stabilization. This transcriptional regulation was p53-dependent since inactivation of p53 with GSE22 peptide abolished the Necdin increase seen in response to nutlin-3 stimulation (Supplementary data 5C). This is consistent with a recent report suggesting that Necdin is a direct target gene of p53 [36]. We then examined if other genotoxic stresses known to induce p53 could also cause Necdin upregulation. Both Camptothecin, a Topoisomerase I inhibitor, and Actinomycin D, an inhibitor of transcription, are known to induce p53 activation [47]. Increased Necdin expression levels were observed in all cells treated with these two drugs (Figure 6B). By extension, this suggests that Necdin is a part of those p53 pathways that can be induced by different signals.

Necdin upregulation in PyLT-expressing cells is independent of p53

Since p53 activation by genotoxic stress induces Necdin expression, we hypothesized that the PyLT induction of Necdin may involve an increase in p53 basal activity in NIHLT cells. To assess p53 involvement, the p53 inhibitor GSE22 was introduced in NIHLT cells and changes in p53-induced gene expression were analyzed. Expression of GSE22 affected basal mRNA of p53 target genes as judged by the level of p21 (2.5-fold decrease) but did not affect the control GAPDH (Figure 6C). In the same extract, the Necdin level was not affected by inhibition of p53 function (Figure 6C). The

data demonstrate that although Necdin is induced by p53 in response to cellular stresses, PyLT does not require p53 to mediate increased Necdin expression levels.

Necdin is expressed in low malignant potential ovarian cancer

Since Necdin expression can be regulated independently of p53 and can repress p53 activity, it is possible that deregulation of Necdin may be important in cancers with wild type p53, where Necdin may play a role in inhibiting the p53 tumor suppressor activity. To this end, we examined Necdin expression in LMPs versus TOVs, two distinct types of serous ovarian cancer thought to have different molecular origins, and where p53 mutations rarely (in LMPs) or frequently (in TOVs) occur [48,49]. A set of seven LMP and eight TOV tissues were used and Necdin mRNA levels were determined by quantitative real-time PCR analysis. The relative expression levels revealed a significant difference in Necdin expression ($P < 0.0001$) between tissues from LMP and TOV, with higher levels found in LMP tissues (mean value was > 10 -fold higher) (Figure 7).

Discussion

Genes regulated by PyLT were identified in a mouse fibroblast cell culture model. Considering that PyLT has anti-apoptotic activities [18], that it maintains strong homologies in essential domains to the transforming oncogenes SV40LT and E1A [7], and that its expression in transgenic mice leads to tumors development [15,16], it was hypothesized that these PyLT structure-function properties could provide clues to early steps during the transformation process. Since NIH3T3 cells were already immortalized mostly through the biallelic deletion of the INK4 locus [50,51], PyLT immortalization was

not a selection criteria in our model and we considered candidates as possibly immortalization-independent.

Our microarray analysis identified a list of potential transformation-associated candidates genes that corroborates the existing literature and point out the importance of viral proteins as tools to identify events related to cancer progression. For example, Transgelin, an actin-binding protein downregulated in our study, is also downregulated in virally transformed human cells and in human breast, colon and lung cancers [52,53]. Alternatively, DNA methyltransferase 1 (Dnmt1), which contributes to the maintenance of tumor suppressors silencing in colon cancer progression and in tumorigenic cell lines [54,55], is also upregulated by PyLT expression. Importantly, Dnmt1 is recognized as a significant event during the carcinogenesis process in models related to polyomavirus T antigen expression including the prostate cancer mouse model expressing SV40LT (TRAMP) [56], and transformation of cell lines by SV40LT or the human polyomavirus BKV [57,58]. Interestingly, Necdin was also upregulated in a mouse prostate cancer progression model based on SV40LT expression [59]. Initial observations for Necdin expression in human cancer suggested a tumor suppressor function due to its lack of expression in brain tumor cell lines [25], its decrease in melanomas [60] and in bladder cancer cell lines and tumors [61]. Conversely, a more recent study revealed loss of imprinting results in higher Necdin expression in pancreatic cancer [62]. Necdin function in cancer remains poorly defined and warrants further investigation.

Identification of functional activities associated with PyLT

One way to identify closely interacting proteins (physical or functional associations) is to monitor their mRNA expression levels since they are often co-regulated [40]. Since the group of genes shown in Table 1 most closely correlates with PyLT expression at the transcriptional level, these genes represent good candidates for functional associations. One

particularly promising member of this group is Necdin, whose gene product has Rb-like growth regulatory activities and has been shown to interact with p53 and viral oncogenes such as SV40LT and E1A [32,35]. It has been hypothesized that the Rb-like activity of Necdin leads to cell growth arrest when overexpressed in neurons and fibroblasts [26,32]. In particular, the growth inhibitory effects of Necdin were described in a model system using NIH3T3 cells [26]. Here, we demonstrate that PyLT expression in NIH3T3 cells results in increases in both Necdin transcript and protein levels but without altering the long-term growth of PyLT-expressing cells. This suggests that PyLT can inhibit the known growth suppressive functions of Necdin [26]. Surprisingly, continued proliferation in the presence of high levels of Necdin was not due to the simultaneous expression of PyLT since the overexpression of Necdin alone produced long-term Necdin-expressing NIH3T3 cells. Indeed, cell growth slowed immediately following Necdin expression, as previously described [26], but as shown in this study, the cells rapidly recovered and maintained normal proliferation rates while maintaining high Necdin levels. This divergence in Necdin-influenced cell proliferation may be explained by differences between the experimental approaches. Although the previous study also used the mouse Ndn sequence, the protein was conditionally expressed in NIH3T3 cells with an inducible expression system. Three independent clones were selected and analyzed immediately after induction. In contrast, we used lentivirus-mediated Necdin expression and evaluated the growth potential of heterogeneous populations after a period of selection and some passages in culture. While long-term Necdin overexpression was not incompatible with cell growth, we cannot yet conclude whether the emerging population came from a selective pressure for cells able to tolerate high Necdin expression or if they came from a transient anti-proliferative effect of Necdin from which most cells can adapt. Interestingly, we also experienced difficulty with the production of recombinant lentiviruses from Necdin constructs (also reported by [32]), potentially reflecting Necdin related growth inhibition in the packaging cell line 293FT.

Necdin regulation by PyLT-Ag

The increase in Necdin expression in response to PyLT expression was not caused by Rb inactivation but was dependent on the presence of the PyLT C-terminal zinc finger domain. This PyLT domain is required for viral DNA replication possibly due to its involvement in protein-protein interaction, which allows the formation of PyLT hexamers [63]. Given that the zinc finger motif is conserved in several polyomavirus large T antigens, this supports the idea that other large T antigens may also induce Necdin expression. Although mutations in this domain do not abolish the immortalization property of PyLT [41], deletions in this domain of SV40LT or papillomavirus E7 decreased their transforming potential [64,65]. Accordingly, Necdin could have a potential role in the transformation process involving viral proteins but not in immortalization. Necdin induction by PyLT could arise through direct PyLT interaction with DNA or with cellular transcription factors via its zinc finger domain to enhance their activity at the Necdin promoter. One promising candidate is Lim domain only 4 (LMO4) known to control the expression of the Ndn gene [66] and that was also upregulated following PyLT expression (Table 1). LMO4 demonstrates variable expression in different cancers but its role remains unclear since in breast cancer, high LMO4 expression is associated with a poor prognosis [67,68] while in pancreatic cancer it is associated with a better survival [69,70].

The p53-Necdin negative feedback loop

Necdin was identified in our screen using conditions that highlight stable events occurring in continuously proliferating cells. These conditions presumably reflect the plasticity of heterogeneous cancer tissue where each cell will not have the exact same fate upon exposure to stress and where selection pressures allow the emergence of growth/survival promoting properties. According to the tumor suppressor function

previously proposed for Necdin, it would be beneficial for a cell to lose Necdin expression to acquire a proliferative advantage, unless maintaining Necdin was somehow advantageous to the cancer cell. Therefore, we examined whether in some contexts, increased Necdin could paradoxically promote growth or survival.

A possible role for Necdin in DNA damage response was suggested by the upregulation of Necdin following different genotoxic stresses. By using nutlin-3, we showed that p53 activation clearly induced Necdin in a dose dependent manner, supporting a previous report that identified Necdin as a p53 target gene [36]. Moreover, we show that modulation of Necdin level affects p53-dependent growth arrest. Indeed, we demonstrate that an increase in Necdin expression results in a delayed cell cycle arrest while inversely targeting Necdin by shRNA accelerates this arrest. The interaction of Necdin with p53 [35] suggests that this delay in growth arrest is probably associated with a direct inhibitory effect of Necdin over p53. We noted that Necdin affected p21 induction when p53 is induced in our model (supplementary data 4D) supporting previous results [35]. Therefore, interference with p53 transcriptional activity may represent the mechanism underlying the cell cycle arrest variations caused by Necdin. However, we believe that other mechanisms may be involved since p21 mediated-arrest mostly relies on functional Rb [71,72] and in PyLT-expressing cells, the Rb proteins are kept inactive by their interaction with PyLT [73,74].

As p53 induction upon genotoxic stress is associated with multiple additional signaling events, we directly addressed p53 stimulation by exposure to nutlin-3. This specific stimulation results in a functional induction of p53, although the post-translational phosphorylation modifications of p53 observed with genotoxic stress are absent or barely detectable with nutlin-3 [75,76]. This suggests that phosphorylation may not be critical for interaction of Necdin with p53 and that Necdin does not interfere with the phosphorylation status to modulate p53 activity. In addition to phosphorylation, other modifications contribute to p53 activity [77], including acetylation, which is increased upon nutlin-3

stimulation [78]. The deacetylase Sirt1 is a negative regulator of p53 activation [79,80] and Necdin interactions with this protein potentiate its activity upon genotoxic stress [39]. This mechanism is also consistent with the notion that Necdin can inhibit p53 function, but requires further investigation.

Combining our data on p53 inhibition by Necdin with the knowledge that Necdin is a direct p53 response gene suggests that Necdin is part of a negative feedback loop controlling p53 activity. Under normal conditions, this loop is probably well controlled and allows normal regulation of cellular responses as in the case of the p53 negative regulator and target gene *mdm2* [81,82]. Importantly, our results also show that Necdin can be induced by PyLT in a p53-independent manner, which, in a cancer context, could cause a reduction in p53 activity and potentially contribute to genomic instability.

Necdin is expressed in the borderline ovarian cancer subtype

According to the literature, Necdin expression may not be suitable for tumor progression. Necdin has an anti-angiogenic function by interacting with HIF-1-alpha and by negatively regulating its activity on VEGF induction [83,84]. VEGF is well-known to play a major role in proliferation and migration of endothelial cells, thereby nourishing and favoring tumor growth by a pro-angiogenic function. Moreover, Crawford and al. [85] identified some genes predictive of metastasis in breast cancer from a quantitative trait locus analysis and found Necdin among their candidates whose expression diminished with increased risk of metastasis. These results evoke a possible limited capacity of tumor progression to an advanced stage in the presence of Necdin expression. In this study, we chose to further characterize Necdin in ovarian cancer since this pathology includes a particular subset of low malignancy cancer. LMPs are non-invasive, or only display micro-invasion, rarely progress to an aggressive metastatic cancer and patients with LMP disease have a 5 years survival rate of 95%. Here, we observed higher expression of Necdin in

LMPs compared to TOVs. In line with this, LMPs have low angiogenesis as compared to TOVs [86], which fits nicely with Necdin's anti-angiogenic activity.

Moreover, LMP rarely have mutation in TP53 while 50 to 80% high-grade carcinomas present abnormalities in TP53 [48,49]. This could indicate that in LMPs, where p53 is wild type, alternative mechanisms are responsible to render p53 inactive. Our results revealed an inhibiting function of Necdin over p53-dependent growth arrest. Therefore, Necdin expression in LMP may attenuate the response when p53 activity is required. Taken together, the data support the notion that in ovarian cancer, Necdin expression correlates with a favorable prognosis. The hypothesis that LMP tumors are precursors of invasive tumors is still controversial, but the evidence suggests that they are two distinct diseases. Expression of Necdin in borderline ovarian tumors could be characteristic of this particular ovarian cancer and may have a biologic impact on p53 pathways and malignancy. However, these possible functions require more investigation.

Conclusion

While the temporal order of multi-step carcinogenesis events may not be crucial, especially since immortalization and transformation are in vitro concepts, the pathways or genes themselves may point to important parameters during carcinogenesis. It is likely that some of the candidate genes identified here may play a role in human cancer. Our results suggest that Necdin harbors both tumor suppressive or oncogenic properties depending on the cellular context. These oncogenic properties were demonstrated here by the inhibitory effect of Necdin over p53-mediated growth arrest and by others where Necdin contributed to p53-induced apoptosis resistance [35,39]. In combination with Necdin expression patterns during ovarian cancer progression, these results warrant further investigation about the context-dependent oncogenic properties of Necdin. Further challenges include

investigating the functional significance of the identified candidates during multistep carcinogenesis.

Acknowledgements

We thank Drs. Luke Masson, Philippe Gannon and Cécile Lepage for helpful discussions and critical reading of the manuscript, the Montreal Genome Center and the Thomas J. Hudson laboratory for their assistance with microarray experiments, and RIKEN for making their cDNA clones available. We are also grateful to Dr. Eric Campeau who generously provided vectors for cloning and lentivirus production. This research was funded by a Canadian Institute of Health Research (CIHR) grant to A.-M.M.-M. Tumor banking was supported by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), affiliated with the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet). V.O. was supported by studentships from the CIHR and the Canderel fund of the Institut du Cancer de Montréal. J.L. is recipient of an Institut du cancer de Montréal Canderel scholarship.

Materials and methods

Cell culture

NIH3T3 cell lines [87] were purchased from ATCC. All cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, gentamycin and amphotericin. Cells were grown at 37°C with 5% CO₂ and kept at low-

density conditions to prevent culture induced transformation [87,88]. For proliferation experiments, 5×10^4 cells were seeded in 6 well plates and the number of living cells determined using the CASY® cell counter model TT or by a hemacytometer. Experiments were repeated at least three times in duplicate. For stimulation, the following reagents were used: Nutlin-3 (5-20 μ M), Actinomycin D (60 μ M) and Camptothecin (5 μ M).

Vectors and transfections

The PGKLTneo plasmid was constructed by introducing Neomycin resistance from the pSV2neo vector into PGKLT [18] and was used to transfect NIH3T3 cells. The PGKLTGFPneo vector was generated by cloning eGFP from Clontech eGFP-N1 vector in frame with PyLT into PGKLTneo. A small C-terminal deletion of PyLT was introduced encompassing amino acids 685-785. All stable clones were selected with 0.5 mg/ml G418 applied 48 hrs post-transfection and named “LT” follow by a different number representing each independent clone. Heterogeneous populations expressing PGKLTneo plasmid or the control vector PGKN were generated with Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen). We referred to these heterogeneous populations as NIHLT and NIH respectively. Mutant forms of PyLT are described elsewhere [12,41]. Briefly, LT c/s contain a cysteine to serine substitution in amino acid 144. In LT CKII, some amino acids in the phosphorylation motif adjacent to the Rb binding motif were substituted to mimic an E7 CKII motif. LT delZ contains a deletion in amino acids 452 to 469 in the zinc finger domain. Necdin-GFP was generated by cloning cDNA from a Riken clone (clone 1500000G13) in a N-terminal fusion protein with GFP in the pEGFP-C2 vector (Clontech).

Lentiviral constructs and infections

Mouse Ndn was PCR amplified from a Riken clone (clone 1500000G13) followed by insertion in pENTR/D-TOPO® (Invitrogen). The generated pENTR-ndn vector was recombined in the 670-1 vector (pLenti CMV/TO Puro DEST, Addgene 17293) [89] using

recombination cloning technology from Invitrogen. Empty control vector (referred to as Vector in figures) was the product of 686-1 (pENTR4 no ccDB, Addgene number 17424) [89] recombined with the 670-1 vector. eGFP and GSE22 (encoding an interfering p53 fragment) are described elsewhere [45,90]. For gene repression, pLKO.1 lentiviral shRNA vectors targeting the mouse Ndn gene were purchased from Open Biosystems: shNdn1 (TRCN0000103780), shNdn2 (TRCN0000103781), shNdn3 (TRCN0000103782). shGFP from Open Biosystems (RHS4459) was used as control vector. The Virapower lentivirus expression system (Invitrogen) allowed us to deliver genes of interest or shRNA in mixed populations (NIH and NIHLT). Briefly, the vector of interest was cotransfected with a packaging mix in 293FT. The supernatant was collected after three days and was either used fresh or concentrated. Infections were done overnight in the presence of polybrene, and puromycin selection was applied 48hrs later.

RNA and Proteins extractions

RNA was extracted directly from 80% confluent 100mm petri dishes with TRIzol™ reagent (Gibco/BRL, Life Technologies Inc.). RNAs used in microarray experiments were further purified with QIAGEN RNeasy columns. Total proteins were extracted from 80% confluent 100 mm plates in buffer containing: 50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TRITON™ X-100, protease inhibitor cocktail (Complete Protease Inhibitor cocktail Tablets, Roche), NaF and NaOV.

Microarray analysis

Biotinylated hybridization targets were prepared from total RNA as described [91]. Affymetrix arrays Mu74a were used in experiment 1 to hybridize cRNA from the parental NIH3T3 population and from clones NIHLT11, NIHLT47, NIHLT40, NIHLT50. Arrays Mu74a2 were used in experiment 2 to hybridize NIHcM, an untransfected NIH3T3 sub-clone, and clones NIHLT7, NIHLT12, NIHLT32, NIHLT33, NIHLT46, and NIHLTGFP

(expressing a PyLT eGFP fusion protein). Gene expression levels were calculated for each EST from the scanned image by the Affymetrix GeneChip software algorithm. After normalization to the total average intensity, all probe sets whose expression levels were below 50 were raised to 50. The ~25% of probes on the Mu74a arrays corresponding to Affymetrix synthesis errors were removed from both experiments for subsequent analysis. Based on data acquired by Northern blots analysis, individual microarray datasets were pooled into two groups, a first group containing samples with clearly detectable PyLT expression (NIHLT11, NIHLT32, NIHLT40, NIHLT46, NIHLT47, and NIHLT50), and a second group of samples lacking PyLT expression (NIH3T3, NIHcM, NIHLT7, and NIHLT12). Groups were compared against each other to detect significant differences in gene expression (Fold change of more than 50% increase/decrease at a P value of 0.02 or better, see supplementary data 1). The candidate genes modulated at the transcriptional level by PyLT were reordered using GENESPRINGTM to identify a group of genes that have an expression pattern closely matching PyLT expression levels (Figure 1). For raw microarray data, see supplementary material.

Candidate gene expression validation

Northern blot analysis has been described elsewhere [18]. Radiolabeled probes were generated from RIKEN full-length cDNA. A subset of Northern blots were hybridized and revealed using Dig-labeled cDNA probes according to the manufacturer's instructions (ROCHE Diagnostics).

Western blotting and immunocytochemistry

The following antibodies were used for western blotting: Necdin (07-565), GFP (JL-8, 8371-2), p21 (F-5, sc-6246), p53 (Ab-1, clone PAb-240), HSP60 (N-20, sc-1052), Actin (AC-15, ab6276). The polyclonal antibody specific to PyLT (Mm1a) was produced by injection of PyB4a to form ascites in BN rat cells [92]. All HRP-conjugated secondary

antibodies were purchased from Santa Cruz. Immunocytochemistry was performed on formaldehyde fixed cells with the DakoCytomation kit according to the manufacturer's protocol. p53 Pab240 antibody was used to detect non-functional p53 in the native form.

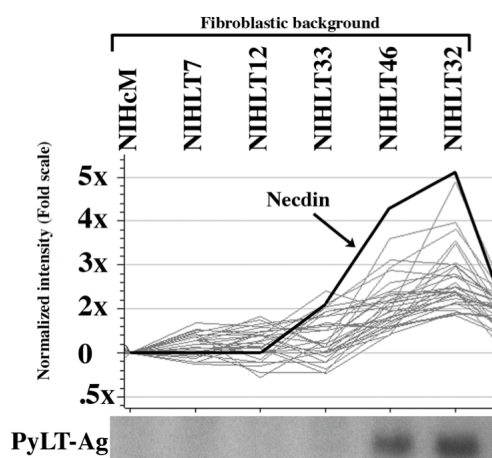
Cell cycle analysis and proliferation

For p53 activation, 5 μ M or 10 μ M of nutlin-3 (Sigma) was used, with DMSO being used as untreated control. Flow cytometric analyses were performed to characterize cell cycle profiles. Approximately 1×10^5 cells were seeded in 6-well plates and treated 24 hours later for the indicated period of time. Cells and medium were collected and centrifuged. Cells were fixed and stained with propidium iodide. The use of nutlin-3 mimics the overexpression of p53 as it causes the release of p53 from mdm2, which results in its accumulation [43]. Nutlin-3, like p53 overexpression, has been described to induce growth arrest in both the G1 and G2 phase [93,94,95]. Accordingly, we present FACS data as a ratio of arrested cells (G1+ G2 phases) over proliferating cells (S phase). Cell proliferation reagent WST-1 (Roche) was used to follow growth arrest in NIH and NIHLT treated with nutlin-3. 5×10^3 cells were plated in 96-well plates and treated 24 hrs later for a period of 48 hrs. Growth arrest is the difference between proliferation of untreated cells and proliferation of treated cells (O.D. untreated – O.D. treated). This result was normalized to growth arrest with the internal control NIH.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was extracted with TRIzol® reagent as described by the manufacturer and the quantity and quality were determined with the Agilent 2100 Bioanalyzer and NanoDrop. cDNA was generated using the QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen). For Q-PCR, SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) was used for cDNA labeling and was performed with the Rotor-Gene 3000 Real-Time PCR Detection System (Corbett Life Sciences). The Pfaffl analysis method [96] was applied to data generated by

Q-PCR. Experiments on cell lines were done in duplicate on three independent samples of each group (NIHLT-vector and NIHLT-GSE). Primer sequences were from RTprimerDB [97] and are available upon request. For ovarian cancers study, following appropriate consent, tumor samples were collected through the Division of Gynecologic Oncology at the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (Hôpital Notre-Dame). We focused on samples of serous histopathology obtained from chemotherapy naïve patients. Experiments on ovarian tumor tissues were done twice in duplicate for each sample. Comparative gene expression analysis in ovarian samples was performed using ERK1 as an internal control based on previous results [98].



genbank	common name	Unigene	description	AVG	AVG	fold	P value
				PyLTneg	PyLTpos		
D76440	Ndn	Mm.7089	Mouse gene for necdin	72	340	4.71	0.0009
X83577	Gpc4	Mm.1528	glypican 4	50	173	3.46	0.0001
X15591	Ctla2b	Mm.30144	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	58	196	3.36	0.0172
AI846182	Hip1r	Mm.149954	huntingtin interacting protein 1 related	50	165	3.30	0.0031
M17327	Mlvpb	Mm.218091	endogenous leukemia virus polytropic provirus DNA	54	179	3.30	0.0019
M17080 ^a	Cd4; L3T4; Ly-4		T-cell surface glycoprotein CD4 precursor	64	152	2.39	0.0001
D49921	Gdnf	Mm.4679	glial cell line derived neurotrophic factor	60	138	2.31	0.0027
AI842137	Fam54	Mm.30153	family with sequence similarity 54, member B	50	114	2.28	0.0104
U34960	Gnb2	Mm.30141	guanine nucleotide binding protein, beta 2	797	1738	2.18	0.0000
AW125505	Tnfaip8l1	Mm.2312	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like protein 1	53	109	2.06	0.0027
L29123	Fdx1	Mm.1061	ferredoxin 1	480	963	2.01	0.0126
AF074600	LMO4	Mm.479165	LIM domain transcription factor	769	1437	1.87	0.0066
AA709672	Klc1	Mm.216203	kinesin light chain 1 isoform 1D	222	373	1.68	0.0053
AF036008	Dnmt1	Mm.7814	DNA methyltransferase (cytosine-5) 1	500	811	1.62	0.0001
AI854624	Eif3b	Mm.21671	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	998	1567	1.57	0.0009
M32484	Rhox5	Mm.423066	homeobox protein Rhox5	2073	98	0.05	0.0000
Z68618 ^a	Tagln; Sm22a		SM22a gene, transgelin	1099	153	0.14	0.0051
AI842649	MyI9	Mm.271770	Myosin, light polypeptide 9, regulatory	319	50	0.16	0.0167
X13297	Acta2, a-sm-actin	Mm.213025	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	3375	1136	0.34	0.0075
AI839082	Itga3	Mm.57035	integrin alpha-3	213	72	0.34	0.0000
AI845584	Dusp6	Mm.1791	dual specificity phosphatase 6	581	227	0.39	0.0050
AW047756	Avpi1	Mm.18625	Arginine vasopressin-induced 1	174	73	0.42	0.0148
L02914	Aqp1	Mm.18625	aquaporin 1	315	133	0.42	0.0198
AA689927	Ocel1	Mm.440170	occludin/ELL domain-containing protein 1	140	60	0.43	0.0000
X99915 ^a	Hmga2		HMG1-C gene, exon 1, high mobility group AT-hook 2	1821	835	0.46	0.0001
AI841279	Aco17	Mm.296191	Acyl-CoA thioesterase 7	648	365	0.56	0.0142

^a These GenBank IDs are not currently assigned to a Unigene cluster.

Table 1 PyLT mediated changes in gene expression profile in NIH3T3 cells.

A partial listing of PyLT modulated genes representing candidates whose expression variation correlates with the level of PyLT mRNA. Inset shows Genespring software representation of expression of these candidates with emphasis on Necdin expression. PyLT mRNA expression levels by Northern blot analysis are presented to permit correlations (see Figure 1).

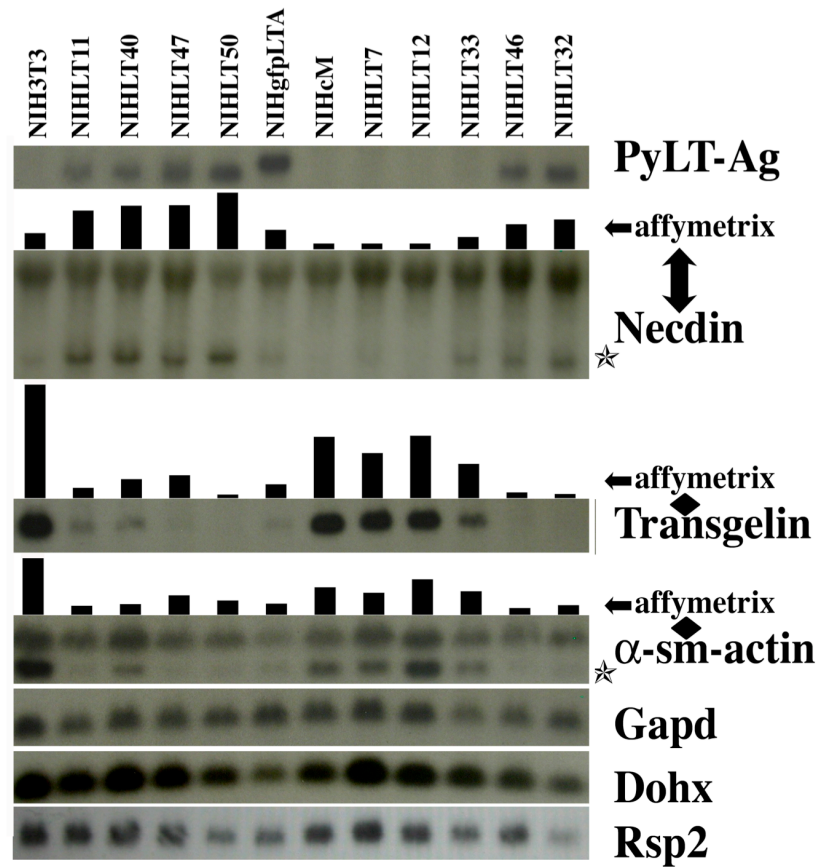


Figure 1 Validation of Affymetrix microarray data for selected genes in NIH3T3 and NIHLT clones.

Northern blotting (using full-length radiolabeled cDNA probes) was used to validate selected Affymetrix microarray patterns. Northern blots are compared to bar graphs representing normalized microarray data. Stars represent the transcript corroborating microarray data when more than one band was detected by autoradiography for a single probe. Note the lack of detectable PyLT in clone NIHLT33, although transcripts can be seen on longer exposures (data not shown). There is no microarray data for the PyLT transcript. PyLT expression was verified on the total RNA used for microarray analysis.

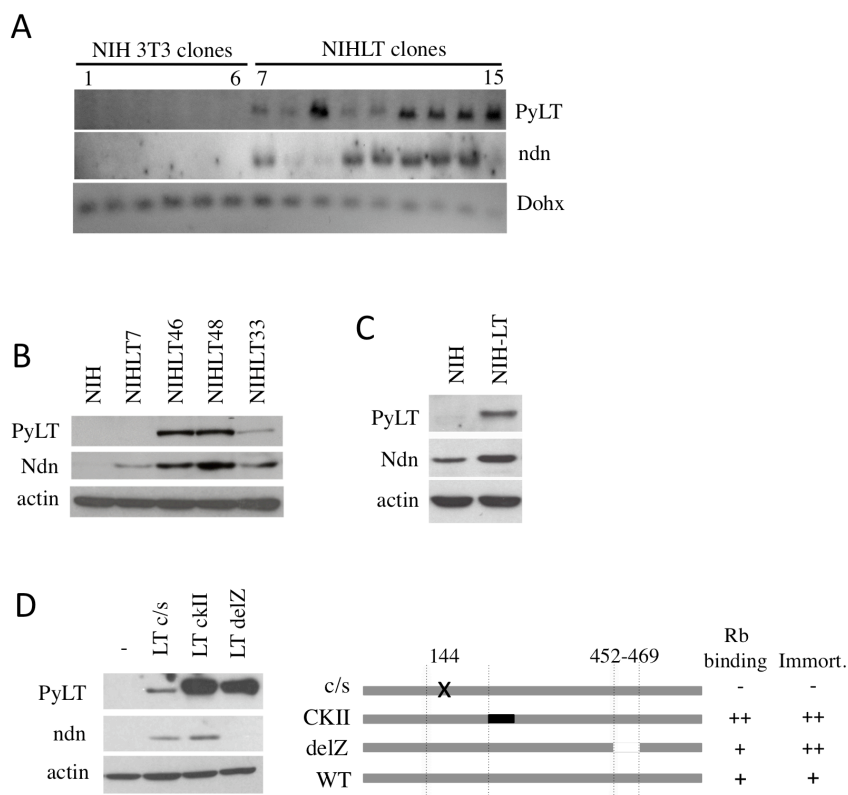


Figure 2 Necdin as a relevant candidate.

(A) Validation of the microarray identified Necdin gene by Northern blot analysis on an independent extended clone set. Lanes 1 to 6 represent individual NIH3T3 sub-clones. Lanes 7 to 15 represent individual NIH3T3 clones transfected and selected to express PyLT. Clones were independent from those used in the microarray analysis. Full-length DIG-labeled probes were used and exposure times were adjusted. DOHX was used as a control. (B-C) Necdin protein level in (B) clones expressing variable level of PyLT or (C) new heterogeneous populations of NIH3T3 cells stably transfected with PyLT (NIHLT) or empty vector (NIH). (D) Different mutant forms of PyLT protein expressed in NIH3T3 were used to determine the domain involved in Necdin modulation. Western blot shows protein expression levels. Representation of mutants described in the results section with Rb-binding and immortalization capacity as reported previously [12,41].

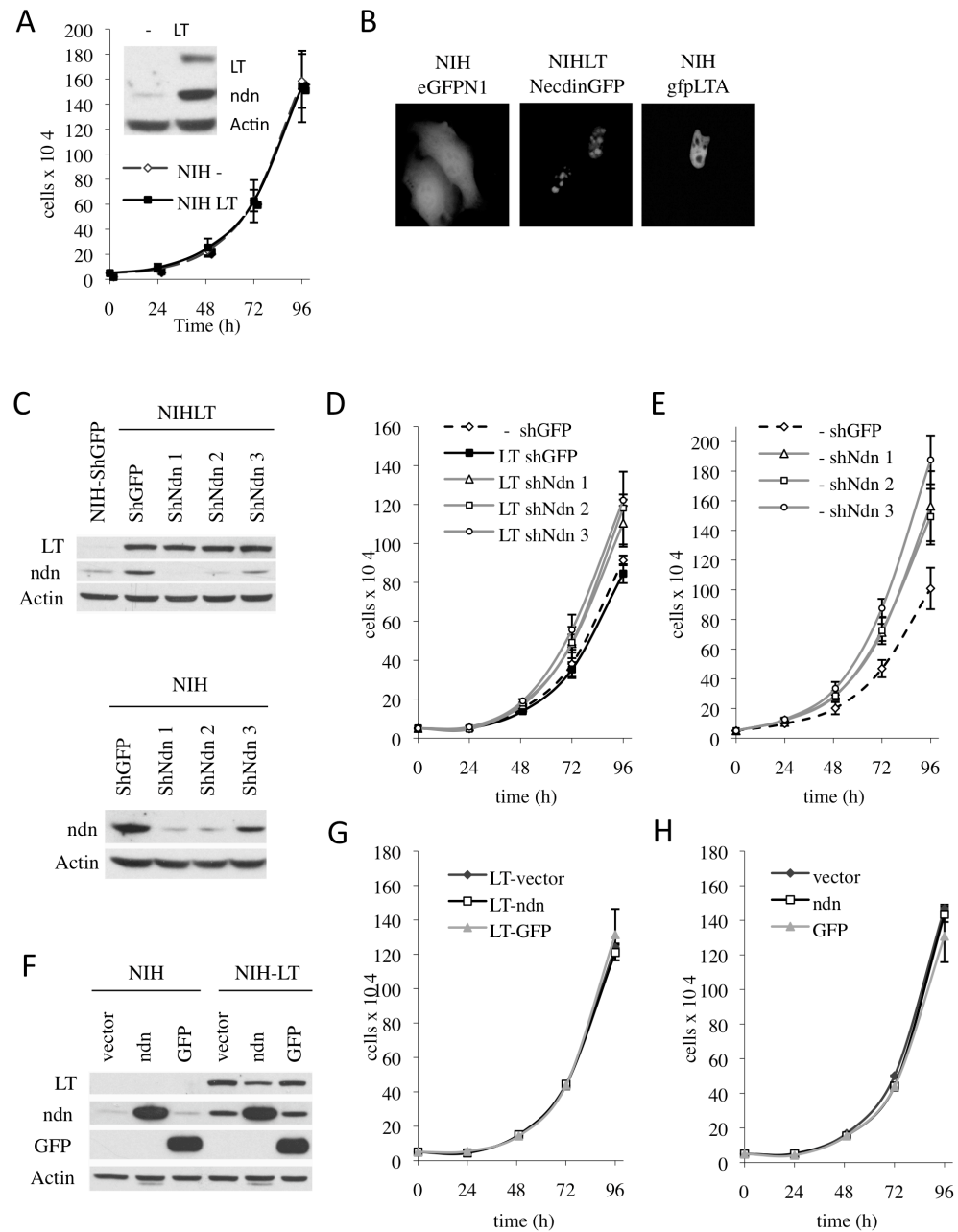


Figure 3 Necdin influences the proliferation of NIH and NIHLT populations.

(A) NIH and NIHLT mixed populations proliferate at the same rate. (B) Necdin and PyLT are present in different cellular localizations. GFP fluorescence from living cells in NIH3T3 transfected with the empty vector (eGFPN1), NecdinGFP fusion protein in cells expressing

PyLT (clone NIHLT46) or GFP fluorescence associated with the PGKLTGFPneo construct (NIHgfplTA). (C) Decrease of Nectin protein levels by three different shRNAs transduced by lentivirus infection in NIHLT and NIH. Growth curves for NIH (D) and NIHLT (E) revealed that cells depleted in Nectin proliferate faster. (F) Protein expression level in NIHLT and NIH cells with overexpression of mouse Nectin, the GFP control or vector alone. Growth curves for NIHLT (G) and NIH (H) expressing exogenous Nectin after a certain period of time did not shown differences in their growth rate.

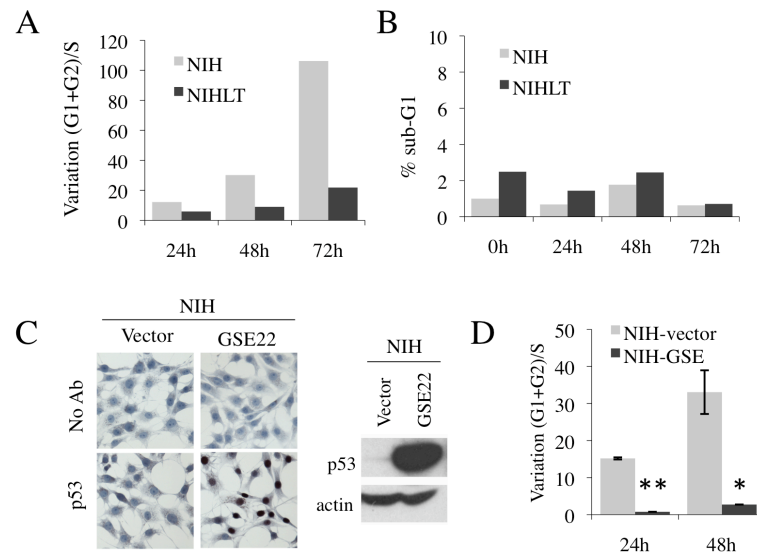


Figure 4 Nutlin-3 induces a p53-dependent growth arrest in NIH3T3 cells that is bypassed by PyLT expression.

(A-B) Flow cytometry analysis of NIH or NIHLT populations treated with nutlin-3 (5 μ M) demonstrate that nutlin-3 induces a growth arrest in the cell lines and that the NIHLT population is more resistant. Results from one representative experiment. (A) Cell cycle arrest was represented by the variation of ratio of arrested cells (G1+ G2 phases) over proliferating cells (S phase) in treated cells versus untreated controls. (B) No variation of the percentage of cells in Sub-G1 phase, representing cell death, was observed after nutlin-3 treatment. (C-D) The use of a p53 inhibitor peptide (GSE22) validates the p53-dependence of the growth arrest induced by Nuclin-3. (C) High efficiency of infection and functionality of the GSE22 peptide were demonstrated by accumulation of non-functional p53 in the nucleus by immunocytochemistry detecting p53 in NIH transduced with GSE22 or control vector. Cells were counterstained with hematoxylin. The stabilization of non-functional p53 was also seen in Western blots of the corresponding infected cells. (D) FACS analysis on NIH transduced with GSE22 or vector with nutlin-3 treatment (*P < 0.05, **P < 0.01 t-test).

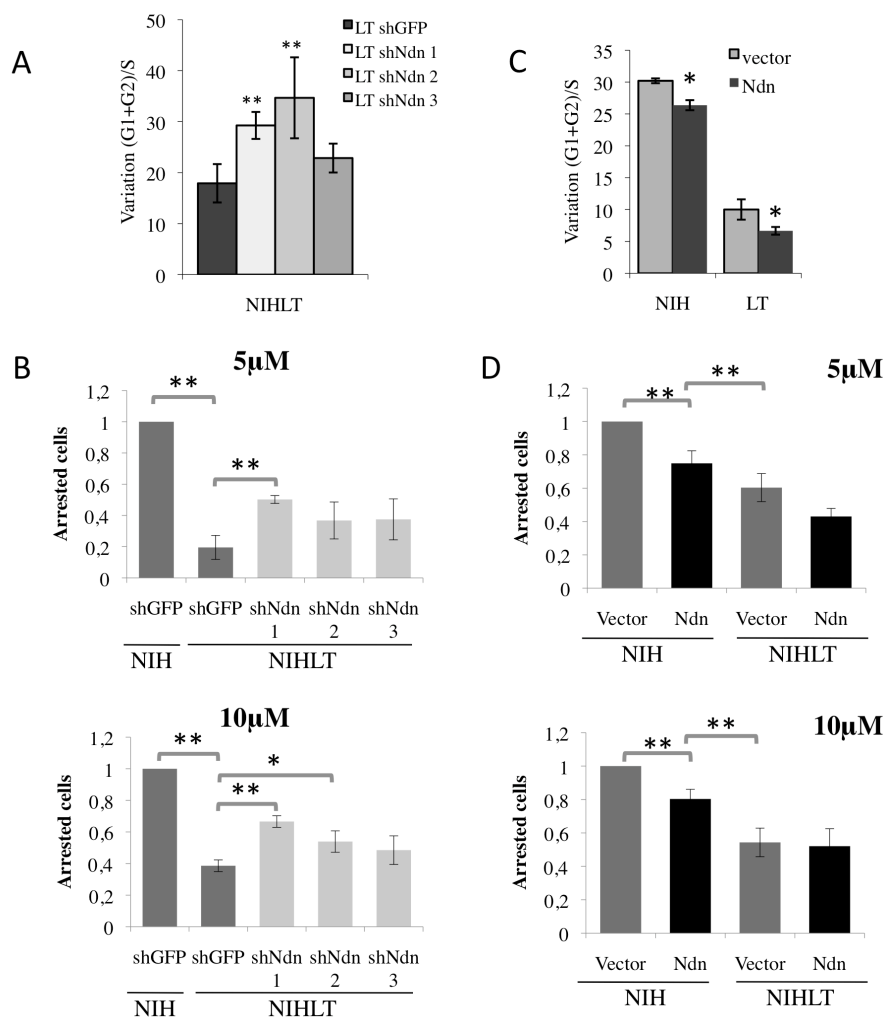


Figure 5 Necdin confers resistance to p53-dependent growth arrest.

(A-B) NIHLT cells depleted in Necdin by shRNAs and exposed to nutlin-3 showed a delayed growth arrest (A) measured by DNA content analysis by FACS (as described in figure 4A) or (B) assessed by Wst-1 colorimetric assay. Results for Wst-1 represent normalized data according to the portion of arrested cells (O.D. untreated – O.D. treated) relative to arrested control NIH after 48h of exposure to nutlin-3. (C-D) NIH and NIHLT cells overexpressing Necdin show growth arrest resistance upon nutlin-3 treatment. (C) FACS analysis or (D) Wst-1 colorimetric assay (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ t-test).

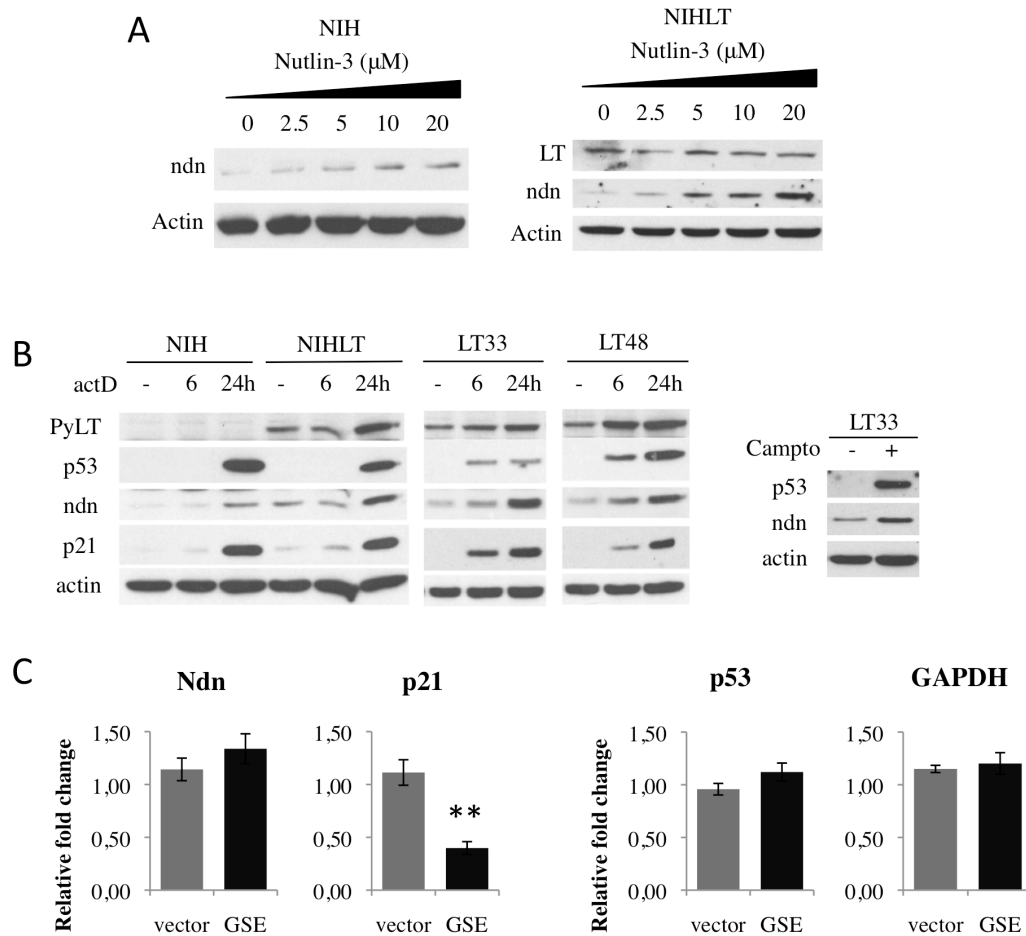


Figure 6 PyLT-induced Necdin expression is p53-independent.

Necdin is induced following activation of p53. (A) Dose response treatment with nutlin-3 increased Necdin protein level in NIH (left) and NIHLT (right). (B) Genotoxic stress induced by Actinomycin D and Camptothecin also stimulated Necdin protein expression. (C) In NIHLT cells, Necdin expression is not dependent on p53 activity as assessed by p53 inhibition. Mean of relative expression of Necdin, p21, p53 and GAPDH in NIHLT cells with or without the p53 inhibitor GSE22. Expression was measured by Q-PCR in three independent samples from each group. Expression is relative to actin. (**P < 0.001, t-test)

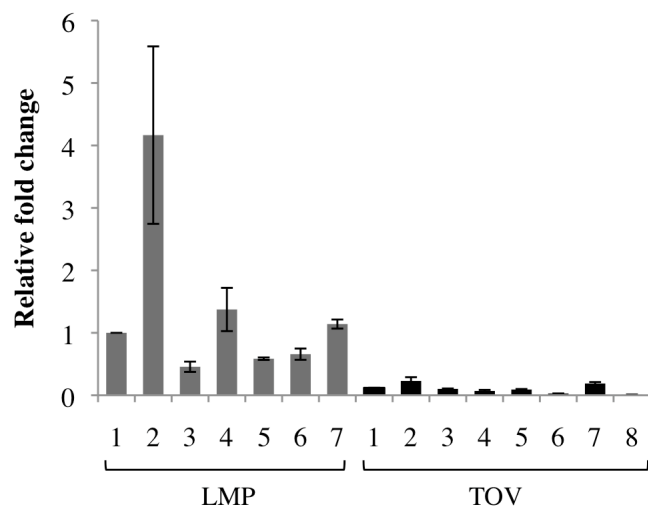
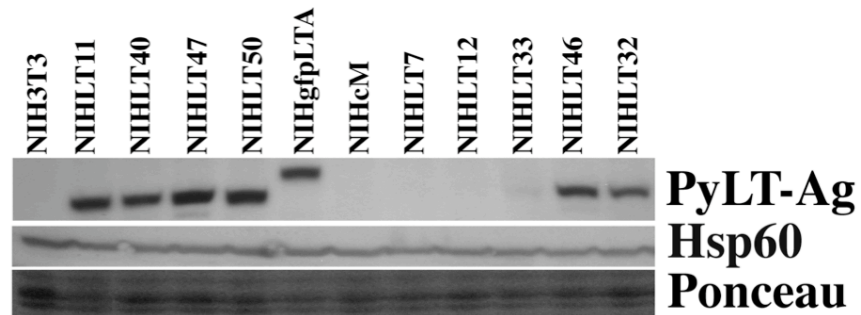


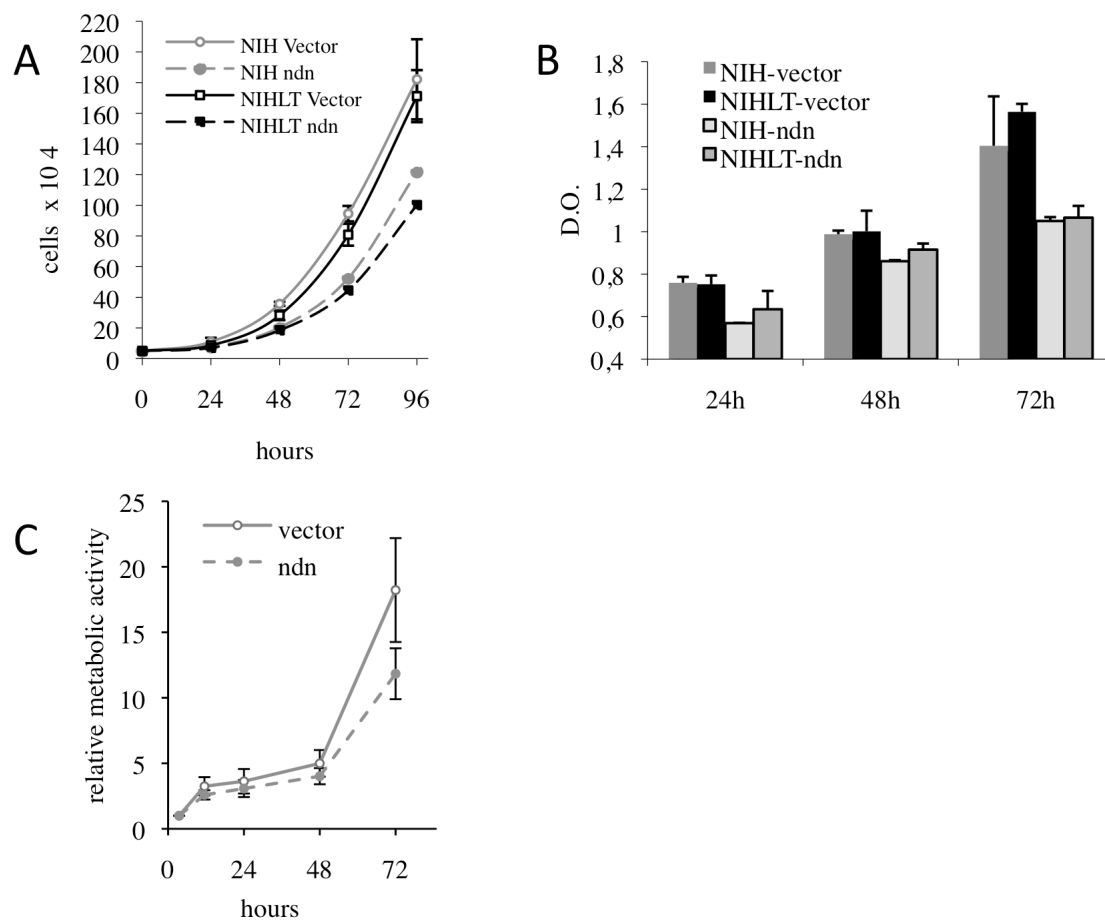
Figure 7 Necdin expression is detected in LMP and is lower in TOV.

Q-PCR analysis of tissues from seven LMP serous ovarian cancers and eight high grade serous ovarian cancers. Expression of Necdin gene relative to ERK-1. ($P < 0.0001$, Mann-Whitney's U test)



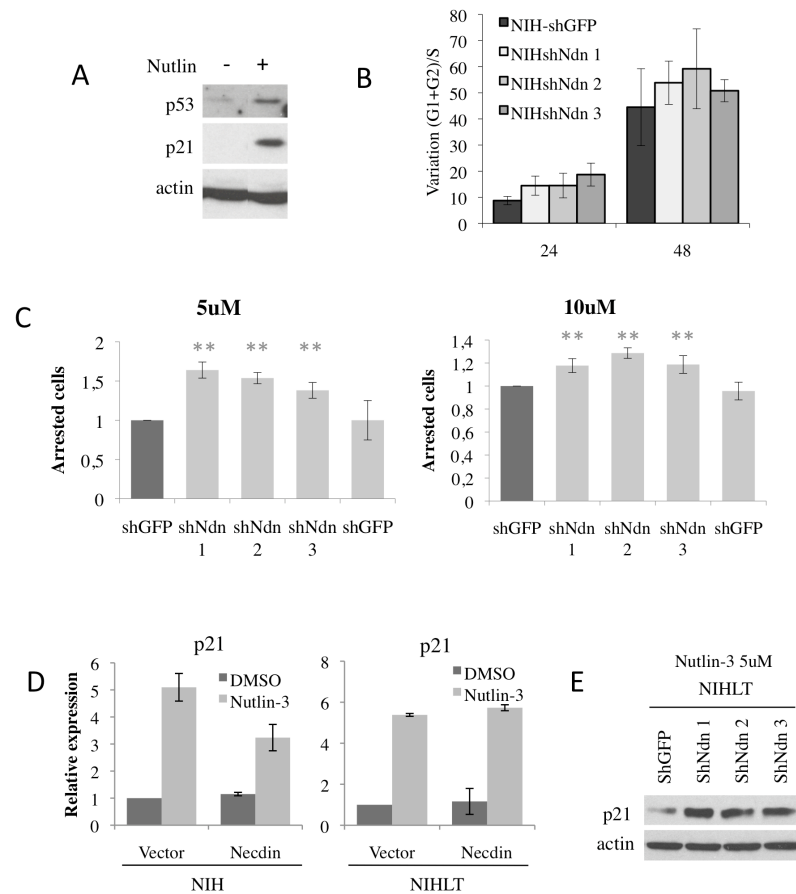
Supplementary data 2 Western blot analysis of PyLT expression in selected clones used for microarrays analysis.

The PyLT row represents the expression levels of PyLT protein in all clones (note that like the mRNA in Figure 1, PyLT protein in clone NIHLT33 is only detected on long exposures).



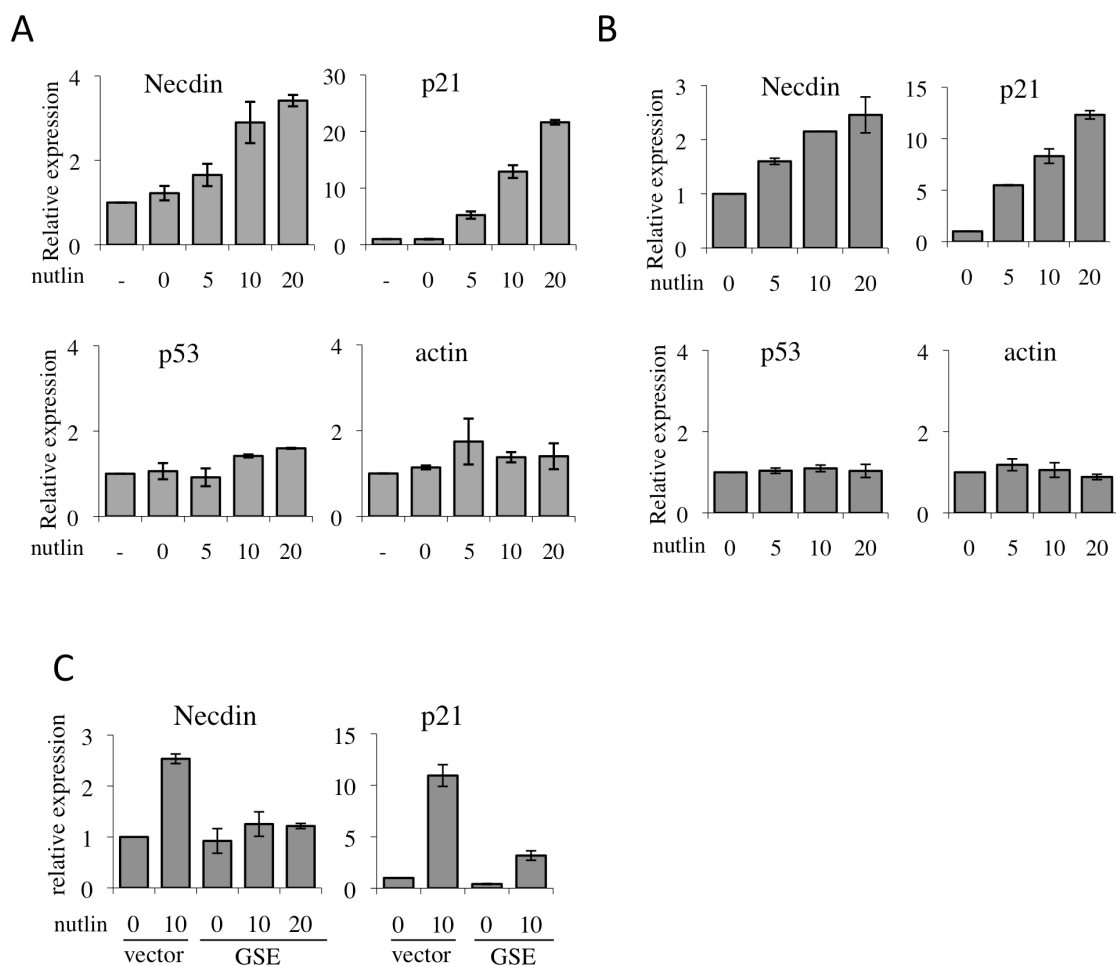
Supplementary data 3 Necdin induces growth arrest in short term experiment.

Overexpression of Necdin showed growth inhibition in three different experiments (A) Proliferation curve of NIH and NIHLT cells two weeks after transduction with Necdin or control vector. (B) Cellular proliferation assessed by colorimetric BrdU ELISA Kit (ROCHE) in the same population. (C) Proliferation monitored by Wst-1 assays on NIH3T3 cells transiently transfected with Necdin or control vector.



Supplementary data 4 More effects of Nutlin-3 stimulation

(A) Nutlin-3 stimulation of NIH cells induced an increase in p53 protein levels accompanied by an increase of its target gene p21 (B) NIH population depleted for Necdin expression treated with nutlin-3 did not present a variation in growth arrest by FACS analysis. (C) Increased sensitivity to growth arrest was measured with Wst-1 colorimetric assay for the same populations after 48hrs of nutlin-3 treatment. Graph represents differences between treated and untreated cells normalized according to NIH control. (** $P < 0.01$, t-test) (D) Q-PCR for p21 expression upon nutlin-3 stimulation (24hrs) or control DMSO, in NIH and NIHLT cells overexpressing Necdin or Vector. (E) Protein levels in NIHLT cells containing shNdn or control 48hrs after nutlin-3 stimulation.



Supplementary data 5 Nutlin-3 stimulation of NIH and NIHLT population induce Necdin mRNA in a p53-dependent manner.

(A-B) Necdin was induced in a dose-dependent manner with nutlin-3 treatment in (A) NIH and (B) NIHLT. (C) Inactivation of p53 by transduction of NIH with GSE22 inhibited Necdin induction by nutlin-3. Relative expression by Q-PCR analysis according to GAPDH.

Bibliography

1. Hahn WC, Weinberg RA (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 331-341.
2. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
3. Ghebranious N, Donehower LA (1998) Mouse models in tumor suppression. *Oncogene* 17: 3385-3400.
4. Carver BS, Pandolfi PP (2006) Mouse modeling in oncologic preclinical and translational research. *Clin Cancer Res* 12: 5305-5311.
5. Hahn WC, Weinberg RA (2002) Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 347: 1593-1603.
6. O'Hare MJ, Bond J, Clarke C, Takeuchi Y, Atherton AJ, et al. (2001) Conditional immortalization of freshly isolated human mammary fibroblasts and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 646-651.
7. Seger YR, Garcia-Cao M, Piccinin S, Cunsolo CL, Doglioni C, et al. (2002) Transformation of normal human cells in the absence of telomerase activation. *Cancer Cell* 2: 401-413.
8. Benjamin TL (2001) Polyoma virus: old findings and new challenges. *Virology* 289: 167-173.
9. Schlegel R, Benjamin TL (1978) Cellular alterations dependent upon the polyoma virus Hr-t function: separation of mitogenic from transforming capacities. *Cell* 14: 587-599.
10. Rassoulzadegan M, Cowie A, Carr A, Glaichenhaus N, Kamen R, et al. (1982) The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 300: 713-718.
11. Larose A, Dyson N, Sullivan M, Harlow E, Bastin M (1991) Polyomavirus large T mutants affected in retinoblastoma protein binding are defective in immortalization. *J Virol* 65: 2308-2313.

12. Pilon AA, Desjardins P, Hassell JA, Mes-Masson AM (1996) Functional implications of mutations within polyomavirus large T antigen Rb-binding domain: effects on pRb and p107 binding in vitro and immortalization activity in vivo. *J Virol* 70: 4457-4465.
13. Wang EH, Friedman PN, Prives C (1989) The murine p53 protein blocks replication of SV40 DNA in vitro by inhibiting the initiation functions of SV40 large T antigen. *Cell* 57: 379-392.
14. Dilworth SM (1990) Cell alterations induced by the large T-antigens of SV40 and polyoma virus. *Semin Cancer Biol* 1: 407-414.
15. Lebel M, Webster M, Muller WJ, Royal A, Gauthier J, et al. (1995) Transgenic mice bearing the polyomavirus large T antigen directed by 2.1 kb of the keratin 19 promoter develop bronchiolar papillary tumors with progression to lung adenocarcinomas. *Cell Growth Differ* 6: 1591-1600.
16. Lebel M, Mes-Masson AM (1994) Establishment and characterization of testicular cell lines from MT-PVLT-10 transgenic mice. *Exp Cell Res* 213: 12-19.
17. Van Dyke T, Jacks T (2002) Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell* 108: 135-144.
18. Rodier F, Bertrand R, Bossolasco M, Mes-Masson AM (2000) Polyomavirus large T-antigen protects mouse cells from Fas-, TNF-alpha- and taxol-induced apoptosis. *Oncogene* 19: 6261-6270.
19. Igney FH, Krammer PH (2002) Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 71: 907-920.
20. Whiteside TL (2010) Immune responses to malignancies. *J Allergy Clin Immunol* 125: S272-283.
21. Doherty J, Freund R (1997) Polyomavirus large T antigen overcomes p53 dependent growth arrest. *Oncogene* 14: 1923-1931.
22. Marti A, Ballmer-Hofer K (1999) Polyomavirus large- and small-T relieve middle-T-induced cell cycle arrest in normal fibroblasts. *J Gen Virol* 80 (Pt 11): 2917-2921.

23. Dey D, Dahl J, Cho S, Benjamin TL (2002) Induction and bypass of p53 during productive infection by polyomavirus. *J Virol* 76: 9526-9532.
24. Maruyama K, Usami M, Aizawa T, Yoshikawa K (1991) A novel brain-specific mRNA encoding nuclear protein (necdin) expressed in neurally differentiated embryonal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 291-296.
25. Aizawa T, Maruyama K, Kondo H, Yoshikawa K (1992) Expression of necdin, an embryonal carcinoma-derived nuclear protein, in developing mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 68: 265-274.
26. Hayashi Y, Matsuyama K, Takagi K, Sugiura H, Yoshikawa K (1995) Arrest of cell growth by necdin, a nuclear protein expressed in postmitotic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 317-324.
27. Jay P, Rougeulle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei MG, et al. (1997) The human necdin gene, *NDN*, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet* 17: 357-361.
28. Taniguchi N, Taniura H, Niinobe M, Takayama C, Tominaga-Yoshino K, et al. (2000) The postmitotic growth suppressor necdin interacts with a calcium-binding protein (NEFA) in neuronal cytoplasm. *J Biol Chem* 275: 31674-31681.
29. Kuwako K, Taniura H, Yoshikawa K (2004) Necdin-related MAGE proteins differentially interact with the E2F1 transcription factor and the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* 279: 1703-1712.
30. Kuwajima T, Taniura H, Nishimura I, Yoshikawa K (2004) Necdin interacts with the Msx2 homeodomain protein via MAGE-D1 to promote myogenic differentiation of C2C12 cells. *J Biol Chem* 279: 40484-40493.
31. Tseng YH, Butte AJ, Kokkotou E, Yechoor VK, Taniguchi CM, et al. (2005) Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin. *Nat Cell Biol* 7: 601-611.

32. Taniura H, Taniguchi N, Hara M, Yoshikawa K (1998) Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J Biol Chem* 273: 720-728.
33. Kobayashi M, Taniura H, Yoshikawa K (2002) Ectopic expression of necdin induces differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 277: 42128-42135.
34. Deponti D, Francois S, Baesso S, Sciorati C, Innocenzi A, et al. (2007) Necdin mediates skeletal muscle regeneration by promoting myoblast survival and differentiation. *J Cell Biol* 179: 305-319.
35. Taniura H, Matsumoto K, Yoshikawa K (1999) Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53. *J Biol Chem* 274: 16242-16248.
36. Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Huang G, et al. (2009) p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* 4: 37-48.
37. Kurita M, Kuwajima T, Nishimura I, Yoshikawa K (2006) Necdin downregulates CDC2 expression to attenuate neuronal apoptosis. *J Neurosci* 26: 12003-12013.
38. Andrieu D, Meziane H, Marly F, Angelats C, Fernandez PA, et al. (2006) Sensory defects in Necdin deficient mice result from a loss of sensory neurons correlated within an increase of developmental programmed cell death. *BMC Dev Biol* 6: 56.
39. Hasegawa K, Yoshikawa K (2008) Necdin regulates p53 acetylation via Sirtuin1 to modulate DNA damage response in cortical neurons. *J Neurosci* 28: 8772-8784.
40. Ge H, Liu Z, Church GM, Vidal M (2001) Correlation between transcriptome and interactome mapping data from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet* 29: 482-486.
41. Pilon AA, Mes-Masson AM (1996) Polyomavirus large T antigen zinc finger is not required for efficient cellular immortalization of primary rat embryo fibroblasts. *Virus Res* 46: 171-175.
42. Gjorup OV, Rose PE, Holman PS, Bockus BJ, Schaffhausen BS (1994) Protein domains connect cell cycle stimulation directly to initiation of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12125-12129.

43. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, et al. (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303: 844-848.
44. Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, Higgins B, Kolinsky K, et al. (2006) Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1888-1893.
45. Ossovskaya VS, Mazo IA, Chernov MV, Chernova OB, Strezoska Z, et al. (1996) Use of genetic suppressor elements to dissect distinct biological effects of separate p53 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10309-10314.
46. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, et al. (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22: 4212-4222.
47. Tishler RB, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD (1993) Increases in sequence specific DNA binding by p53 following treatment with chemotherapeutic and DNA damaging agents. *Cancer Res* 53: 2212-2216.
48. Kmet LM, Cook LS, Magliocco AM (2003) A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer* 97: 389-404.
49. Kobel M, Huntsman D, Gilks CB (2008) Critical molecular abnormalities in high-grade serous carcinoma of the ovary. *Expert Rev Mol Med* 10: e22.
50. Linardopoulos S, Street AJ, Quelle DE, Parry D, Peters G, et al. (1995) Deletion and altered regulation of p16INK4a and p15INK4b in undifferentiated mouse skin tumors. *Cancer Res* 55: 5168-5172.
51. Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, Weinberg RA (2000) Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol* 12: 705-709.
52. Shields JM, Rogers-Graham K, Der CJ (2002) Loss of transgelin in breast and colon tumors and in RIE-1 cells by Ras deregulation of gene expression through Raf-independent pathways. *J Biol Chem* 277: 9790-9799.

53. Chang JW, Jeon HB, Lee JH, Yoo JS, Chun JS, et al. (2001) Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 507-512.
54. el-Deiry WS, Nelkin BD, Celano P, Yen RW, Falco JP, et al. (1991) High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3470-3474.
55. Kautiainen TL, Jones PA (1986) DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J Biol Chem* 261: 1594-1598.
56. McCabe MT, Low JA, Daignault S, Imperiale MJ, Wojno KJ, et al. (2006) Inhibition of DNA methyltransferase activity prevents tumorigenesis in a mouse model of prostate cancer. *Cancer Res* 66: 385-392.
57. Slack A, Cervoni N, Pinar M, Szyf M (1999) DNA methyltransferase is a downstream effector of cellular transformation triggered by simian virus 40 large T antigen. *J Biol Chem* 274: 10105-10112.
58. McCabe MT, Low JA, Imperiale MJ, Day ML (2006) Human polyomavirus BKV transcriptionally activates DNA methyltransferase 1 through the pRb/E2F pathway. *Oncogene* 25: 2727-2735.
59. Hu Y, Ippolito JE, Garabedian EM, Humphrey PA, Gordon JI (2002) Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice. *J Biol Chem* 277: 44462-44474.
60. Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, et al. (2004) Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 64: 5270-5282.
61. Chapman EJ, Kelly G, Knowles MA (2008) Genes involved in differentiation, stem cell renewal, and tumorigenesis are modulated in telomerase-immortalized human urothelial cells. *Mol Cancer Res* 6: 1154-1168.
62. Tan AC, Jimeno A, Lin SH, Wheelhouse J, Chan F, et al. (2009) Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. *Mol Oncol* 3: 425-438.

63. Rose PE, Schaffhausen BS (1995) Zinc-binding and protein-protein interactions mediated by the polyomavirus large T antigen zinc finger. *J Virol* 69: 2842-2849.
64. Loeber G, Parsons R, Tegtmeyer P (1989) The zinc finger region of simian virus 40 large T antigen. *J Virol* 63: 94-100.
65. McIntyre MC, Frattini MG, Grossman SR, Laimins LA (1993) Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J Virol* 67: 3142-3150.
66. Kruger M, Ruschke K, Braun T (2004) NSCL-1 and NSCL-2 synergistically determine the fate of GnRH-1 neurons and control neocdin gene expression. *EMBO J* 23: 4353-4364.
67. Visvader JE, Venter D, Hahm K, Santamaria M, Sum EY, et al. (2001) The LIM domain gene LMO4 inhibits differentiation of mammary epithelial cells in vitro and is overexpressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14452-14457.
68. Sum EY, Segara D, Duscio B, Bath ML, Field AS, et al. (2005) Overexpression of LMO4 induces mammary hyperplasia, promotes cell invasion, and is a predictor of poor outcome in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7659-7664.
69. Yu J, Ohuchida K, Nakata K, Mizumoto K, Cui L, et al. (2008) LIM only 4 is overexpressed in late stage pancreas cancer. *Mol Cancer* 7: 93.
70. Murphy NC, Scarlett CJ, Kench JG, Sum EY, Segara D, et al. (2008) Expression of LMO4 and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 98: 537-541.
71. Flatt PM, Tang LJ, Scatena CD, Szak ST, Pietenpol JA (2000) p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol* 20: 4210-4223.
72. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816.
73. Dyson N, Bernards R, Friend SH, Gooding LR, Hassell JA, et al. (1990) Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J Virol* 64: 1353-1356.

74. Desjardins P, Pilon AA, Hassell JA, Mes-Masson AM (1997) Polyomavirus large T-antigen binds the "pRb related" protein p130 through sequences in conserved region 2. *Virus Res* 47: 85-90.
75. Thompson T, Tovar C, Yang H, Carvajal D, Vu BT, et al. (2004) Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem* 279: 53015-53022.
76. Drakos E, Thomaides A, Medeiros LJ, Li J, Leventaki V, et al. (2007) Inhibition of p53-murine double minute 2 interaction by nutlin-3A stabilizes p53 and induces cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 13: 3380-3387.
77. Kruse JP, Gu W (2009) Modes of p53 regulation. *Cell* 137: 609-622.
78. Kumamoto K, Spillare EA, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T, et al. (2008) Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res* 68: 3193-3203.
79. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, et al. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107: 137-148.
80. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, et al. (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107: 149-159.
81. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237-1245.
82. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7: 1126-1132.
83. Moon HE, Ahn MY, Park JA, Min KJ, Kwon YW, et al. (2005) Negative regulation of hypoxia inducible factor-1alpha by necdin. *FEBS Lett* 579: 3797-3801.
84. Friedman ER, Fan CM (2007) Separate necdin domains bind ARNT2 and HIF1alpha and repress transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 113-118.

85. Crawford NP, Walker RC, Lukes L, Officewala JS, Williams RW, et al. (2008) The Diasporin Pathway: a tumor progression-related transcriptional network that predicts breast cancer survival. *Clin Exp Metastasis* 25: 357-369.
86. Rudlowski C, Pickart AK, Fuhljahn C, Friepoertner T, Schlehe B, et al. (2006) Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer patients: a long-term follow-up. *Int J Gynecol Cancer* 16 Suppl 1: 183-189.
87. Rubin H, Xu K (1989) Evidence for the progressive and adaptive nature of spontaneous transformation in the NIH 3T3 cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 1860-1864.
88. Rubin H (2001) Selected cell and selective microenvironment in neoplastic development. *Cancer Res* 61: 799-807.
89. Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, Smith CL, Rahmberg BL, et al. (2009) A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* 4: e6529.
90. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, et al. (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11: 973-979.
91. Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, et al. (1999) Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2907-2912.
92. Silver J, Schaffhausen B, Benjamin T (1978) Tumor antigens induced by nontransforming mutants of polyoma virus. *Cell* 15: 485-496.
93. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR (1995) p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8493-8497.
94. Taylor WR, DePrimo SE, Agarwal A, Agarwal ML, Schonthal AH, et al. (1999) Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol Biol Cell* 10: 3607-3622.

95. Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M (1995) Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 10: 109-115.
96. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
97. Lefever S, Vandesompele J, Speleman F, Pattyn F (2009) RTPrimerDB: the portal for real-time PCR primers and probes. *Nucleic Acids Res* 37: D942-945.
98. Ouellet V, Provencher DM, Maugard CM, Le Page C, Ren F, et al. (2005) Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling. *Oncogene* 24: 4672-4687.

CHAPITRE IV

Article II

Necdin modulates proliferative cell survival in response to genotoxic stress

Julie Lafontaine¹, Francis Rodier^{1,2} and Anne-Marie Mes-Masson^{1,3}

¹Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and Institut du cancer de Montréal, 1560, rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1,

³Département de Radiologie, Radio-oncologie et médecine nucléaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

³Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

Running title: Necdin characterization during senescence

sera soumis à Oncogene

Contribution des auteurs

J'ai réalisé la totalité des expériences, de même que la rédaction de ce manuscrit. Tous les co-auteurs ont participé à sa correction.

Abstract

The finite replicative lifespan of cells, termed senescence, has been proposed as a protective mechanism against the accumulation of mutations over time, which could contribute to cancer. This is supported by the induction of premature senescence, a process which is activated when an oncogene is expressed in normal primary cells as well as following intense genotoxic stresses. Thus, deregulation of genes that control this process, like the tumor suppressor p53, may contribute to promoting cancer by allowing senescence bypass. A better understanding of the genes that contribute to the establishment of senescence is therefore warranted. Necdin interacts with p53 and is also a p53 target gene, although the importance of Necdin in the p53 response is not clearly understood. In this study, we first investigated Necdin expression during replicative and premature senescence in culture. Necdin expression declined during replicative aging of IMR90 cells as well as during the premature senescence process induced by gamma irradiation and by the overexpression of oncogenic RasV12. Decrease in Necdin expression seemed to be a consequence of the establishment of senescence since the depletion of Necdin in human cells did not induce a senescence-like growth arrest given that they did not present flat morphology and no SA- β -galactosidase was detected. Similarly, overexpression of Necdin did not affect life span. However, we demonstrate that in normal human cells, Necdin expression mimicked the effect of p53 inactivation by increasing radioresistance. This result suggests that Necdin can attenuate p53 signaling in response to genotoxic stress and supports our previous results describing an inhibitory function of Necdin over p53-dependent growth arrest.

Keywords: Necdin, p53, senescence, radioresistance, IMR90

Introduction

The maintenance of genomic integrity relies on the ability of the p53 tumor suppressor to arrest the cell cycle thereby allowing correct repair of potentially oncogenic DNA damage after an insult [1]. This checkpoint is central to prevent the accumulation of mutations in cells, which could result in carcinogenesis. Another level of protection preventing carcinogenesis is senescence, a process that also involves p53 [2,3]. Replicative senescence in human cells results from telomere shortening as a consequence of each cell division [4]. This naturally occurring process could be related to the aging of mammals as the accumulation of senescent cells may contribute to reduce tissue functionality and may affect its morphology [3]. On the other hand, stress-induced senescence also defines a permanent growth arrest that is triggered by irregular signaling in a cell caused by an activated oncogene or an unresolved genotoxic stress [5,6,7,8]. Replicative senescence and stress-induced senescence result from common mechanisms in which the tumor suppressors Rb and p53 play a central role [9]. Senescent cells remain metabolically active, with a flat morphology and are characterized by β -galactosidase activity [10]. Some effectors of p53 such as the inhibitor cyclin-dependent kinase p21, miR34 and PML are well characterized for their involvement in this permanent growth arrest [11,12,13]. However, new targets of p53 are continuously discovered and require extensive characterization to entirely understand their functions in the p53 pathways that regulate cell cycle, apoptosis and senescence. Moreover, p53 regulation is complex and remains incompletely understood [14].

Necdin has been recently identified as a p53 target gene [15,16]. We initially observed that Necdin is increased in polyomavirus large T-antigen expressing NIH3T3 cells, a mouse model used to unravel early events in carcinogenesis [16]. In this model, the increase in Necdin results from a p53-independent mechanism suggesting that other

mechanisms are involved in Necdin transcriptional regulation. Necdin was first described as a growth suppressor with an Rb-like function by interacting with E2F1 to repress its function [17,18,19]. However, we demonstrated that NIH3T3 cells could grow efficiently even with high Necdin expression [16]. The role of Necdin in cancer remains poorly defined. A decrease in expression is observed in melanomas [20], while pancreatic cancer presents increased expression through the loss of imprinting in the Necdin gene [21]. We hypothesized that Necdin expression could be associated with better outcomes, as suggested by our previous results revealing that Necdin expression is limited to borderline ovarian cancer [16] and that Necdin is associated with a better prognosis in breast cancer [22].

Necdin is linked to p53 pathways suggesting that it may impact cancer development. The initial evidence by Taniura and al. [19], demonstrated a possible interaction between Necdin and p53. It was also reported that Necdin has the ability to suppress p53-induced apoptosis [19,23]. We previously showed that Necdin expression allowed cells to overcome the growth arrest induced by p53 activation [16]. In addition, Necdin can affect posttranslational modification of p53 by interacting with Sirt1 [23]. Sirt1 is a deacetylase [24] and the interaction of Sirt1 with Necdin potentiates its capacity to decrease p53 acetylation leading to the reduction of p53 activity [23]. Therefore, Necdin seems to be closely related to p53 since it is a p53 target gene and it can negatively modulate p53-dependent growth arrest and apoptosis. Its relationship to p53 activity needs to be further clarified. These observations prompted us to explore the possible impact of Necdin during senescence, another important role of p53 in preventing cancer. Here we demonstrate that while Necdin expression levels decline in both replicative and premature senescence, modulation of its expression does not affect human primary cell life span. However, high levels of Necdin contribute to an increased radioresistance in primary cells. Taken together, these observations are consistent with an inhibitory effect of Necdin on the

p53 pathway and suggest a role for Necdin, under stress conditions, in preventing senescence induction.

Results

SV40LT antigen does not induce Necdin expression in human fibroblasts

Since Necdin was found to be up-regulated in a mouse model expressing murine polyomavirus large T antigen (PyLT) [16], it was of interest to determine if the simian virus large T antigen (SV40LT) counterpart largely used in human cell culture studies also promoted Necdin induction. SV40LT was transduced in human primary IMR90 fibroblasts using incremental lentivirus concentration. Efficiency of infection was monitored by immunofluorescence for large T. Around 65% of cells were infected with the highest titer used (Figure 1A). At the protein level, no variation in Necdin was observed even with the highest amount of virus (Figure 1B). The presence of SV40LT in cells is well known to induce the accumulation of a non-functional p53 as a result of interaction of SV40LT and p53 [25,26]. Thus, we used this marker as a positive control to demonstrate the efficient expression of a functional SV40LT in cells. The protein level of p53 was clearly elevated in cells expressing SV40LT (Figure 1B).

Necdin level decreases with replicative senescence

To investigate the connection between Necdin and cellular senescence, we first characterized Necdin expression during the normal process of replicative aging of cells in vitro. Human primary fibroblasts (IMR90) were maintained in culture for various periods of time thereby generating populations at three different population doubling (PD). Young (PD30), late passage (PD56) and senescent (PD69) fibroblasts were characterized for

senescence-associated β -galactosidase activity (SA- β -Gal) (Figure 2A and 2B), a biomarker of senescence [10]. Young and presenescent fibroblasts showed low staining (6% and 20% respectively) while the older cell culture had up to 70% SA- β -Gal of positive cells (Figure 2B). When these cells were compared at the protein level, a decrease in Necdin expression that correlated with cellular aging was clearly observed. Necdin was present in young cells, moderately in later passages and barely detectable in senescent cells (Figure 2C). This variation was accompanied by a characteristic upregulation of the cell cycle inhibitor p16INK4A, which was noticeable in late passage cells and sustained in senescent cells. There was no difference in p53 levels between the various populations (Figure 2C). These results revealed that Necdin expression declines when cells reach replicative senescence.

Premature senescence is accompanied by a decrease in Necdin level

To further characterize Necdin expression during senescence, we also followed its expression in situations where senescence was induced in response to a cellular insult. Premature senescence is triggered when an oncogene is overexpressed or present in an activated form in a cell, and represents a fail-safe mechanism to prevent carcinogenesis [5,27]. This senescence is known as oncogene-induced senescence (OIS). We used a human activated mutant form of Ras (Ha-RASv12) [28], which induced OIS soon after its expression in normal human fibroblasts when expressed alone [5]. After transduction of oncogenic RasV12, cells usually grew for a short period of time before entering into a permanent growth arrest [29,30]. Different time points were selected after infection to evaluate protein content during the proliferation stage (day 4) and in senescent cells (day 7). The transduction of RasV12 resulted in high levels of Ras at day 7 compared to control cells where endogenous Ras was not detected (Figure 3A). However, four days after infection, the level of Ras was more moderate (Figure 3A). Transduction of RasV12 did not induce a variation of Necdin during the proliferation stage (day 4), but the Necdin level

diminished when cells reached senescence one week after infection (Figure 3A). As expected, p16INK4A levels gradually increased from day 4 in RasV12 expressing cells compared to control. PCNA was included as a readout of the proliferative capacity of the different populations and showed a marked decrease consistent with growth arrest at day 7 in the RasV12-transduced population.

Another method to induce premature senescence in human normal cells is exposure to stresses causing persistent DNA damages [7]. In order to induce stress-induced premature senescence (SIPS), cells were exposed to gamma irradiation. Cells that were irradiated at 20Gy progressively entered a senescence state, which was marked by an increase in p16INK4A expression over time (Figure 3B). This increase in p16INK4A was accompanied by a decrease in Necdin protein levels (Figure 3B). Finally, we evaluated whether the decrease in Necdin levels observed with senescence was also seen in transient growth arrest. Cells were subjected to serum starvation for either 24 or 48 hours, which induced a cell cycle arrest in G1 as confirmed by DNA content (Figure 3C). Western blot analysis revealed a constant level of Necdin protein during this transient growth arrest (Figure 3D).

Thus, during both oncogene-induced (RasV12) and stress-induced (irradiation) senescence, Necdin levels decreased with the establishment of senescence. The decrease in Necdin expression is specific to permanent growth arrest since serum depletion did not generate the same effect.

Modulation of Necdin does not affect replicative aging

These results raised the possibility that Necdin may have an inhibitory effect on senescence or that the decrease in Necdin may be a consequence of senescence. Thus, it was of interest to determine if sustained Necdin expression could allow cells to extend their

proliferative lifespan. Lentiviruses were used to deliver human Necdin cDNA in IMR90 cells. Because we previously observed a short-term growth inhibition with Necdin expression in the mouse NIH3T3 immortal cell line [16], we used an inducible system to express Necdin in IMR90 expressing the tetracycline repressor (IMRtetR). This inducible system allowed us to assess the impact of Necdin expression upon induction after an extended period of selection due to the low titer of viruses produced from Necdin cDNA. Population doublings were followed until cells naturally reached replicative senescence. Upon induction by doxycycline, a more stable analogue of tetracycline, we did not observe any effect of Necdin overexpression on the growth rate of IMR90 cells (Figure 4A). Moreover, cells expressing Necdin did not present an extended life span compared to vector expressing control as both populations arrested after the same number of population doubling (Figure 4A). Neither proliferation nor life span was affected by the presence of doxycycline (Figure 4A and 4B). Induction of Necdin expression by doxycycline was monitored at different time points. As presented in Figure 4C, ectopic expression of Necdin was maintained even when cells are arrested although with a lower efficiency than seen in early passages.

Inversely, we also analyzed the effect of decreasing Necdin expression in IMR90 cells. Protein level analysis confirmed a significant reduction in Necdin by using two distinct shRNA delivered by lentiviruses (Figure 5A). A vector containing shRNA against GFP served as negative control and the oncogene RasV12 served as positive control for premature senescence (Figure 5A). Elevation of p16 was visible in RasV12 expressing cells at 7 and 14 days after infection as well as a modest increase in one of the two populations where shNdn were expressed (Figure 5A). However, expression of RasV12 did induce premature senescence phenotype as showed by flat morphology and determined by SA- β -galactosidase staining but neither of the shRNA population presented these characteristics (Figure 5B). Quantification of SA- β -gal staining revealed that a significant portion of cells was positive with RasV12 expression (more than 50%) compared to control shGFP (13%) and cells expressing shNDN showed a decrease in SA- β -galactosidase staining (3% and

8%) compared to negative control shGFP (Figure 5C). These results suggested that, under normal conditions, variations in Necdin expression did not affect the cellular proliferation or the life span of normal human cells.

Necdin overexpression provides radio-resistance in human normal cells

Although Necdin did not appear to affect senescence in normal conditions despite its involvement in Rb-E2F1 and p53 pathways, it was of interest to determine if Necdin expression could modify the cellular response to stress-induced senescence. To characterize the effect of Necdin modulation under stress conditions, cells where Necdin was overexpressed or targeted by shRNA were irradiated with a dose of 2Gy to induce DNA damage. Under these conditions, DNA double-strand breaks (DSBs) are induced in all nuclei [31]. A single-cell colony formation assay after irradiation revealed the proliferative survival potential of each population. As a control, a negative dominant peptide suppressor of p53 activity (GSE22) was expressed [32,33] since p53 inactivation in normal cells can result in radioresistance [8]. Colony quantification showed an increase in proliferation efficiency when p53 was inactivated with 25% of proliferative survival compared to only 12% in control cells (Figure 6A). Similarly, expression of Necdin resulted in 20% of proliferating colonies suggesting a similar effect to p53 inactivation (Figure 6A). No significant variation was observed when Necdin expression was depleted by shRNA (shGFP 6%, shNdn 6% and 8%). These data suggest that Necdin overexpression in human cells increase their resistance to irradiation thus supporting the possible inhibitory activity of Necdin over p53 function.

Discussion

We recently demonstrated that mouse Necdin can be induced by a viral oncoprotein and can repress p53 induced cell cycle arrest [16]. As our first model was based on the expression of the murine polyomavirus large T antigen protein (PyLT) in mouse cells, we were interested to verify whether Necdin effects observed in this model could be translated to a relevant human model system. The simian homolog of PyLT, SV40LT, is widely used as a tool to study senescence or carcinogenesis. For this reason, it is important to characterize further potential effects of its expression on cells. A well known property of SV40LT is its ability to extend the life span of primary human fibroblasts by inactivating both Rb and p53 to allow senescence bypass [9,34]. Moreover, gene modulation by viral oncogene expression may also contribute to the maintenance of a proliferative state necessary for the bypass of senescence. In this study, we did not observe an increase in Necdin expression by SV40LT in the human primary cell system. Necdin levels were only evaluated in young SV40LT-expressing fibroblasts although it is possible that cells reaching senescence bypass possess different Necdin levels. However, these results do not preclude a role for Necdin in senescence in normal primary human cells.

Necdin expression decrease as a marker of senescence

Replicative senescence marks the end of the proliferative state in cells when telomeres reach a critical length [4]. This mechanism is relevant in limiting aberrant proliferation and prevents cancer [35]. By comparing IMR90 cells at high or low population doublings, we demonstrate a reduction of the Necdin protein levels over time, while p16 increases which is the mark of an irreversible arrest [36,37]. Lee and al. [38] identified Necdin among the gene expression profiles in skeletal muscle of aging mice, where Necdin levels decrease with age. In contrast, Necdin was upregulated upon caloric

restriction, a process that retards aging in mice [38]. Our result confirmed that the decreased Necdin levels seen in aged mouse skeletal muscle can be reproduced with normal human fibroblasts in culture. The decrease in Necdin expression was also consistently observed in telomere-independent premature senescence induced by irradiation. It was also observed, but to a much lower extent, in premature senescence resulting from the expression of the activated oncogenic Ras (RasV12). Although this observation of Necdin protein level reduction was weak, another group has independently reported that Necdin mRNA was part of the list of downregulated genes following Ras-induced senescence [30], supporting our general finding that Necdin is downregulated during cellular senescence.

In contrast to senescence, cellular quiescence is a reversible cell cycle arrest since cells may re-enter the cell cycle when the restriction is removed [32,36]. Interestingly, in a transient G1 arrest, Necdin remained expressed, suggesting that the decrease in Necdin is limited to permanent growth arrest and may be a marker of senescent cells. Necdin levels in other primary cells needs to be analyzed since the molecular signature at senescence largely depends on cell types [39].

Many genes involved in cell cycle progression show altered expression in senescent cells as both proliferation-promoting proteins and their negative regulators decrease when human fibroblasts reach senescence, as exemplified by Rb and E2F1 [30,40]. Necdin interacts with E2F1, E2F4 and also affects expression of the Rb family of genes [41]. Necdin seems to follow the same pattern of repression. One interpretation of these findings is that Necdin may affect cellular senescence. To test this hypothesis, ectopic expression of Necdin was used. We found that overexpression of Necdin did not extend the replicative life span of primary human fibroblasts. Moreover, the sustained expression of Necdin over time in this experiment suggested that the complete elimination of Necdin expression is not essential for senescence to occur.

There are various examples in the literature where proteins, possessing properties similar to Necdin, can induce premature senescence when depleted in IMR90 cells. The knock down of BS69 and p400, also known to interact with viral proteins, induced a premature senescence characterized by p21 and p53 upregulation [42,43]. BS69 and p400, like Necdin, can form a complex with p53 at the p21 promoter to repress transcription [19,43], although it is not known if Necdin is part of the same complex. Moreover Sirt1, a partner of Necdin [23], can increase the risk of cancer due to its capacity to downregulate p53 activity by deacetylating this tumor suppressor [24,44,45]. Sirt1 depletion also induces a senescence-like phenotype in IMR90 cells [46]. From these data, we expected that knock down of endogenous Necdin by shRNA might also induce premature senescence resulting from p53 activation and p21 de-repression. However, shNDN-directed loss of Necdin expression did not induce premature senescence in IMR90 cells. Under non-stress conditions, a complementary protein may contribute to maintaining Necdin function in its absence. As an example, other members of the MAGE family like NDNL2, also known as MAGE-G1, [47], are expressed in a wide variety of tissues including fibroblasts [48] and shares many functions with Necdin.

Necdin is a maternally imprinted gene and its promoter contains many CpG sites for methylation regulation [49]. Consistent with this, the inhibition of DNA methyltransferase (DNMT) by 5-aza-2'-deoxycytidine (5AZA-dC) has been shown to induce Necdin expression in some cancerous cell lines [50]. During senescence establishment, epigenetic changes occur inducing important chromatin structure modifications; some at specific sites while other reflect a more global change. Global DNA methylation status decreases with aging by comparison to young counterparts and immortalized cells [51,52]. A specialized redistribution in chromatin heterochromatin, called senescence-associated heterochromatic foci (SAHF), is also associated with aging [29]. The mechanism is only partially understood; the genomic loci affected by this structure often contain proliferation-promoting genes such as E2F1 target genes [29]. Moreover, SAHF are not observed in

quiescent cells. It is possible that the decrease in Necdin levels during aging could be the result of hypermethylation of specific sites.

Necdin expression confers resistance to ionizing irradiation.

Necdin expression can exert an effect on normal cells as an increase in Necdin level confers resistance to ionizing radiation. At the employed dose, DNA double-strand breaks were induced in all cells and the physiological response is the induction of a p53 response. Thus, these damages caused cell cycle arrest and need to be repaired before cells can resume proliferation. When damages cannot be properly repaired, apoptosis or senescence are the two possible cellular outcomes. Consequently, we observed that cells unable to form colonies showed enlarged and flat morphology of senescent cells in all populations tested (data not shown). This is expected for normal fibroblasts that are relatively resistant to apoptosis upon irradiation [53]. Apoptosis was probably also induced to a low level but could not be monitored due to the low cell densities used in these experiments.

An appropriate response to genotoxic stress is based on the capacity to: a) sense the damage, b) activate the cell cycle checkpoint and c) repair the damage [54]. Two principal conditions may explain an increase in resistance to irradiation in a normal cell. First, an enhanced ability to repair the DNA damage could promote survival. Second, a failure in the activation in cell cycle checkpoint will contribute to the maintenance of cells in a proliferative state despite the presence of a genotoxic stress. This could result from inefficient sensing upstream of the p53 pathways or by a reduction in p53 downstream signaling. This is what was reproduced with the positive control expressing a peptide inhibitor of p53 (GSE22) resulting in a marked increase in colony formation consistent with the notion that a decrease in p53 function increases resistance to irradiation. We and others have shown previously that Necdin can interfere with p53-response [16,19,23]. These data suggest that increased radioresistance associated with Necdin may be related to its ability to

directly influence the p53-response. Necdin may also confer radioresistance by inhibiting radiation-induced apoptosis since Necdin can negatively modulate caspases activation upon genotoxic stress [55,56]. Further evidence supporting Necdin's ability to contribute to radioresistance is a microarray analysis of the gene expression profiles produced by radiosensitive and radioresistant esophageal carcinoma cell lines. In this study, Necdin expression was higher in radioresistant cells [57] which is consistent with the observation of the present study.

Conclusion

The results of the present study show that Necdin function is revealed only under stress conditions. In non-stress conditions, Necdin has no effect on normal cellular life span.

Acknowledgements

We thank Drs. Luke Masson and Philippe Gannon for helpful discussion and comments on the manuscript. We are also grateful to Dr. Eric Campeau who generously provides us all vectors for cloning and lentivirus production. We thank Drs. C. Wiley and J. Campisi for the RasV12 vector. J.L. was supported by Canderel fund of the Institut du cancer de Montréal.

Materials and methods

Cell culture

Low passage IMR90 normal human fibroblasts [58] were a generous gift from Dr. Christian Beausejour (Centre de recherche du CHU Ste-Justine, Montreal). Primary cells

were kept at 37°C under 5% CO₂ and low O₂ condition (5%) and were maintained in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% FBS. The number of living cells was determined using the CASY® cell counter model TT. Proliferation of IMR90 cells was assessed by population doubling according to the following formula: $\text{last PD} + (\text{Log}(\text{final cell number}) - \text{Log}(\text{initial cell plated})) \times 3.32$.

Vectors and infection

All constructs for lentivirus production were derived from a previously described expression system [59]. The human NDN gene was excised from pOBT7 containing full length human NDN (Open Biosystems, MHS1011-61084) and inserted in the 686-1 vector (pENTR4 no ccdB, Addgene number 17424). Recombination of this construct was performed with the destination expression vectors 685-3 or 670-1 (pLenti CMV/TO Neo DEST and pLenti CMV/TO Puro DEST: Addgene number 17292 and 17293) using the Gateway LR Clonase® enzyme mix (Invitrogen). Control vector was generated by recombination of the empty pENTR4 no ccdB with the same destination vectors. SV40LT and GSE22 (encoding an interfering p53 fragment) have been previously described [60]. H-RasV12 in 685-3 vector was a gift from Christopher Wiley (from J. Campisi's lab). pLKO.1 lentiviral shRNA vectors targeting human NDN gene were purchased from Open biosystems: shNdn1 (TRCN0000020085), shNdn2 (TRCN0000020086). shGFP (RHS4459) in the same backbone was used as a control.

Lentiviruses were produced by co-transfection of the different pLenti constructs together with ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen) in the 293FT packaging cell line. 72 hrs later, supernatants were collected and viruses were concentrated by ultracentrifugation. Infections were performed on $5-7.5 \times 10^5$ cells overnight in the presence of polybrene. Appropriate selection was applied 48 hrs later except for the SV40LT-containing vector, which did not include a selection gene. IMR90 cells expressing

the tetracycline repressor (TetR) were generated by infection with lentiviruses containing the 716-1 vector (pLenti-CMVtetR Blast, Addgene #17492).

Senescence

Senescent IMR90 cells were generated by irradiating cells at 20 Gy in a Gammacell irradiator. Cell extracts were harvested at indicated times for western blot analysis. For oncogene-induced senescence, IMR90 cells were infected with oncogenic RasV12 containing lentivirus. Senescence was assessed by senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining [10] using a Senescence Detection Kit (BioVision) in 6-well or 12-well culture plates according to manufacturer's instruction. Cells were plated 24 hrs before staining.

Growth arrest and FACS

For serum starvation, cells were washed 24 hrs after plating and medium was replaced by DMEM containing 0.1% FBS. After 24 hrs of exposure to low or normal serum conditions, cells were collected, fixed with ethanol and stained with propidium iodide. DNA content analysis was performed using a Coulter EPICS XL-MLC Flow Cytometer.

Western blotting

Cells were lysed with a buffer containing 50 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TRITON™ X-100 and protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor cocktail Tablets, Roche). Western blot analyses were done on nitrocellulose membranes hybridized with various antibodies: from Santa Cruz p53 (DO-1, sc-126), H-Ras (F-235, sc-29), p16 (JC-8, sc-56330), PCNA (FL-261, sc-7907), SV40 Large T (Pab101, sc-147), from

Millipore (Upstate) Necdin (07-565) and from Abcam β -actin (AC-15, ab6276). Secondary HRP-conjugated antibodies were all purchased from Santa Cruz.

Immunofluorescence

Cells were fixed with formalin, permeabilized with 0.1% triton in PBS and blocked with 4% donkey serum in 1% IgG free BSA. Primary antibody was diluted in PBS containing 1% BSA. Texas Red and FITC conjugated donkey secondary antibodies (Jackson Immunoresearch) were used.

Colony formation assay

For stress-induced senescence analysis, we first transduced IMR90 cells containing the tetracycline repressor (IMRtetR) with the vector of interest (empty vector and hNdn) and IMR90 cells with GSE22 or shRNA (shNdn1, shNdn2 and shGFP). After an appropriate period of selection, cells were exposed to irradiation. For each population, 100 untreated cells were seeded to determine plating efficiency. 1.6×10^3 cells and 2×10^5 cells irradiated with a dose of 2 Gy and 8 Gy respectively were plated in 100 mm or 150 mm dishes. All conditions were performed in triplicate. Medium was replaced every third day and cells were stained after 12 days with a crystal violet solution. Percentage of colonies was determined by the following formula: number of colonies in irradiated cells / (number of colony in untreated cells x dilution factor). Since Necdin expression was inducible, we chose to maintain all populations in this experiment in medium containing doxycycline to avoid variation.

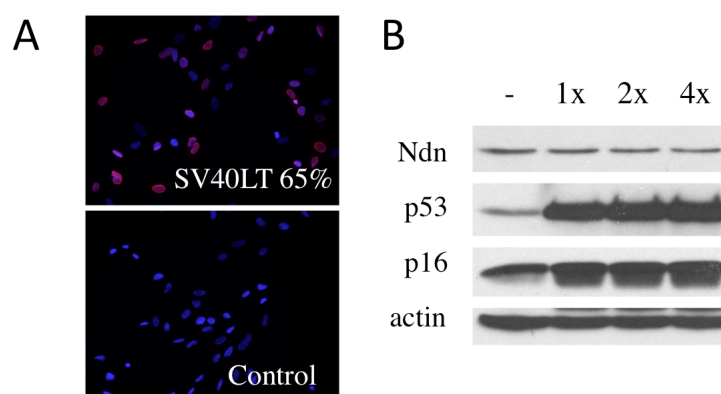


Figure 1 Expression of SV40LT did not induce variation in Necdin levels

(A) Immunofluorescence on IMR90 infected with lentiviruses that drive SV40LT expression (at a concentration of 4x). (B) Necdin and p53 protein expression in IMR90 expressing simian SV40LT infected with increasing titers of lentiviruses.

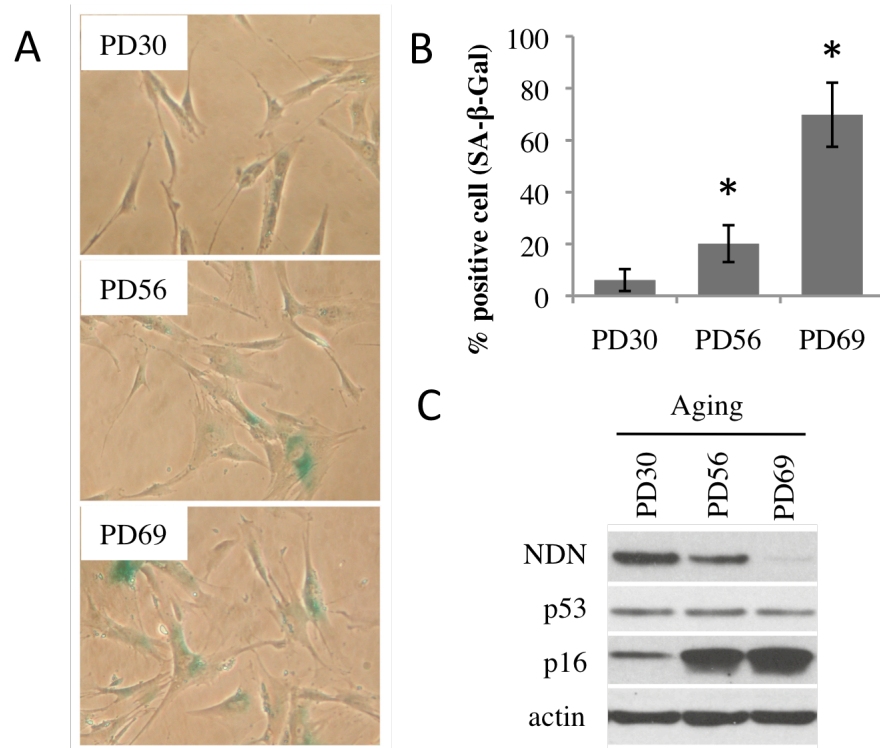


Figure 2 Necdin levels decrease in aging primary cells.

(A) Representative picture of senescence associated β -Galactosidase staining of IMR90 at early passage (PD30), late passage (PD56) and senescent (PD69) IMR90 cells. (B) Quantification of senescent cells represented by average of SA- β -Gal positive cells. Error bars represent standard deviation of counts performed in six different fields. (C) Western blot analysis of protein content from IMR90 cells at corresponding population doubling. All extracts were collected the same day from the three different populations ($P < 0.01$, t-test).

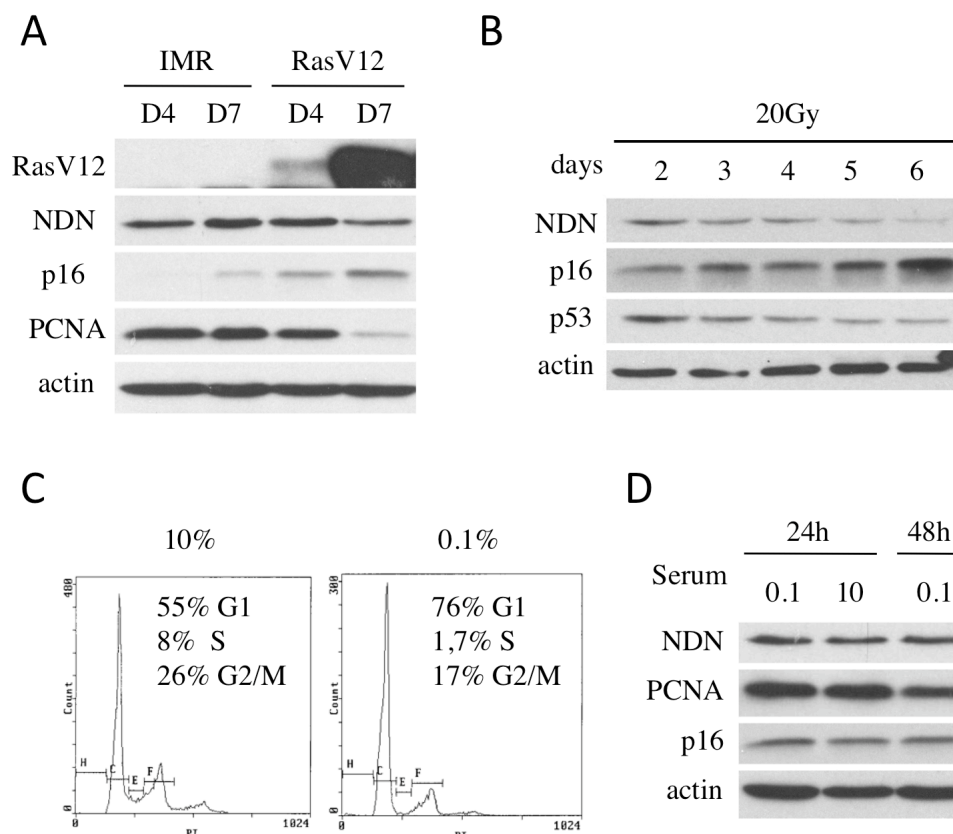


Figure 3 Premature senescence is characterized by Necdin downregulation.

(A) Oncogene-induced senescence caused by RasV12 transduction of IMR90. Protein extracts were collected at the proliferation stage (day 4) and senescence (7 days after infection) (B) Stress-induced senescence was generated by irradiation of IMR90 with 20 Gy. Western blot analysis revealed protein modulation over time. (C) Flow cytometry analysis of IRM90 after 24 hrs of serum starvation (0.1% FBS) or in normal culture conditions (10% FBS). (D) Protein content of cells in normal or low serum conditions.

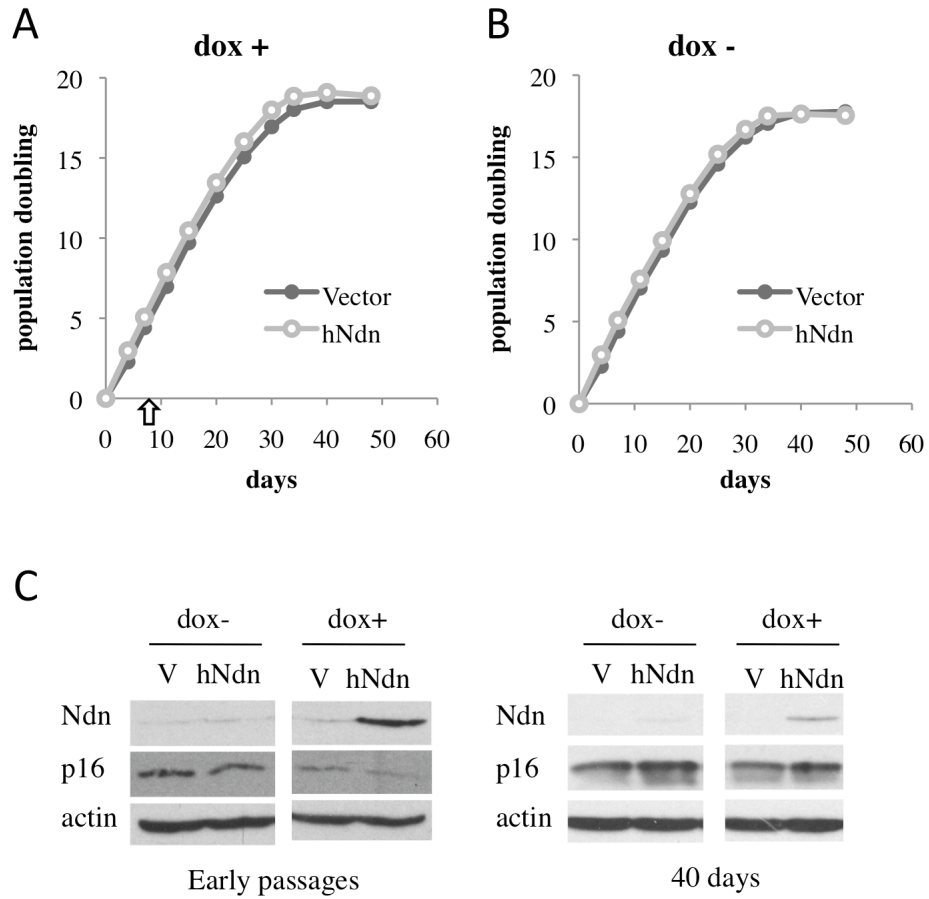


Figure 4 Necdin modulation does not affect life span.

Cumulative population doubling of an IMR90tetR population expressing inducible Necdin or empty vector (A) with or (B) without doxycycline induction (arrow in A indicates the time where induction begins). (C) Protein extracts at two different time points. Representative results of three independent experiments.

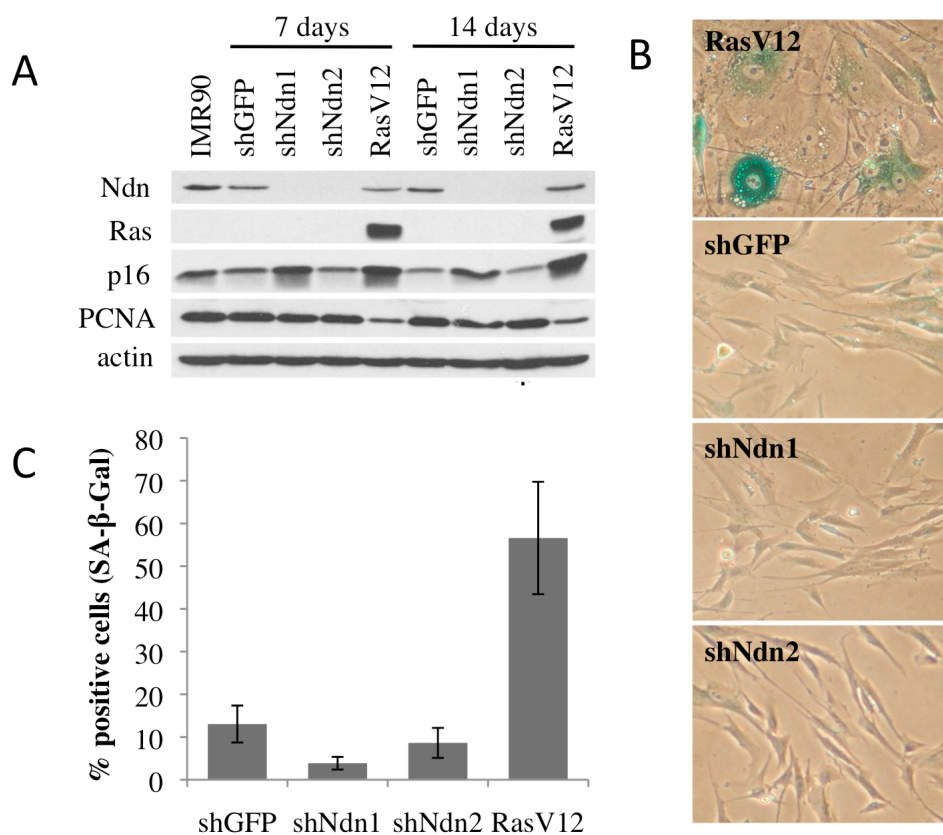


Figure 5 Depletion of Necdin expression does not induce premature senescence.

(A) Protein expression level in IMR90 cells depleted in Necdin expression by shRNA. Overexpression of RasV12 served as a positive control in this experiment. (B) Senescence associated β -Galactosidase staining 14 days after lentiviral infection. (C) Quantification of senescent cells represented by average of SA- β -Gal positive cells. Mean of six different fields \pm standard deviation.

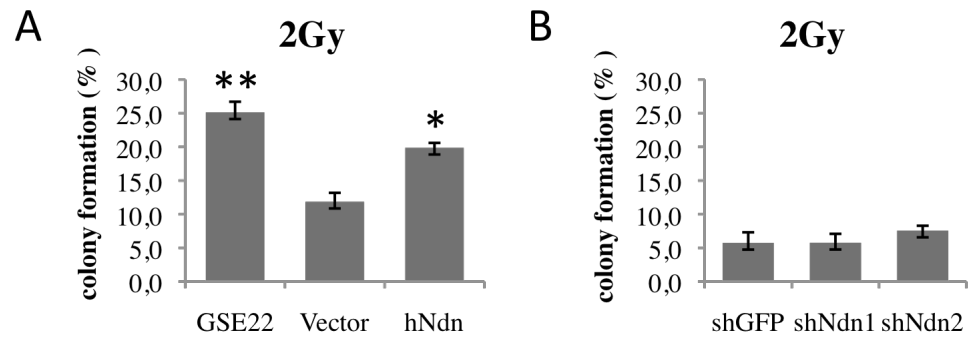


Figure 6 Necdin overexpression confers radioresistance.

Colony formation assay in human fibroblasts exposed to 2Gy of ionizing irradiation. Percentage of recovery was evaluated 12 days after irradiation in (A) IMR90tetR overexpressing human Necdin, empty vector and GSE22 or (B) IMR90 where Necdin expression was targeted by two different shRNAs compared to control shGFP. Mean \pm standard deviation. (* $P = 0.02$, ** $P < 0.01$, t-test)

Bibliography

1. Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16.
2. Reddel RR (2000) The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21: 477-484.
3. Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120: 513-522.
4. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, et al. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352.
5. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593-602.
6. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN (1995) Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4337-4341.
7. Robles SJ, Adami GR (1998) Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16: 1113-1123.
8. Suzuki K, Mori I, Nakayama Y, Miyakoda M, Kodama S, et al. (2001) Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat Res* 155: 248-253.
9. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE (1991) A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 196: 33-39.
10. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363-9367.
11. Brown JP, Wei W, Sedivy JM (1997) Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277: 831-834.

12. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, et al. (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447: 1130-1134.
13. de Stanchina E, Querido E, Narita M, Davuluri RV, Pandolfi PP, et al. (2004) PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* 13: 523-535.
14. Lu X (2010) Tied up in loops: positive and negative autoregulation of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000984.
15. Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Huang G, et al. (2009) p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* 4: 37-48.
16. Lafontaine J, Rodier F, Ouellet V, Mes-Masson AM (2010) Large T-antigen expression analysis identifies Necdin, a p53-target gene, as an inhibitor of p53-mediated growth arrest. *PLoS One* In preparation.
17. Hayashi Y, Matsuyama K, Takagi K, Sugiura H, Yoshikawa K (1995) Arrest of cell growth by necdin, a nuclear protein expressed in postmitotic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 317-324.
18. Taniura H, Taniguchi N, Hara M, Yoshikawa K (1998) Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J Biol Chem* 273: 720-728.
19. Taniura H, Matsumoto K, Yoshikawa K (1999) Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53. *J Biol Chem* 274: 16242-16248.
20. Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, et al. (2004) Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 64: 5270-5282.
21. Tan AC, Jimeno A, Lin SH, Wheelhouse J, Chan F, et al. (2009) Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. *Mol Oncol* 3: 425-438.
22. Crawford NP, Walker RC, Lukes L, Officewala JS, Williams RW, et al. (2008) The Diasporin Pathway: a tumor progression-related transcriptional network that predicts breast cancer survival. *Clin Exp Metastasis* 25: 357-369.

23. Hasegawa K, Yoshikawa K (2008) Necdin regulates p53 acetylation via Sirtuin1 to modulate DNA damage response in cortical neurons. *J Neurosci* 28: 8772-8784.
24. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, et al. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107: 137-148.
25. Linzer DI, Levine AJ (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52.
26. Lane DP, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263.
27. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM (1998) Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 12: 2997-3007.
28. Shih C, Weinberg RA (1982) Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 29: 161-169.
29. Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, et al. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113: 703-716.
30. Mason DX, Jackson TJ, Lin AW (2004) Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene* 23: 9238-9246.
31. Pandita TK, Richardson C (2009) Chromatin remodeling finds its place in the DNA double-strand break response. *Nucleic Acids Res* 37: 1363-1377.
32. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, et al. (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22: 4212-4222.
33. Ossovskaya VS, Mazo IA, Chernov MV, Chernova OB, Strezoska Z, et al. (1996) Use of genetic suppressor elements to dissect distinct biological effects of separate p53 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10309-10314.

34. Shay JW, Van Der Haegen BA, Ying Y, Wright WE (1993) The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res* 209: 45-52.
35. Collado M, Blasco MA, Serrano M (2007) Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130: 223-233.
36. Dai CY, Enders GH (2000) p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene* 19: 1613-1622.
37. Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V (1999) Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19: 2109-2117.
38. Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA (1999) Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285: 1390-1393.
39. Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD (1999) Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* 9: 939-945.
40. Helmbold H, Komm N, Deppert W, Bohn W (2009) Rb2/p130 is the dominating pocket protein in the p53-p21 DNA damage response pathway leading to senescence. *Oncogene* 28: 3456-3467.
41. Kobayashi M, Taniura H, Yoshikawa K (2002) Ectopic expression of neccdin induces differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 277: 42128-42135.
42. Chan HM, Narita M, Lowe SW, Livingston DM (2005) The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 --> p21 senescence pathway. *Genes Dev* 19: 196-201.
43. Zhang W, Chan HM, Gao Y, Poon R, Wu Z (2007) BS69 is involved in cellular senescence through the p53-p21Cip1 pathway. *EMBO Rep* 8: 952-958.
44. Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, et al. (2005) Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123: 437-448.

45. Kim JE, Chen J, Lou Z (2008) DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* 451: 583-586.
46. Ota H, Tokunaga E, Chang K, Hikasa M, Iijima K, et al. (2006) Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene* 25: 176-185.
47. Kuwako K, Taniura H, Yoshikawa K (2004) Necdin-related MAGE proteins differentially interact with the E2F1 transcription factor and the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* 279: 1703-1712.
48. Chibuk TK, Bischof JM, Wevrick R (2001) A necdin/MAGE-like gene in the chromosome 15 autism susceptibility region: expression, imprinting, and mapping of the human and mouse orthologues. *BMC Genet* 2: 22.
49. Jay P, Rougeulle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei MG, et al. (1997) The human necdin gene, NDN, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet* 17: 357-361.
50. Kulaeva OI, Draghici S, Tang L, Kraniak JM, Land SJ, et al. (2003) Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization. *Oncogene* 22: 4118-4127.
51. Wilson VL, Jones PA (1983) DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* 220: 1055-1057.
52. Singhal RP, Mays-Hoopers LL, Eichhorn GL (1987) DNA methylation in aging of mice. *Mech Ageing Dev* 41: 199-210.
53. Goldstein JC, Rodier F, Garbe JC, Stampfer MR, Campisi J (2005) Caspase-independent cytochrome c release is a sensitive measure of low-level apoptosis in cell culture models. *Aging Cell* 4: 217-222.
54. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D (2007) Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res* 35: 7475-7484.

55. Deponti D, Francois S, Baesso S, Sciorati C, Innocenzi A, et al. (2007) Necdin mediates skeletal muscle regeneration by promoting myoblast survival and differentiation. *J Cell Biol* 179: 305-319.
56. Sciorati C, Touvier T, Buono R, Pessina P, Francois S, et al. (2009) Necdin is expressed in cachectic skeletal muscle to protect fibers from tumor-induced wasting. *J Cell Sci* 122: 1119-1125.
57. Ogawa R, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, et al. (2008) Identification of candidate genes involved in the radiosensitivity of esophageal cancer cells by microarray analysis. *Dis Esophagus* 21: 288-297.
58. Nichols WW, Murphy DG, Cristofalo VJ, Toji LH, Greene AE, et al. (1977) Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* 196: 60-63.
59. Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, Smith CL, Rahmberg BL, et al. (2009) A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* 4: e6529.
60. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, et al. (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11: 973-979.

CHAPITRE V

5 Discussion

L'utilisation de l'antigène grand T du Polyomavirus murin comme outil pour mettre en lumière des événements précoces de la carcinogénèse a fait ces preuves précédemment dans le laboratoire tant dans des modèles de souris transgéniques que dans des lignées cellulaires. Dans un premier temps, la création de souris transgéniques a permis de confirmer la capacité de PyLT à provoquer le développement de tumeur [231,232]. L'étude de lignées cellulaires dérivées des souris transgéniques exprimant PyLT a permis la découverte d'un nouvel ADN complémentaire surexprimé dans les tumeurs testiculaires de ces souris qui a été nommé TDE (pour *Tumor differentially express*) [293]. Plus tard, l'homologue humain de TDE (HTDE) a été identifié par notre laboratoire et son potentiel transformant a été décrit [294,295]. En plus de l'augmentation de TDE, l'étude des lignées dérivées des souris transgéniques a révélé la diminution du récepteur de mort cellulaire FasR dans le processus de transformation par PyLT [234]. Ce résultat a orienté les travaux suivant vers l'étude des mécanismes de contournement de l'apoptose relié à l'antigène grand T [235]. Les travaux regroupés dans cette thèse constituent la continuité de la recherche d'événements reliés à l'initiation de la carcinogénèse par l'étude de l'antigène grand T du virus du polyome murin. L'approche employée, soit l'utilisation de l'analyse du profil d'expression génétique de cellules exprimant PyLT, nous a permis d'identifier un groupe de gènes d'intérêts pouvant potentiellement contribuer à la carcinogénèse. Nous avons choisi d'étudier plus en détail Necdin dont l'expression est augmentée par la présence de PyLT (Chapitre III). L'intérêt pour Necdin découle des différentes fonctions recensées dans la littérature qui suggèrent que Necdin possède des fonctions tant supprimeurs de tumeur que oncogéniques. De plus, encore peu d'intérêt est porté sur Necdin concernant son rôle potentiel dans le cancer.

5.1 Quelle est l'importance de Nectin pour le Polyomavirus?

Au cours de nos travaux, PyLT a été notre outil pour nous aider à comprendre les différentes étapes de la carcinogénèse, mais il ne faut pas perdre de vue la nature de cette protéine qui appartient au Virus du polyome murin. Il est donc important de se pencher sur le rôle potentiel que pourrait avoir Nectin tout au long de l'infection virale. Puisque nous ne travaillons pas avec le virus entier, nous n'avons pas été en mesure de démontrer si l'augmentation de l'expression de Nectin visible par la simple expression de PyLT est aussi notable en présence de toutes les composantes du virus. Il a été montré que cette augmentation peut être associée à d'autres protéines virales homologues soit SV40LT dans un modèle de souris transgénique [289], de même que par la présence de E6 et E7 dans des fibroblastes humains immortalisés [84]. Toutefois, l'expression de SV40LT dans de jeunes fibroblastes humains primaires ne semble pas entraîner de variation du niveau de Nectin (Chapitre IV). Il est possible que l'augmentation de Nectin soit spécifique aux cellules de souris et aux cellules humaines immortalisées, cependant nous n'avons pas abordé cette question. Néanmoins, la modulation de Nectin pourrait faire partie, à tout le moins dans le cas du Polyomavirus murin, d'un mécanisme mis en place pour contrecarrer des fonctions cellulaires nuisibles au cycle viral.

Lors du processus normal d'infection, PyLT est exprimé immédiatement après l'entrée du virus dans la cellule. Selon le profil que nous avons obtenu dans différents clones de NIH 3T3 exprimant PyLT, une augmentation de Nectin devrait accompagner l'augmentation croissante de PyLT dans le temps de façon proportionnelle (Chapitre III). Bien que nous n'ayons pas suivi la cinétique d'apparition de Nectin dans le temps, nous avons observé une augmentation visible en 48 heures. Nos résultats montrent aussi que la surexpression de Nectin entraîne un arrêt de la prolifération dans des essais à court terme avec la lignée cellulaire de souris NIH 3T3 qui expriment ou non PyLT. À première vue, ce résultat est incompatible avec la réplication virale puisque le cycle du virus se complète

dans un laps de temps relativement court, soit de 48 à 72 heures, et nécessite que la cellule hôte se divise [166]. Toutefois, lorsque Necdin est surexprimé dans des cellules primaires humaines, aucun arrêt de la prolifération n'est observé. Pour le moment, l'effet de la modulation de Necdin sur les cellules primaires de souris demeure inconnu, et il est probable qu'aucun arrêt ne se produise dans ces cellules tout comme dans les cellules humaines. Il est aussi concevable que l'expression de Necdin atteigne un niveau suffisant pour provoquer l'arrêt de la prolifération seulement au moment où la réplication du génome virale est complétée ce qui alors n'affecterait pas la production de particule virale.

Plusieurs facteurs nucléaires interagissent avec l'ADN du Polyomavirus pour contrôler l'expression des gènes précoces et tardifs de même que pour en permettre la réplication [296]. En particulier, le facteur de transcription Sp1 sert au contrôle de la transcription des gènes précoces chez les Polyomavirus [297,298,299]. Necdin possède la capacité de réprimer la transcription de certains gènes de façon dépendante de la présence de Sp1 [261]. Ainsi, la présence de Sp1 lié à l'ADN viral pourrait permettre à Necdin de jouer un rôle inhibiteur sur la transcription des gènes précoces du virus. Ceci est en accord avec l'augmentation graduelle de la quantité de Necdin à mesure que PyLT augmente jusqu'au niveau critique où PyLT opère la transition du transcrit précoce au tardif, ce qui pourrait donc se faire avec l'aide de Necdin.

Nous avons déterminé que le domaine en doigt de zinc situé dans la partie carboxy-terminale de PyLT est responsable de la modulation de l'expression de Necdin. L'implication de ce domaine nous révèle que Necdin n'est pas nécessaire à la capacité d'immortalisation de PyLT puisque la délétion de cette région n'affecte pas cette fonction [300,301]. D'autres études sur différents mutants de PyLT ont démontré que ce domaine était absolument nécessaire à la réplication de l'ADN virale et ainsi à la production de particules virales [208]. Toutefois, les connaissances sur le domaine en doigt de zinc demeurent limitées et ne nous permettent pas d'identifier le mécanisme menant à la régulation de Necdin. L'indépendance de la liaison à Rb pour la modulation de Necdin

rappelle toutefois l'importance de d'autres domaines de PyLT qui sont souvent négligés et qui peuvent également moduler efficacement des composantes cellulaires.

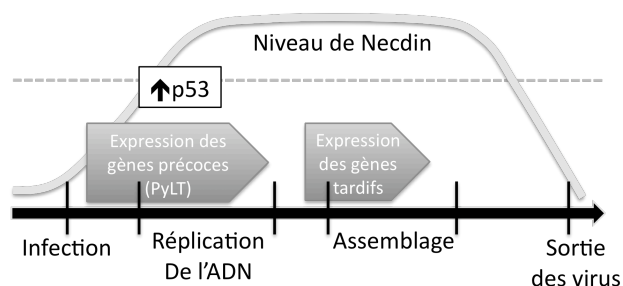
De plus, il a été démontré que lors de l'infection lytique par le virus du polyome, le niveau de p53 s'élève et ses gènes cibles p21 et Bax sont augmentés [302]. La cause de cette augmentation de p53 dans la cellule pourrait être la structure de la boucle d'initiation de la réplication de l'ADN du virus qui mime en quelques sortes un dommage à l'ADN [302]. Ceci est démontré par la phosphorylation de la sérine 18 de p53 (correspondant à la serine 15 chez l'humain) qui est un site lié à la réponse à ce type de dommage [302]. Nous avons montré que Necdin est un gène cible de p53 et qu'il pouvait aussi être augmenté lorsque des dommages à l'ADN sont produits dans notre modèle cellulaire par des agents tels que l'actinomycine D et la camptothécine (Chapitre III). Cette réponse physiologique pourrait donc aussi être engendrée par la présence du virus dans la cellule. Toutefois, puisque à la fois p53 et PyLT peuvent induire l'expression de Necdin suite à l'infection, le niveau de Necdin obtenu sera supérieur à celui attendu de l'activation de p53 à lui seul. Il est possible que le niveau de Necdin soit suffisamment élevé dans ces cellules pour limiter l'activation des gènes cibles de p53 qui, en absence de Necdin causerait plus rapidement l'arrêt tel que le suggère le résultat montrant un délai dans l'arrêt du cycle cellulaire en présence de Necdin (Chapitre III). Il n'est pas exclu que Necdin empêche également l'apoptose prématurée des cellules infectées.

Ces informations nous permettent de proposer un modèle potentiel de la modulation de l'expression de Necdin au cours de l'infection d'une cellule par le Polyomavirus murin (Figure 11, page 140), dans lequel l'expression du transcrit précoce contenant PyLT entraîne une augmentation du niveau de Necdin comme premier événement. Ensuite, la réplication de l'ADN virale cause une activation de p53 ce qui augmente davantage le niveau de Necdin. La quantité de Necdin résultant de l'effet combiné de PyLT et p53 sur son expression permettra de dépasser le seuil d'une réponse normale. La modulation de

Necdin aura pour effet d'atténuer l'activité de p53 le temps nécessaire pour terminer la réplication de l'ADN.

Puisque SV40LT inhibe efficacement p53 par une interaction directe, l'augmentation de Necdin n'est peut-être pas nécessaire dans le contexte de l'infection par SV40, ce qui est en accord avec l'absence de modulation de Necdin par SV40LT dans les fibroblastes humains. SV40LT semble posséder le domaine fonctionnel pour moduler Necdin puisque tous les antigènes grand T possèdent des motifs communs et une séquence relativement conservée dans le domaine en doigt de zinc [163], mais surtout parce que l'expression de SV40LT est accompagnée d'une augmentation de Necdin dans un modèle de souris transgéniques [289]. On peut supposer que SV40LT n'a peut-être pas évolué de la même façon que PyLT pour induire de façon efficace l'expression de Necdin qui est plus important pour ce dernier. L'utilisation d'un mutant de SV40LT déficient dans sa capacité à lier p53 nous aurait permis d'aborder cette question puisque l'impact de SV40LT muté dans la cellule serait alors plus proche de celui observé avec PyLT qui ne lie pas p53.

Figure 11 Modèle proposé représentant la variation du niveau de Necdin au cours de l'infection par le virus du polyome murin



5.2 Necdin dans la carcinogénèse

Nos résultats nous permettent de suggérer un modèle qui se rapporte à l'expression de Necdin au cours de la carcinogénèse (Figure 14, page 155) assez similaire à celui proposé en réponse à l'infection par le Polyomavirus. Dans un premier temps, l'introduction de

l'oncoprotéine virale PyLT dans les NIH 3T3 amène différentes perturbations parmi lesquelles se retrouve l'augmentation de Necdin.

5.2.1 Les événements entraînant la modulation de l'expression de Necdin.

L'un des points d'intérêt pour la poursuite de ce projet est l'élucidation du mécanisme qui provoque la modulation de Necdin de façon p53-indépendente. Ceci est d'intérêt d'une part pour mieux définir la fonction du domaine en doigt de zinc de PyLT du Polyomavirus murin qui est responsable de la modulation de Necdin dans notre modèle. Toutefois, le principal intérêt réside dans la compréhension des perturbations cellulaires, en absence de PyLT, qui peuvent mener à une augmentation inhabituelle de Necdin.

En plus du facteur de transcription LMO4 mentionné en discussion du chapitre III dont l'expression est augmenté par PyLT (2X, $p = 0.007$), d'autres mécanismes de régulation pourraient contribuer à l'augmentation de l'expression de Necdin. Parmi les facteurs reconnus pour agir sur l'expression de Necdin, on retrouve l'acide rétinoïque qui a permis la découverte de Necdin. Les cellules de la lignée cellulaire P19 se différencient en neurones lorsque exposées à l'acide rétinoïque et présentent une augmentation du niveau de Necdin au cours de ce processus [242]. Le lien direct entre Necdin et l'acide rétinoïque n'est toutefois pas démontré. Deux autres facteurs qui agissent négativement cette fois sur l'expression de Necdin sont aussi connus : le récepteur de l'hormone thyroïdienne dans sa forme liée à l'hormone [303] et le facteur de transcription CREB [247].

De plus, une diminution du niveau de méthylation du promoteur de Necdin peut aussi entraîner une augmentation de son expression puisque l'un des allèles de Necdin contient une empreinte maternelle. La perte de cette empreinte génique (LOI) au promoteur de Necdin est d'ailleurs un événement épigénétique qui est rapporté dans le

cancer du pancréas [284]. L'implication de ce mécanisme de régulation est aussi appuyé par l'induction de Necdin lorsque certaines cellules cancéreuses sont traitées avec le 5-aza-2'-deoxycytidine (5AZA-dC), un agent déméthylant qui agit comme inhibiteur des DNA méthyltransferases (DNMT) [304]. Paradoxalement, dans notre modèle de NIH3T3 exprimant PyLT, le niveau de Dnmt1 augmentent (1.6X, $p = 0.0001$) tout comme c'est le cas avec d'autres protéines virales [305,306,307]. Si on peut exclure l'implication de Dnmt1, il est possible que d'autres protéines soient responsables de modifications épigénétiques dans notre modèle.

Vu la diversité des différentes protéines pouvant intervenir directement ou indirectement sur l'expression de Necdin, certains de ces facteurs agissent sans doute de façon contexte cellulaire spécifique. L'analyse par biopuce à ADN réalisée sur notre modèle cellulaire informe sur la variation au niveau transcriptionnel de ces différents candidats dans les NIH 3T3 et révèle une différence significative seulement dans le cas de LMO4. Toutefois, ces candidats ne doivent pas être écartés puisqu'il est possible qu'ils soient pertinents dans d'autres contextes cellulaires. De plus, tous les facteurs recensés ici agissent en complexe avec d'autres protéines ou récepteurs. La disponibilité de ces partenaires peut être affectée soit par des modifications post-traductionnelles ou la présence de compétiteurs par exemple. Ainsi, une analyse plus poussée est nécessaire pour déterminer lequel de ces facteurs est impliqué dans la modulation de Necdin que nous avons observée.

5.2.2 Un niveau élevé de Necdin affecte la réponse anti-tumorale.

Bien que la première réponse de la cellule à une augmentation importante de Necdin semble être un arrêt de la prolifération dans les fibroblastes de souris, une population exprimant un haut niveau de Necdin émerge rapidement et prolifère au même rythme que la population parentale (Chapitre III). La même sélection s'opère dans les NIH 3T3 contenant PyLT puisque malgré que l'expression de Necdin ne soit pas nécessaire à la survie des

cellules qui expriment PyLT, les clones et la population dérivés conservent son expression. L'apparition de ces populations suggère que l'expression de Necdin n'est pas complètement nuisible pour la cellule. Nous ne pouvons toutefois pas établir à ce moment si l'expression de Necdin procure un certain avantage aux cellules qui l'expriment en condition normale de prolifération. Dans notre modèle de carcinogénèse, la présence de Necdin constitue cependant une adaptation qui procure un avantage aux cellules et ceci en interférant avec l'activité de p53 selon nos résultats.

En effet, l'utilisation du modèle cellulaire murin nous a permis de positionner Necdin dans la voie de signalisation de p53 et d'établir qu'une surexpression de Necdin peut avoir des conséquences directes sur l'arrêt du cycle cellulaire en condition de stress (Figure 12, page 143). Nos résultats suggèrent que Necdin constitue un régulateur négatif de la voie de signalisation de p53 d'une part par une

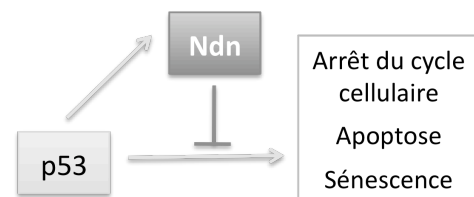


Figure 12 La boucle d'autorégulation négative p53-Necdin

variation de la sensibilité à l'arrêt du cycle cellulaire en fonction de la présence et de l'absence de Necdin que nous avons observée (Chapitre III). Nous n'avons pas adressé l'impact de Necdin sur la fonction apoptotique de p53 puisque son effet inhibiteur a déjà été décrit par d'autres groupes. Necdin contribue à la résistance à l'apoptose de cellules neuronales traitées avec du peroxyde d'hydrogène et la camptothécine, deux composées qui induisent une apoptose suite à l'activation de p53 [259]. Necdin permet également la résistance des cellules U2OS à la mort induite par la surexpression de p53 [254]. Ces résultats appuient l'effet négatif de Necdin sur la voie de p53 que nous proposons. De plus, nous avons confirmé les résultats de Liu et al. [308] proposant que Necdin soit un gène cible de p53. Les mécanismes d'autorégulation en boucle négative de p53 sont importants dans une cellule pour le maintien d'un équilibre en empêchant une réponse excessive. Par contre, la perturbation de ces mécanismes de régulation négative va entraîner une

diminution de l'activité de p53 ce qui aura un impact sur le bon fonctionnement de ce point de contrôle.

Le deuxième volet de notre étude a été entrepris dans le but d'élargir la compréhension de l'effet de Necdin sur une autre fonction importante de p53, soit la sénescence (Chapitre IV). Pour ce faire, la transition d'une lignée cellulaire immortalisée à des cellules primaires était nécessaire. Nous avons favorisé l'utilisation de cellules primaires humaines à celles de souris en raison des différences qu'il existe entre les deux espèces quant aux événements nécessaires à la transformation (résumé à la section 1.1.3.2 en introduction). Pour nous rapprocher du contexte humain, nous avons donc adopté comme modèle cellulaire les IMR90, qui sont des fibroblastes normaux de poumon humain. L'usage des IMR90 nous a permis de renforcer l'hypothèse définissant Necdin comme un régulateur négatif de p53. L'effet de Necdin sur p53 dans les cellules humaines est suggéré par l'augmentation de la résistance aux dommages à l'ADN causés par des radiations ionisantes. Ainsi, Necdin pourrait diminuer la réponse efficace suite aux dommages à l'ADN, qui est une barrière importante pour empêcher la transformation des cellules humaines [309]. Dans les deux modèles, les effets indirects de l'expression de Necdin sur la stabilité génomique devraient être adressés puisque l'expression dérégulée de Necdin de la même façon que la perte de p53 pourrait générer un contexte propice à l'élévation du taux de mutations et des aberrations génétiques [310,311].

L'effet inhibiteur de Necdin sur la voie de signalisation de p53 aurait également dû se refléter sur la durée de vie des cellules primaires humaines puisqu'il est proposé que l'inactivation de p53 prolonge la vie en retardant la sénescence répllicative [41]. L'incapacité de Necdin à prolonger la vie des IMR90, que nous avons observée, n'est toutefois pas en complète contradiction avec sa capacité à inactiver p53. Le stress engendré par l'érosion des télomères au cours de la sénescence répllicative résulte en une réponse de la cellule que l'on peut qualifier de stress chronique qui implique p53, mais aussi la voie p16-Rb-E2F [41,88,312]. L'inhibition de p53 a pour effet de prolonger de la vie, par contre

cet effet peut varier en fonction du modèle cellulaire utilisé [41,88,116,117]. Le système modèle que nous avons utilisé, les IMR90, contient un mécanisme de régulation de la sénescence robuste puisqu'il exprime un niveau élevé de p16 [313] qui pourrait masquer l'effet de Necdin sur p53. En effet, lorsque p53 est lui-même inactivé dans certaines cellules qui expriment un haut niveau de p16, l'impact sur la durée de vie est subtil, avec peu de doublements supplémentaires [97,102]. Le choix de cette lignée était justifié pour évaluer le niveau d'expression de Necdin au cours de la sénescence répliquative ou induite par un stress, mais nous aurions dû nous tourner vers une autre modèle cellulaire où le niveau de p16 est moins important, tel que les BJ [97], pour obtenir une vision plus fine des effets de la modulation de p53 par Necdin sur la durée de vie.

5.2.3 La relation entre Necdin et p53 dans la cancer

Une règle générale a été élaborée suite à la caractérisation des différentes mutations retrouvées dans les cancers. En principe, pour une même voie de signalisation, seulement un événement mutationnel est retrouvé et est responsable du dérèglement de la voie. Par exemple, l'absence de Rb fonctionnel ne sera pas accompagnée d'une délétion de p16 puisque ces deux événements duplicatifs résultent à la même dérégulation du contrôle du cycle cellulaire [314,315]. De la même façon, si p53 est muté ou délété, il n'y a nul besoin d'une amplification de mdm2 qui régule négativement p53 [316,317]. L'effet inhibiteur de Necdin sur la voie de p53 nous permet de proposer que sa surexpression, de la même façon que mdm2, pourrait être retrouvée dans un contexte tumoral où p53 est présent dans sa forme sauvage.

Il est à considérer que la surexpression de Necdin n'aura peut-être pas un effet aussi puissant sur la carcinogénèse que la perte directe de la fonction de p53 par sa mutation. Tout dépend du positionnement de Necdin dans la voie de p53. Par exemple, puisque Mdm2 agit en amont de p53 pour le réguler négativement, la conséquence d'une l'amplification de Mdm2 est importante puisqu'elle a un effet direct sur la quantité de p53

disponible. Pour l'instant, les connaissances actuelles sur Necdin nous permettent de formuler que Necdin agit au moins à deux niveaux. Necdin affecte l'une des modifications post-transcriptionnelles de p53 de même que la transactivation du gène cible p21. Dans ces conditions, il est possible que l'effet de Necdin ne permette pas de contourner toutes les fonctions de p53. Une meilleure compréhension de l'impact de Necdin sur les différentes cibles de p53 est donc requise.

Les cellules primaires humaines pourraient nous aider à établir clairement l'impact de la relation entre Necdin et p53. Tel que décrit en introduction (section 1.1.3.2) une combinaison d'événements spécifiques qui ciblent différentes voies permet la transformation de cellules primaires. Parmi ces événements, on retrouve invariablement le ciblage de la voie de p53, en plus de la voie p16-Rb-E2F, de l'élongation des télomères et de la promotion de la prolifération. Donc, l'utilisation de Necdin pour inactiver la voie de p53, en combinaison avec les autres événements, nous permettrait de voir concrètement l'efficacité de Necdin dans le processus de transformation.

Il n'est pas rare de voir la perte de p53 suivant l'initiation d'une lésion cancéreuse [318,319,320,321]. La perte de p53 fonctionnel dans les cancers plus avancés pourrait être suivie d'une diminution de Necdin, d'une part parce que celui-ci est un gène cible de p53 mais aussi parce qu'une sélection pourrait se faire contre la présence de Necdin qui ne représente plus un avantage puisque p53 n'est plus fonctionnel. Puisque nous avons constaté que la perte de Necdin est accompagnée d'une augmentation de la prolifération dans les NIH 3T3, la diminution de son expression pourrait amener un avantage sélectif dans une population hétérogène pour les cellules qui n'expriment pas Necdin en faveur de la croissance.

5.2.4 La perte de Necdin est favorable à la prolifération

Les fibroblastes de souris et humains que nous avons utilisés contiennent un niveau basal de Necdin de façon naturelle et sa présence indique que cette protéine occupe une fonction dans ces cellules. La littérature rapporte depuis sa découverte que Necdin peut agir comme un suppresseur de croissance lorsque surexprimé dans diverses lignées cellulaires [252,253,254]. Il est clair à partir de nos résultats que Necdin limite la croissance puisque la diminution de son expression par shARN se traduit par une augmentation de la prolifération des fibroblastes de souris (Chapitre III). Cette augmentation du potentiel prolifératif a aussi été observée indirectement lors de l'essai de formation de colonies avec les IMR90 dans lequel la taille des colonies obtenues des populations exprimant un shARN ciblant Necdin était supérieure à celle des contrôles (Figure supplémentaire 1, page II).

L'effet bénéfique sur la prolifération de la perte de Necdin n'a jamais été caractérisé en détail auparavant, mais certaines propriétés connues de Necdin pourraient expliquer cet effet (Figure 13, page 149). Dans un premier temps, la prolifération cellulaire est soutenue par le cycle de phosphorylation et de déphosphorylation du suppresseur de croissance Rb, où la forme hypophosphorylée de Rb liée à E2F est retrouvée dans les cellules quiescentes (revue par[322]). Necdin, comme les membres de la famille Rb, interagit avec E2F1 et E2F4 [245,253,255], toutefois on ignore encore si Necdin est aussi régulé par phosphorylation pour son interaction avec E2F1 et E2F4 au cours du cycle cellulaire. Ainsi, Necdin pourrait constitutivement être retrouvé lié à E2F1 et/ou 4 pour inhiber leur fonction de transactivation. Dans cette situation, la perte de Necdin devrait entraîner un relâchement de E2F qui pourrait se lier à ses gènes cibles et promouvoir la transition de la phase G1 à S (Figure 13, page 149).

L'interaction de Necdin avec E2F1 peut aussi avoir un effet sur des gènes qui interviennent à d'autres phases du cycle cellulaire tel que *cdc2*, un modulateur de la

progression en phase G2/M [323,324,325]. En effet, il a été montré que Necdin s'associe au promoteur de *cdc2* en présence de E2F1 et réprime son expression dans les cellules neuronales post-mitotiques de même que dans des cellules ayant la capacité de se diviser [266]. Cependant, l'effet de la perte de Necdin sur l'expression de *cdc2* a seulement été étudié dans les cellules post-mitotiques dans un contexte d'induction de l'apoptose. L'implication de Necdin dans la régulation de *cdc2* au cours du cycle cellulaire reste à définir.

À partir de nos résultats, un autre mécanisme peut être proposé pour expliquer l'augmentation de la prolifération en absence de Necdin. Nous avons présenté au chapitre III l'effet inhibiteur de Necdin sur l'expression de p21 en condition de stress. L'inhibition de p21 par Necdin est également maintenue en condition normale puisque la déplétion de Necdin entraîne une augmentation du niveau de p21 dans les NIH et NIHLT, toutefois à un niveau qui n'atteint pas celui observé lorsque p53 est activé par un stress (Figure supplémentaire 2, page III). p21 est un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines qui contribue à l'arrêt de la prolifération mais possède aussi une fonction souvent ignorée d'activateur de ces mêmes CDK (revue par [326]). En effet, il a été démontré que p21 co-précipite avec le complexe Cycline/CDK autant dans sa forme inactive que active [327]. En faible quantité, p21 facilite de façon dose-dépendante l'assemblage du complexe de CDK4/6 et cycline D qui est initiée par l'envoi de signaux mitogéniques [328,329]. La localisation nucléaire du complexe est également favorisée par p21 [328,329]. Ensemble, ces évidences ont servi à démontrer l'effet positif d'une augmentation de p21 sur la prolifération. Ainsi, nous suggérons que la légère augmentation de p21 qui résulte de la perte de Necdin agit donc positivement sur la promotion de la prolifération en condition normale. La différence possible dans la composition du complexe Cyclin/CDK/p21 en présence et en absence de Necdin devrait être adressé pour supporter cette affirmation.

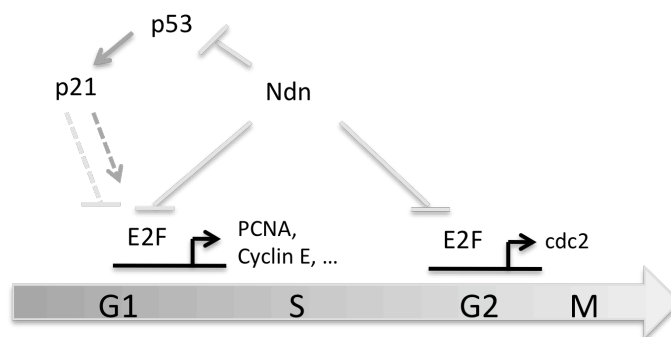


Figure 13 Mécanismes potentiels de régulation de la prolifération par Necdin

Il est à noter que les cellules qui expriment PyLT présentent un niveau basal de p21 plus élevé que la population contrôle (Figure supplémentaire 2, page II). Cette tendance a aussi été constatée dans l'analyse du profil d'expression qui révèlent une augmentation de 2 fois ($P = 0,08$) du niveau de p21 dans les NIHLT. Toutefois, il est paradoxal de constater que malgré que les NIHLT expriment plus de Necdin, leur niveau de p21 soit plus élevé que celui des NIH étant donné que Necdin agit négativement sur l'expression de p21. De plus, dans notre modèle l'expression de p21 est largement dépendante de p53, puisque l'inhibition de p53 par l'utilisation du peptide GSE22 provoque une diminution importante du niveau de p21 (Chapitre III, Figure 6C, page 89). Ceci suggère que les NIH 3T3 exprimant l'oncogène PyLT présentent un niveau d'activité basal de p53 plus élevé. Il existe aussi des mécanismes p53-indépendants capables de moduler l'expression de p21 (revue par [330]) qui pourraient être impliqués. Toutefois, il n'est pas étonnant que les cellules exprimant PyLT ne soient pas affectées par un niveau plus élevé de p21. PyLT interagit avec Rb pour l'inhiber ce qui rend largement inefficace la régulation en amont de la voie Rb-E2F [121,199].

L'arrêt de la prolifération transitoire observé lors de la surexpression de Necdin pourrait résulter de l'effet inverse sur les mécanismes proposés ci-haut. Toutefois, on ne

connaît pas encore l'origine des cellules qui émergent de cet arrêt. Une comparaison aurait pu être faite entre les populations en arrêt peu de temps après l'introduction de Necdin et les cellules de la population émergente pour comprendre davantage les différences qui existent entre ces deux populations.

5.2.5 Necdin dans le cancer de l'ovaire

Afin d'étoffer notre modèle, nous avons souhaité intégrer les connaissances acquises sur Necdin à un cancer humain. Nous nous sommes tournés vers le cancer de l'ovaire puisque cette maladie constitue une pathologie intéressante où l'on retrouve une classe particulière de cancers à faible malignité, les LMP (ou *borderline*). Un profil d'expression génétique distinctif caractérise les LMP et procure quelques indices à propos des événements génétiques qui peuvent limiter son potentiel métastatique sans affecter son taux de prolifération. Quelques exemples identifiés récemment sont les inhibiteurs de protéinase SERPIN A1 [331,332] et SERPIN A5, de même que l'inhibiteur de ERK, Dusp 4 [333]. Necdin pourrait être ajouté à cette liste puisque nous avons observé que son expression est beaucoup plus élevée dans les LMP en comparaison aux tumeurs agressives (Chapitre III). Malheureusement, le manque d'anticorps spécifiques dirigés contre Necdin a limité la caractérisation de son niveau protéique à grande échelle par l'utilisation d'un micro-étalage de tissus, une technique régulièrement utilisée dans notre laboratoire. Cette technique nous aurait également été utile pour générer une méta-analyse comparant l'expression de Necdin en fonction de la présence de p53, de p21, de Mdm2 ou de tout autre protéine d'intérêt.

Les tumeurs LMP conservent généralement un p53 non muté ce qui est en accord avec notre modèle selon lequel la présence d'un niveau élevé de Necdin permettrait de contourner les effets de p53 dans les tumeurs. De plus, un lien possible entre Necdin et une capacité limitée d'angiogénèse a été soulevée par deux auteurs [263,264] et pourrait se transposer dans le cancer de l'ovaire. L'expression de VEGF est associée étroitement avec

l'angiogenèse dans le cancer de l'ovaire [334] et l'évaluation de ce facteur angiogénique révèle une plus faible production dans les LMP en comparaison aux tumeurs agressives [335,336,337]. Ainsi, Necdin pourrait réguler l'expression de VEGF et le potentiel angiogénique dans les LMP. Il serait intéressant de confirmer l'effet de l'expression de Necdin sur VEGF et d'en mesurer l'impact biologique sur l'angiogenèse dans ces tumeurs. À notre connaissance, il existe très peu de modèle cellulaire permettant l'étude du cancer à faible malignité jusqu'à tout récemment [338] alors la plupart des études sur les LMP portent sur des cultures primaires issues de tumeurs.

Tirant profit des ressources disponibles dans notre laboratoire, nous avons évalué le niveau d'expression de Necdin de façon plus large dans différentes lignées cellulaires établies à partir de carcinomes ovariens de différents types histopathologiques, soit OV90, TOV21G, TOV81D, TOV2223G, TOV1946, OV1946 et TOV112D [339,340]. Dans les résultats présentés en données supplémentaires (Figure supplémentaire 3, page IV), on remarque que deux lignées présentent une plus forte expression de Necdin : la TOV81D et la TOV2223. Ces deux lignées possèdent des caractéristiques cliniques distinctes, toutefois toutes deux ne possèdent pas la capacité de former des tumeurs en souris [339,340]. La lignée TOV81D, issue d'un adénocarcinome séreux papillaire, provient d'une patiente chez qui la maladie a été plutôt indolente avec un rechute en plus de 5 ans [339] alors que la lignée TOV2223G est issue d'une patiente atteinte d'un cystadénocarcinome séreux papillaire avec un suivi post-opératoire de seulement 18 mois [340]. Bien que ces lignées proviennent de cancers avancés (grade III), la lignée TOV81D correspond assez bien avec notre modèle de carcinogénèse puisque cette lignée contient un p53 fonctionnel et provient d'une patiente chez qui le pronostic était assez bon. Par contre, la lignée TOV2223G présente, qu'en a elle, une mutation de p53. Toutefois, ce type de mutation résulte en une absence du produit du gène (mutation non-sens) contrairement aux autres lignées étudiées pour lesquelles la mutation de type faux-sens de p53 a été retrouvée [340]. Il est possible que cette différence qu'en au type de mutation ait un impact distinct sur l'expression de Necdin. D'ailleurs, une étude récente démontre bien que, dans le cancer de l'ovaire, le

statut mutationnel de p53 (non-muté, mutation faux-sens et non-sens) se reflète par un profil d'expression particulier et permet dans une certaine mesure de classer les cancers selon leur statut de p53 [341]. Les résultats avec les lignées de cancer de l'ovaire soulèvent une nouvelle avenue qui pourrait être investiguée, c'est-à-dire l'effet des différents types de mutation de p53 sur la présence de Necdin. De plus, la présence de Necdin dans les TOV2223 suggère que Necdin occupe une fonction autre que l'inactivation de p53 dans ce modèle où p53 est absent.

5.2.6 Necdin dans le cancer de la prostate

En plus du cancer de l'ovaire, notre laboratoire s'intéresse également à l'étude du cancer de la prostate, le cancer le plus répandu chez l'homme au Canada. Les lignées couramment utilisées pour l'étude *in vitro* de la maladie sont les lignées cellulaires LNCaP, 22Rv1, PC3 et Du145. Ces lignées comportent de nombreuses différences mais peuvent tout de même être groupées selon certaines caractéristiques communes importantes dans le processus de développement du cancer de la prostate. L'une de ses caractéristiques est la présence du récepteur d'androgène (AR), qui est impliqué dans la prolifération, le développement de la prostate mais est aussi reliée à la carcinogénèse [342]. Puisque les cellules cancéreuses de prostate sont dépendantes de la présence d'androgène pour leur croissance, la déplétion de cette hormone constitue une approche clinique importante pour provoquer la régression de métastases. Toutefois, la progression vers un cancer plus avancé est associée à une transition vers une croissance indépendante de l'androgène. Un second critère qui permet de grouper ces lignées cellulaires est l'altération du suppresseur de tumeur p53, qui est un événement fréquent dans le cancer et qui est aussi retrouvée dans le cancer de la prostate. Plusieurs études ont caractérisé la fréquence des mutations retrouvées dans ce gène dans le cancer de la prostate à différents stades de la maladie et ont noté une faible incidence de mutations dans les tumeurs primaires localisées alors qu'un taux plus important est présent dans les lésions métastastiques [343]. Plus importante encore, ces études ont permis d'établir une forte corrélation entre l'altération de p53 et

l'indépendance aux androgènes [344,345]. La progression de la maladie de la tumeur primaire confinée à la capsule prostatique, aux métastases puis à un cancer hormono-résistant est donc caractérisée par une augmentation de la fréquence des altérations de p53.

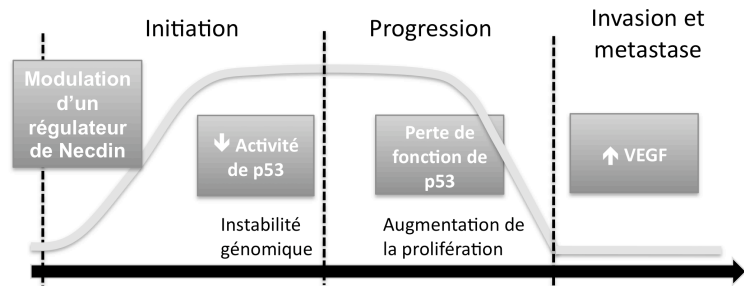
Les lignées cellulaires de cancer de prostate employées dans notre laboratoire représentent bien le modèle de progression du cancer de la prostate. Puisque Necdin n'a jamais été caractérisé dans ce cancer, nous avons évalué son expression dans chacune de ces lignées cellulaires afin de visualiser à quel stade de la maladie Necdin peut être retrouvé (Figure supplémentaire 4, page V). Les lignées LNCaP et 22Rv1 sont à la fois hormono-sensibles et possèdent un p53 fonctionnel. La lignée 22Rv1 a été dérivée par le passage en série de xénogreffes d'une tumeur primaire humaine alors que la lignée LNCaP provient d'une métastase à un ganglion lymphatique. Ces deux lignées reflètent respectivement un stade précoce et intermédiaire de la maladie. Les PC3 et Du145 proviennent de lésions métastatiques, sont complètement hormono-indépendantes et contiennent un p53 qui est non-fonctionnel ce qui représente des événements fréquemment retrouvés dans le cancer avancé. Selon notre modèle, Necdin devrait se retrouver dans les lignées correspondant aux cancers les moins avancés. De façon intéressante, Necdin est exprimé dans les LNCaP et les 22Rv1, avec une plus forte expression dans la lignée LNCaP (Figure supplémentaire 4, page V). Ainsi, l'expression de Necdin est retrouvée exclusivement dans les lignées représentant un stade plus précoce ou moins agressif de la maladie avec une disparition pour l'évolution à un stade hormono-résistant. Ces résultats appuient les observations faites dans le cancer de l'ovaire où une plus forte expression de Necdin est observée dans les cancers de type borderline, des cancers présentant un meilleur pronostic. De plus, les deux lignées qui expriment Necdin sont celles qui comportent un p53 fonctionnel. Toutefois, la lignée PC3 contient une mutation de type non-sens de p53 et ne présente aucune expression de Necdin contrairement à ce qui était constaté avec la lignée TOV2223 de l'ovaire. La voie de signalisation de p53 implique de nombreux points de contrôle et plusieurs effecteurs sont sollicités. Ainsi, malgré le fait que ces deux lignées portent la

même mutation de p53, d'autres composantes de la voie pourraient varier entre ces deux modèles qui représentent deux contextes cellulaires différents.

Dans le contexte du cancer de la prostate, certaines évidences nous suggèrent que Necdin pourrait aussi être associé à un événement important pour ce type de cancer, soit la régulation du récepteur aux androgènes. En effet, p53, l'important partenaire de Necdin, agit à deux niveaux sur le AR pour en affecter la signalisation. p53 exerce un effet inhibiteur sur le AR en formant une liaison avec celui-ci, l'empêchant de former un homodimère ce qui est critique pour la transcription des gènes cibles spécifiques au AR [346,347]. Plus récemment, une étude a révélé que p53 pouvait moduler négativement l'expression du AR en identifiant ce dernier comme un gène cible de p53 [348]. Ces résultats supportent le concept que la perte de p53 au cours de la transition vers l'hormono-résistance peut entraîner une augmentation du niveau de AR, qui est l'un des mécanismes menant à l'indépendance aux androgènes pour la prolifération. Ces informations soulèvent des possibilités intéressantes pour la poursuite de l'étude de Necdin dans le cancer. Necdin pourrait posséder une activité antagoniste sur la capacité de p53 à inhiber le AR. Cette hypothèse peut être rapidement vérifiée avec des expériences de gain et de perte de fonction de Necdin. L'impacte de Necdin pourrait être mesuré par la variation de l'antigène prostate spécifique (APS), un marqueur diagnostique, ou par la variation de la croissance puisque ces deux paramètres sont affectés par la modulation du AR dans les LNCaP [349]. Ceci permettrait à la fois d'évaluer si Necdin agit également sur les cibles de p53 qui sont régulées négativement par ce dernier et d'établir si Necdin facilite la prolifération lorsque p53 est encore fonctionnel dans le cancer de la prostate.

Conclusion

Figure 14 Expression de Necdin dans notre modèle de carcinogénèse



Le récapitulatif de nos résultats permet de proposer le modèle suivant où nous tentons de situer Necdin dans le processus de carcinogénèse. L'introduction de PyLT provoque une augmentation de l'expression de Necdin par un mécanisme indépendant de p53 qui reste cependant à définir. La dérégulation de Necdin implique fort probablement des protéines cellulaires qui peuvent être dérégulées comme étape initiatrice dans la carcinogénèse. Le niveau anormal de Necdin obtenu a des répercussions négatives sur la régulation du suppresseur de tumeur p53. Ainsi, Necdin pourrait diminuer la réponse efficace de p53, qui est une barrière très importante pour empêcher la transformation des cellules humaines, par exemple suite aux dommages à l'ADN [309]. Cette propriété que confère Necdin pourrait rendre la cellule propice à l'accumulation de mutations à un rythme plus élevé que dans une cellule normale. L'expansion clonale qui résulte en la formation d'une masse se fera à partir de cellules qui ont acquis des mutations procurant un avantage sélectif pour la cellule comme la perte de suppresseur de tumeur et la modulation d'oncogènes. De plus, tel que rapporté par d'autres groupes, Necdin permet aux cellules de résister à l'apoptose induite par différents stress génotoxiques de même que via la stimulation de récepteurs membranaires [254,256,257,259,266,271]. La résistance à l'apoptose est clairement l'un des événements qu'une cellule doit acquérir pour devenir cancéreuse [1] et constitue aussi un aspect important de la contribution potentiel de Necdin à l'étape d'initiation de la tumeur.

La présence de Necdin établit un avantage sélectif dans un contexte où p53 est encore fonctionnel à l'étape d'initiation de la carcinogénèse. Toutefois, nous suggérons que dans le cas d'un cancer plus avancé où p53 est perdu au cours des étapes du processus de transformation, la présence de Necdin ne constituerait plus cet avantage sélectif. La perte de Necdin suivant celle de p53 dans le stade avancé du cancer pourrait contribuer à la promotion de la prolifération plus rapide des cellules cancéreuses. De plus, la dépendance de la tumeur à stimuler la formation de nouveaux vaisseaux lorsqu'elle atteint une certaine dimension devrait forcer la diminution ou la disparition de Necdin qui est proposé comme un facteur anti-angiogénique. Les différents modèles de culture cellulaire examinés vont dans ce sens avec une faible expression de Necdin dans les lignées les plus agressives. Il en est de même pour les tumeurs de l'ovaire prises en exemple, dans lesquelles l'expression de Necdin est retrouvée dans les tumeurs de faible potentiel de malignité. Il n'est pas exclu que certains types de tumeurs présentant un niveau élevé de Necdin n'évoluent tout simplement pas à un stade avancé.

L'utilisation d'une protéine virale a orienté ce projet de recherche vers l'étude de Necdin, qui était très peu caractérisé dans le cancer. Nous avons révélé que, en raison de la dualité de ses fonctions, Necdin ne semble pas posséder le plein potentiel d'un oncogène. D'une part Necdin limite la prolifération en interagissant avec E2F, mais sa surexpression n'est pas incompatible avec la prolifération. D'autre part, la fonction oncogénique de Necdin pourrait résider dans sa capacité à retarder la réponse p53-dépendente en partie en réprimant l'expression de p21. La relation entre Necdin et la voie de signalisation de p53 a été le point central du présent ouvrage. L'attention devrait maintenant se tourner vers la fonction que Necdin occupe dans la régulation du cycle

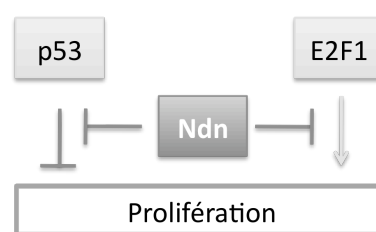


Figure 15 Dualité de la fonction de Necdin

cellulaire et la voie de signalisation de Rb-E2F, afin de dresser une vue moléculaire d'ensemble qui permettra de mieux évaluer son impact dans la carcinogénèse.

Bibliographie

1. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
2. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 14: 473-486.
3. Sinha R, Caporaso N (1999) Diet, genetic susceptibility and human cancer etiology. *J Nutr* 129: 556S-559S.
4. Balducci L (2005) Epidemiology of cancer and aging. *J Oncol Manag* 14: 47-50.
5. Guilford P (2000) The inherited susceptibility to cancer. *Cell Mol Life Sci* 57: 589-603.
6. Gilliland FD (1997) Ethnic differences in cancer incidence: a marker for inherited susceptibility? *Environ Health Perspect* 105 Suppl 4: 897-900.
7. Preston DL, Ron E, Tokuoka S, Funamoto S, Nishi N, et al. (2007) Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiat Res* 168: 1-64.
8. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, et al. (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325: 201-204.
9. Albanes D (1987) Total calories, body weight, and tumor incidence in mice. *Cancer Res* 47: 1987-1992.
10. Sporn MB (1996) The war on cancer. *Lancet* 347: 1377-1381.
11. Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820-823.
12. Knudson AG (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 157-162.
13. Vogelstein B, Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9: 138-141.
14. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, et al. (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708.
15. Jacks T, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernards A, et al. (1994) Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1. *Nat Genet* 7: 353-361.

16. Fisher RP, Morgan DO (1994) A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78: 713-724.
17. Tassan JP, Jaquenoud M, Fry AM, Frutiger S, Hughes GJ, et al. (1995) In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *EMBO J* 14: 5608-5617.
18. Helin K, Harlow E, Fattaey A (1993) Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 13: 6501-6508.
19. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM (2008) CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14: 159-169.
20. Canepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, et al. (2007) INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* 59: 419-426.
21. Sherr CJ, McCormick F (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2: 103-112.
22. Knudsen ES, Knudsen KE (2008) Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response. *Nat Rev Cancer* 8: 714-724.
23. Lane DP, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263.
24. Linzer DI, Levine AJ (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52.
25. Jenkins JR, Rudge K, Chumakov P, Currie GA (1985) The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. *Nature* 317: 816-818.
26. Hinds P, Finlay C, Levine AJ (1989) Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 63: 739-746.
27. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ (1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-1093.

28. Michalovitz D, Halevy O, Oren M (1990) Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* 62: 671-680.
29. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, et al. (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352: 345-347.
30. Lu X (2005) p53: a heavily dictated dictator of life and death. *Curr Opin Genet Dev* 15: 27-33.
31. Colman MS, Afshari CA, Barrett JC (2000) Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat Res* 462: 179-188.
32. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237-1245.
33. Michael D, Oren M (2003) The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* 13: 49-58.
34. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7: 1126-1132.
35. Bullock AN, Fersht AR (2001) Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer* 1: 68-76.
36. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, et al. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825.
37. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75: 805-816.
38. Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M (1995) Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 10: 109-115.
39. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR (1995) p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8493-8497.

40. Taylor WR, DePrimo SE, Agarwal A, Agarwal ML, Schonthal AH, et al. (1999) Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol Biol Cell* 10: 3607-3622.
41. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE (1991) A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 196: 33-39.
42. Al Rashid ST, Dellaire G, Cuddihy A, Jalali F, Vaid M, et al. (2005) Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks in vivo. *Cancer Res* 65: 10810-10821.
43. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, et al. (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302: 1036-1038.
44. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M (2002) Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 277: 3247-3257.
45. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, et al. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303: 1010-1014.
46. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., et al. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356: 215-221.
47. Harvey M, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, Bradley A, et al. (1993) Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet* 5: 225-229.
48. Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, et al. (1994) Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4: 1-7.
49. Srivastava S, Zou ZQ, Pirolo K, Blattner W, Chang EH (1990) Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348: 747-749.

50. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878.
51. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.
52. Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2: 594-604.
53. de Vries A, Flores ER, Miranda B, Hsieh HM, van Oostrom CT, et al. (2002) Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2948-2953.
54. Overholtzer M, Rao PH, Favis R, Lu XY, Elowitz MB, et al. (2003) The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11547-11552.
55. Mahmood Z, Shukla Y (2010) Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res* 316: 887-899.
56. Gobe GC, Axelsen RA, Harmon BV, Allan DJ (1988) Cell death by apoptosis following X-irradiation of the foetal and neonatal rat kidney. *Int J Radiat Biol* 54: 567-576.
57. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
58. Harris CC (1996) p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 17: 1187-1198.
59. Blumenson LE, Bross ID (1976) A possible mechanism for enhancement of increased production of tumor angiogenic factor. *Growth* 40: 205-209.
60. Gleadle JM, Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ (1995) Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol* 268: C1362-1368.

61. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265: 1582-1584.
62. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, et al. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362: 841-844.
63. Gospodarowicz D (1976) Humoral control of cell proliferation: the role of fibroblast growth factor in regeneration, angiogenesis, wound healing, and neoplastic growth. *Prog Clin Biol Res* 9: 1-19.
64. Huttenlocher A, Lakonishok M, Kinder M, Wu S, Truong T, et al. (1998) Integrin and cadherin synergy regulates contact inhibition of migration and motile activity. *J Cell Biol* 141: 515-526.
65. Sreenath T, Matrisian LM, Stetler-Stevenson W, Gattoni-Celli S, Pozzatti RO (1992) Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. *Cancer Res* 52: 4942-4947.
66. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Yla-Herttuala S, et al. (2001) Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 61: 1786-1790.
67. Coleman RE (1997) Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 80: 1588-1594.
68. Sharpless NE (2003) The persistence of senescence. *Sci Aging Knowledge Environ* 2003: PE24.
69. Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41: 181-190.
70. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 225: 951-960.
71. Hayflick L (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636.

72. Wright WE, Shay JW (2000) Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med* 6: 849-851.
73. Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, et al. (2003) Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5: 741-747.
74. Busuttill RA, Rubio M, Dolle ME, Campisi J, Vijg J (2003) Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell* 2: 287-294.
75. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363-9367.
76. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, et al. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6: 2853-2868.
77. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, et al. (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11: 973-979.
78. Serrano M, Blasco MA (2001) Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 13: 748-753.
79. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN (1995) Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4337-4341.
80. Robles SJ, Adami GR (1998) Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16: 1113-1123.

81. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593-602.
82. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM (1998) Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 12: 2997-3007.
83. Erusalimsky JD, Kurz DJ (2005) Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp Gerontol* 40: 634-642.
84. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, et al. (2005) Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436: 642.
85. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, et al. (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436: 720-724.
86. Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, et al. (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436: 660-665.
87. Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120: 513-522.
88. Hara E, Tsurui H, Shinozaki A, Nakada S, Oda K (1991) Cooperative effect of antisense-Rb and antisense-p53 oligomers on the extension of life span in human diploid fibroblasts, TIG-1. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 528-534.
89. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, et al. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426: 194-198.
90. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, et al. (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444: 638-642.

91. Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Ferbeyre G (2007) The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 21: 43-48.
92. Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, Riabowol K (1995) Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8348-8352.
93. Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707.
94. Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V (1999) Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19: 2109-2117.
95. Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, et al. (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13742-13747.
96. Dai CY, Enders GH (2000) p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene* 19: 1613-1622.
97. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, et al. (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22: 4212-4222.
98. Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, et al. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113: 703-716.
99. Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, et al. (2001) Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* 409: 1067-1070.
100. Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M (1999) The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 397: 164-168.

101. Gil J, Bernard D, Martinez D, Beach D (2004) Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nat Cell Biol* 6: 67-72.
102. Itahana K, Zou Y, Itahana Y, Martinez JL, Beausejour C, et al. (2003) Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* 23: 389-401.
103. Schmitt CA (2003) Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 286-295.
104. Dimri GP, Itahana K, Acosta M, Campisi J (2000) Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 20: 273-285.
105. Wei W, Hemmer RM, Sedivy JM (2001) Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 21: 6748-6757.
106. McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Peters G (1998) Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr Biol* 8: 351-354.
107. Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, et al. (1998) p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395: 124-125.
108. Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, et al. (1998) The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 17: 5001-5014.
109. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ (1995) Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83: 993-1000.
110. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, et al. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015.

111. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR (1995) Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 14: 4240-4248.
112. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, et al. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352.
113. Counter CM, Hahn WC, Wei W, Caddle SD, Beijersbergen RL, et al. (1998) Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14723-14728.
114. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, et al. (1999) Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 5: 1164-1170.
115. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, et al. (1998) Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396: 84-88.
116. Gire V, Wynford-Thomas D (1998) Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *Mol Cell Biol* 18: 1611-1621.
117. Smogorzewska A, de Lange T (2002) Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J* 21: 4338-4348.
118. Deppert W, Haug M, Steinmayer T (1987) Modulation of p53 protein expression during cellular transformation with simian virus 40. *Mol Cell Biol* 7: 4453-4463.
119. Bargonetti J, Reynisdottir I, Friedman PN, Prives C (1992) Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes Dev* 6: 1886-1898.
120. DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, et al. (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54: 275-283.

121. Dyson N, Bernards R, Friend SH, Gooding LR, Hassell JA, et al. (1990) Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J Virol* 64: 1353-1356.
122. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934-937.
123. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136.
124. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75: 495-505.
125. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, et al. (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11: 1921-1929.
126. Shay JW, Wright WE (1989) Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res* 184: 109-118.
127. Shay JW, Van Der Haegen BA, Ying Y, Wright WE (1993) The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res* 209: 45-52.
128. Mathon NF, Lloyd AC (2001) Cell senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 203-213.
129. Polager S, Ginsberg D (2009) p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer* 9: 738-748.
130. Land H, Parada LF, Weinberg RA (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304: 596-602.

131. Stevenson M, Volsky DJ (1986) Activated v-myc and v-ras oncogenes do not transform normal human lymphocytes. *Mol Cell Biol* 6: 3410-3417.
132. Akagi T, Sasai K, Hanafusa H (2003) Refractory nature of normal human diploid fibroblasts with respect to oncogene-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13567-13572.
133. O'Brien W, Stenman G, Sager R (1986) Suppression of tumor growth by senescence in virally transformed human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 8659-8663.
134. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, et al. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400: 464-468.
135. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, et al. (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* 15: 50-65.
136. Lundberg AS, Randell SH, Stewart SA, Elenbaas B, Hartwell KA, et al. (2002) Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. *Oncogene* 21: 4577-4586.
137. Liu J, Yang G, Thompson-Lanza JA, Glassman A, Hayes K, et al. (2004) A genetically defined model for human ovarian cancer. *Cancer Res* 64: 1655-1663.
138. Seger YR, Garcia-Cao M, Piccinin S, Cunsolo CL, Doglioni C, et al. (2002) Transformation of normal human cells in the absence of telomerase activation. *Cancer Cell* 2: 401-413.
139. Sellers WR, Kaelin WG, Jr. (1997) Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 15: 3301-3312.
140. Poznic M (2009) Retinoblastoma protein: a central processing unit. *J Biosci* 34: 305-312.
141. Rous P (1910) A Transmissible Avian Neoplasm. (Sarcoma of the Common Fowl). *J Exp Med* 12: 696-705.

142. Shope RE (1932) A Transmissible Tumor-Like Condition in Rabbits. *J Exp Med* 56: 793-802.
143. Martin GS (1970) Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 227: 1021-1023.
144. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260: 170-173.
145. Stehelin D, Guntaka RV, Varmus HE, Bishop JM (1976) Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J Mol Biol* 101: 349-365.
146. Sobel RE, Sadar MD (2005) Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 2. *J Urol* 173: 360-372.
147. Kirchhoff C, Araki Y, Huhtaniemi I, Matusik RJ, Osterhoff C, et al. (2004) Immortalization by large T-antigen of the adult epididymal duct epithelium. *Mol Cell Endocrinol* 216: 83-94.
148. Koprowski H, Croce CM (1977) Tumorigenicity of simian virus 40-transformed human cells and mouse--human hybrids in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 1142-1146.
149. Bouchard L, Lamarre L, Tremblay PJ, Jolicoeur P (1989) Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene. *Cell* 57: 931-936.
150. Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, et al. (1996) Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res* 56: 4096-4102.
151. Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ (1992) Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol* 12: 954-961.
152. zur Hausen H (2001) Oncogenic DNA viruses. *Oncogene* 20: 7820-7823.

153. Montgomery K, Bloch JR (2010) The human papillomavirus in women over 40: implications for practice and recommendations for screening. *J Am Acad Nurse Pract* 22: 92-100.
154. La Torre G, de Waure C, Chiaradia G, Mannocci A, Ricciardi W (2007) HPV vaccine efficacy in preventing persistent cervical HPV infection: a systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 25: 8352-8358.
155. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, et al. (1994) Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266: 1865-1869.
156. Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1: 702-703.
157. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS (1981) Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 2: 1129-1133.
158. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, et al. (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244: 359-362.
159. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, et al. (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 7415-7419.
160. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, et al. (1986) HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1: 1031-1032.
161. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS (2008) Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319: 1096-1100.
162. Cremisi C, Pignatti PF, Croissant O, Yaniv M (1975) Chromatin-like structures in polyoma virus and simian virus 10 lytic cycle. *J Virol* 17: 204-211.
163. Pipas JM (1992) Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *J Virol* 66: 3979-3985.

164. Weinberg RA, Warnaar SO, Winocour E (1972) Isolation and characterization of simian virus 40 ribonucleic acid. *J Virol* 10: 193-201.
165. Beard P, Acheson NH, Maxwell IH (1975) Strand-specific transcription of polyoma virus DNA-early in productive infection and in transformed cells. *J Virol* 17: 20-26.
166. Liu Z, Carmichael GG (1993) Polyoma virus early-late switch: regulation of late RNA accumulation by DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8494-8498.
167. Soeda E, Arrand JR, Smolar N, Walsh JE, Griffin BE (1980) Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature* 283: 445-453.
168. Treisman R, Cowie A, Favaloro J, Jat P, Kamen R (1981) The structures of the spliced mRNAs encoding polyoma virus early region proteins. *J Mol Appl Genet* 1: 83-92.
169. Sullivan CS, Ganem D (2005) MicroRNAs and viral infection. *Mol Cell* 20: 3-7.
170. Sullivan CS, Sung CK, Pack CD, Grundhoff A, Lukacher AE, et al. (2009) Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection. *Virology* 387: 157-167.
171. Howley PM, Livingston DM (2009) Small DNA tumor viruses: large contributors to biomedical sciences. *Virology* 384: 256-259.
172. TrabANELLI C, Corallini A, Gruppioni R, Sensi A, Bonfatti A, et al. (1998) Chromosomal aberrations induced by BK virus T antigen in human fibroblasts. *Virology* 243: 492-496.
173. Theile M, Grabowski G (1990) Mutagenic activity of BKV and JCV in human and other mammalian cells. *Arch Virol* 113: 221-233.
174. Gazdar AF, Butel JS, Carbone M (2002) SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* 2: 957-964.
175. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH (1971) Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1: 1257-1260.
176. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B (1971) New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1: 1253-1257.

177. Wold WS, Green M, Mackey JK, Martin JD, Padgett BL, et al. (1980) Integration pattern of human JC virus sequences in two clones of a cell line established from a JC virus-induced hamster brain tumor. *J Virol* 33: 1225-1228.
178. Shah KV, Daniel RW, Strandberg JD (1975) Sarcoma in a hamster inoculated with BK virus, a human papovavirus. *J Natl Cancer Inst* 54: 945-950.
179. Bollag B, Chuke WF, Frisque RJ (1989) Hybrid genomes of the polyomaviruses JC virus, BK virus, and simian virus 40: identification of sequences important for efficient transformation. *J Virol* 63: 863-872.
180. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, et al. (2007) Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 81: 4130-4136.
181. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, et al. (2007) Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 3: e64.
182. Fischer N, Brandner J, Fuchs F, Moll I, Grundhoff A (2009) Detection of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) in Merkel cell carcinoma cell lines: Cell morphology and growth phenotype do not reflect presence of the virus. *Int J Cancer*.
183. Sweet BH, Hilleman MR (1960) The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med* 105: 420-427.
184. Rabson AS, Kirschstein RL (1962) Induction of malignancy in vitro in newborn hamster kidney tissue infected with simian vacuolating virus (SV40). *Proc Soc Exp Biol Med* 111: 323-328.
185. Black PH, Rowe WP (1964) Viral Studies of Sv40 Tumorigenesis in Hamsters. *J Natl Cancer Inst* 32: 253-265.
186. Poulin DL, DeCaprio JA (2006) Is there a role for SV40 in human cancer? *J Clin Oncol* 24: 4356-4365.
187. Horvath CJ, Simon MA, Bergsagel DJ, Pauley DR, King NW, et al. (1992) Simian virus 40-induced disease in rhesus monkeys with simian acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Pathol* 140: 1431-1440.

188. Rabson AS, O'Connor GT, Kirschstein RL, Branigan WJ (1962) Papillary ependymomas produced in *Rattus (Mastomys) natalensis* inoculated with vacuolating virus (SV40). *J Natl Cancer Inst* 29: 765-787.
189. Duffell D, Hinz R, Nelson E (1964) Neoplasms in Hamsters Induced by Simian Virus 40; Light and Electron Microscopic Observations. *Am J Pathol* 45: 59-73.
190. Manfredi JJ, Prives C (1994) The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* 1198: 65-83.
191. Gross L (1953) A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 83: 414-421.
192. Stewart SE, Eddy BE, Borgese N (1958) Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J Natl Cancer Inst* 20: 1223-1243.
193. Vogt M, Dulbecco R (1963) Steps in the neoplastic transformation of hamster embryo cells by polyoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 49: 171-179.
194. Sanford KK, Hoemann RE (1967) Neoplastic transformation of mouse and hamster cells in vitro with and without polyoma virus. *J Natl Cancer Inst* 39: 691-703.
195. Freund R, Mandel G, Carmichael GG, Barncastle JP, Dawe CJ, et al. (1987) Polyomavirus tumor induction in mice: influences of viral coding and noncoding sequences on tumor profiles. *J Virol* 61: 2232-2239.
196. Treisman R, Novak U, Favaloro J, Kamen R (1981) Transformation of rat cells by an altered polyoma virus genome expressing only the middle-T protein. *Nature* 292: 595-600.
197. Oliveira ML, Brochado SM, Sogayar MC (1999) Mechanisms of cell transformation induced by polyomavirus. *Braz J Med Biol Res* 32: 861-865.
198. Fluck MM, Schaffhausen BS (2009) Lessons in signaling and tumorigenesis from polyomavirus middle T antigen. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 542-563, Table of Contents.

199. Desjardins P, Pilon AA, Hassell JA, Mes-Masson AM (1997) Polyomavirus large T-antigen binds the "pRb related" protein p130 through sequences in conserved region 2. *Virus Res* 47: 85-90.
200. Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I, Robin P, Lorain S, et al. (1998) Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* 391: 601-605.
201. Rihs HP, Jans DA, Fan H, Peters R (1991) The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J* 10: 633-639.
202. Khandjian EW, Tremblay S (1992) Phosphorylation of the retinoblastoma protein is modulated in mouse kidney cells infected with polyomavirus. *Oncogene* 7: 909-917.
203. Mudrak I, Ogris E, Rotheneder H, Wintersberger E (1994) Coordinated trans activation of DNA synthesis- and precursor-producing enzymes by polyomavirus large T antigen through interaction with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 14: 1886-1892.
204. Frisch SM, Mymryk JS (2002) Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 441-452.
205. Marton A, Marko B, Delbecchi L, Bourgaux P (1995) Topoisomerase activity associated with polyoma virus large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* 1262: 59-63.
206. Stahl H, Droge P, Knippers R (1986) DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen. *EMBO J* 5: 1939-1944.
207. Wang EH, Prives C (1991) ATP induces the assembly of polyoma large tumor antigen into hexamers. *Virology* 184: 399-403.
208. Rose PE, Schaffhausen BS (1995) Zinc-binding and protein-protein interactions mediated by the polyomavirus large T antigen zinc finger. *J Virol* 69: 2842-2849.
209. Farmerie WG, Folk WR (1984) Regulation of polyomavirus transcription by large tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 6919-6923.

210. Benjamin TL, Schaffhausen BS, Silver JE (1979) Polyoma T (tumor) antigen species in abortively and stably transformed cells. *J Supramol Struct* 12: 127-137.
211. Dilworth SM (1990) Cell alterations induced by the large T-antigens of SV40 and polyoma virus. *Semin Cancer Biol* 1: 407-414.
212. Manfredi JJ, Prives C (1990) Binding of p53 and p105-RB is not sufficient for oncogenic transformation by a hybrid polyomavirus-simian virus 40 large T antigen. *J Virol* 64: 5250-5259.
213. Yi X, Freund R (1998) Deletion of proline-rich domain in polyomavirus T antigens results in virus partially defective in transformation and tumorigenesis. *Virology* 248: 420-431.
214. Su W, Liu W, Schaffhausen BS, Roberts TM (1995) Association of Polyomavirus middle tumor antigen with phospholipase C-gamma 1. *J Biol Chem* 270: 12331-12334.
215. Rassoulzadegan M, Cowie A, Carr A, Glaichenhaus N, Kamen R, et al. (1982) The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 300: 713-718.
216. Asselin C, Gelinac C, Bastin M (1983) Role of the three polyoma virus early proteins in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 3: 1451-1459.
217. Mor O, Read M, Fried M (1997) p53 in polyoma virus transformed REF52 cells. *Oncogene* 15: 3113-3119.
218. Marti A, Ballmer-Hofer K (1999) Polyomavirus large- and small-T relieve middle-T-induced cell cycle arrest in normal fibroblasts. *J Gen Virol* 80 (Pt 11): 2917-2921.
219. Lomax M, Fried M (2001) Polyoma virus disrupts ARF signaling to p53. *Oncogene* 20: 4951-4960.
220. Doherty J, Freund R (1997) Polyomavirus large T antigen overcomes p53 dependent growth arrest. *Oncogene* 14: 1923-1931.
221. Moule MG, Collins CH, McCormick F, Fried M (2004) Role for PP2A in ARF signaling to p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14063-14066.

222. Rassoulzadegan M, Naghashfar Z, Cowie A, Carr A, Grisoni M, et al. (1983) Expression of the large T protein of polyoma virus promotes the establishment in culture of "normal" rodent fibroblast cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 4354-4358.
223. Asselin C, Bastin M (1985) Sequences from polyomavirus and simian virus 40 large T genes capable of immortalizing primary rat embryo fibroblasts. *J Virol* 56: 958-968.
224. Jat PS, Sharp PA (1986) Large T antigens of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J Virol* 59: 746-750.
225. Pilon AA, Desjardins P, Hassell JA, Mes-Masson AM (1996) Functional implications of mutations within polyomavirus large T antigen Rb-binding domain: effects on pRb and p107 binding in vitro and immortalization activity in vivo. *J Virol* 70: 4457-4465.
226. Larose A, Dyson N, Sullivan M, Harlow E, Bastin M (1991) Polyomavirus large T mutants affected in retinoblastoma protein binding are defective in immortalization. *J Virol* 65: 2308-2313.
227. Sheng Q, Denis D, Ratnofsky M, Roberts TM, DeCaprio JA, et al. (1997) The DnaJ domain of polyomavirus large T antigen is required to regulate Rb family tumor suppressor function. *J Virol* 71: 9410-9416.
228. Gottifredi V, Pelicci G, Munarriz E, Maione R, Pelicci PG, et al. (1999) Polyomavirus large T antigen induces alterations in cytoplasmic signalling pathways involving Shc activation. *J Virol* 73: 1427-1437.
229. Bautch VL (1989) Effects of polyoma virus oncogenes in transgenic mice. *Mol Biol Med* 6: 309-317.
230. Chalifour LE, Gomes ML, Wang NS, Mes-Masson AM (1990) Polyomavirus large T-antigen expression in heart of transgenic mice causes cardiomyopathy. *Oncogene* 5: 1719-1726.

231. Chalifour LE, Mes-Masson AM, Gomes ML, Wang NS (1992) Testicular adenoma and seminal vesicle engorgement in polyomavirus large-T antigen transgenic mice. *Mol Carcinog* 5: 178-189.
232. Lebel M, Webster M, Muller WJ, Royal A, Gauthier J, et al. (1995) Transgenic mice bearing the polyomavirus large T antigen directed by 2.1 kb of the keratin 19 promoter develop bronchiolar papillary tumors with progression to lung adenocarcinomas. *Cell Growth Differ* 6: 1591-1600.
233. Paquis-Flucklinger V, Michiels JF, Vidal F, Alquier C, Pointis G, et al. (1993) Expression in transgenic mice of the large T antigen of polyomavirus induces Sertoli cell tumours and allows the establishment of differentiated cell lines. *Oncogene* 8: 2087-2094.
234. Lebel M, Bertrand R, Mes-Masson AM (1996) Decreased Fas antigen receptor expression in testicular tumor cell lines derived from polyomavirus large T-antigen transgenic mice. *Oncogene* 12: 1127-1135.
235. Rodier F, Bertrand R, Bossolasco M, Mes-Masson AM (2000) Polyomavirus large T-antigen protects mouse cells from Fas-, TNF-alpha- and taxol-induced apoptosis. *Oncogene* 19: 6261-6270.
236. Teodoro JG, Branton PE (1997) Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 71: 1739-1746.
237. Nakada Y, Taniura H, Uetsuki T, Inazawa J, Yoshikawa K (1998) The human chromosomal gene for necdin, a neuronal growth suppressor, in the Prader-Willi syndrome deletion region. *Gene* 213: 65-72.
238. Watrin F, Roeckel N, Lacroix L, Mignon C, Mattei MG, et al. (1997) The mouse Necdin gene is expressed from the paternal allele only and lies in the 7C region of the mouse chromosome 7, a region of conserved synteny to the human Prader-Willi syndrome region. *Eur J Hum Genet* 5: 324-332.

239. Jay P, Rougeulle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei MG, et al. (1997) The human necdin gene, NDN, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet* 17: 357-361.
240. Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B (1998) Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet* 14: 194-200.
241. Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, et al. (1993) Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 91: 398-402.
242. Maruyama K, Usami M, Aizawa T, Yoshikawa K (1991) A novel brain-specific mRNA encoding nuclear protein (necdin) expressed in neurally differentiated embryonal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 291-296.
243. Xiao J, Chen HS (2004) Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol* 10: 1849-1853.
244. Kuwajima T, Taniura H, Nishimura I, Yoshikawa K (2004) Necdin interacts with the Msx2 homeodomain protein via MAGE-D1 to promote myogenic differentiation of C2C12 cells. *J Biol Chem* 279: 40484-40493.
245. Kuwako K, Taniura H, Yoshikawa K (2004) Necdin-related MAGE proteins differentially interact with the E2F1 transcription factor and the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem* 279: 1703-1712.
246. Taniguchi N, Taniura H, Niinobe M, Takayama C, Tominaga-Yoshino K, et al. (2000) The postmitotic growth suppressor necdin interacts with a calcium-binding protein (NEFA) in neuronal cytoplasm. *J Biol Chem* 275: 31674-31681.
247. Tseng YH, Butte AJ, Kokkotou E, Yechoor VK, Taniguchi CM, et al. (2005) Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin. *Nat Cell Biol* 7: 601-611.
248. Taniura H, Yoshikawa K (2002) Necdin interacts with the ribonucleoprotein hnRNP U in the nuclear matrix. *J Cell Biochem* 84: 545-555.

249. Tcherpakov M, Bronfman FC, Conticello SG, Vaskovsky A, Levy Z, et al. (2002) The p75 neurotrophin receptor interacts with multiple MAGE proteins. *J Biol Chem* 277: 49101-49104.
250. Kuwako K, Hosokawa A, Nishimura I, Uetsuki T, Yamada M, et al. (2005) Disruption of the paternal necdin gene diminishes TrkA signaling for sensory neuron survival. *J Neurosci* 25: 7090-7099.
251. Liu X, Wang Y, Zhang Y, Zhu W, Xu X, et al. (2009) Nogo-A inhibits necdin-accelerated neurite outgrowth by retaining necdin in the cytoplasm. *Mol Cell Neurosci* 41: 51-61.
252. Hayashi Y, Matsuyama K, Takagi K, Sugiura H, Yoshikawa K (1995) Arrest of cell growth by necdin, a nuclear protein expressed in postmitotic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 317-324.
253. Taniura H, Taniguchi N, Hara M, Yoshikawa K (1998) Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J Biol Chem* 273: 720-728.
254. Taniura H, Matsumoto K, Yoshikawa K (1999) Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53. *J Biol Chem* 274: 16242-16248.
255. Kobayashi M, Taniura H, Yoshikawa K (2002) Ectopic expression of necdin induces differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 277: 42128-42135.
256. Andrieu D, Meziane H, Marly F, Angelats C, Fernandez PA, et al. (2006) Sensory defects in Necdin deficient mice result from a loss of sensory neurons correlated within an increase of developmental programmed cell death. *BMC Dev Biol* 6: 56.
257. Takazaki R, Nishimura I, Yoshikawa K (2002) Necdin is required for terminal differentiation and survival of primary dorsal root ganglion neurons. *Exp Cell Res* 277: 220-232.
258. Deponti D, Francois S, Baesso S, Sciorati C, Innocenzi A, et al. (2007) Necdin mediates skeletal muscle regeneration by promoting myoblast survival and differentiation. *J Cell Biol* 179: 305-319.

259. Hasegawa K, Yoshikawa K (2008) Necdin regulates p53 acetylation via Sirtuin1 to modulate DNA damage response in cortical neurons. *J Neurosci* 28: 8772-8784.
260. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, et al. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107: 137-148.
261. Matsumoto K, Taniura H, Uetsuki T, Yoshikawa K (2001) Necdin acts as a transcriptional repressor that interacts with multiple guanosine clusters. *Gene* 272: 173-179.
262. Larsson LG, Henriksson MA (2010) The Yin and Yang functions of the Myc oncoprotein in cancer development and as targets for therapy. *Exp Cell Res* 316: 1429-1437.
263. Moon HE, Ahn MY, Park JA, Min KJ, Kwon YW, et al. (2005) Negative regulation of hypoxia inducible factor-1alpha by necdin. *FEBS Lett* 579: 3797-3801.
264. Friedman ER, Fan CM (2007) Separate necdin domains bind ARNT2 and HIF1alpha and repress transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 113-118.
265. Wu X, Levine AJ (1994) p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3602-3606.
266. Kurita M, Kuwajima T, Nishimura I, Yoshikawa K (2006) Necdin downregulates CDC2 expression to attenuate neuronal apoptosis. *J Neurosci* 26: 12003-12013.
267. Konishi Y, Bonni A (2003) The E2F-Cdc2 cell-cycle pathway specifically mediates activity deprivation-induced apoptosis of postmitotic neurons. *J Neurosci* 23: 1649-1658.
268. Young AP, Nagarajan R, Longmore GD (2003) Mechanisms of transcriptional regulation by Rb-E2F segregate by biological pathway. *Oncogene* 22: 7209-7217.
269. Muller H, Bracken AP, Vernell R, Moroni MC, Christians F, et al. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15: 267-285.

270. Nahle Z, Polakoff J, Davuluri RV, McCurrach ME, Jacobson MD, et al. (2002) Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* 4: 859-864.
271. Sciorati C, Touvier T, Buono R, Pessina P, Francois S, et al. (2009) Necdin is expressed in cachectic skeletal muscle to protect fibers from tumor-induced wasting. *J Cell Sci* 122: 1119-1125.
272. Balkwill F (2009) Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 361-371.
273. Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA (1999) Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285: 1390-1393.
274. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, et al. (2004) Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 114: 1299-1307.
275. Kim EJ, Um SJ (2008) SIRT1: roles in aging and cancer. *BMB Rep* 41: 751-756.
276. Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, et al. (2002) Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 21: 2383-2396.
277. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, et al. (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305: 390-392.
278. Davies HD, Leusink GL, McConnell A, Deyell M, Cassidy SB, et al. (2003) Myeloid leukemia in Prader-Willi syndrome. *J Pediatr* 142: 174-178.
279. Gerard M, Hernandez L, Wevrick R, Stewart CL (1999) Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality. *Nat Genet* 23: 199-202.
280. Tsai TF, Armstrong D, Beaudet AL (1999) Necdin-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome. *Nat Genet* 22: 15-16.
281. Muscatelli F, Abrous DN, Massacrier A, Boccaccio I, Le Moal M, et al. (2000) Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral

- alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* 9: 3101-3110.
282. Aizawa T, Maruyama K, Kondo H, Yoshikawa K (1992) Expression of necdin, an embryonal carcinoma-derived nuclear protein, in developing mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 68: 265-274.
283. Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, et al. (2004) Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 64: 5270-5282.
284. Tan AC, Jimeno A, Lin SH, Wheelhouse J, Chan F, et al. (2009) Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. *Mol Oncol* 3: 425-438.
285. Ogawa R, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, et al. (2008) Identification of candidate genes involved in the radiosensitivity of esophageal cancer cells by microarray analysis. *Dis Esophagus* 21: 288-297.
286. Varma RR, Hector SM, Clark K, Greco WR, Hawthorn L, et al. (2005) Gene expression profiling of a clonal isolate of oxaliplatin-resistant ovarian carcinoma cell line A2780/C10. *Oncol Rep* 14: 925-932.
287. Abba MC, Hu Y, Sun H, Drake JA, Gaddis S, et al. (2005) Gene expression signature of estrogen receptor alpha status in breast cancer. *BMC Genomics* 6: 37.
288. Crawford NP, Walker RC, Lukes L, Officewala JS, Williams RW, et al. (2008) The Diasporin Pathway: a tumor progression-related transcriptional network that predicts breast cancer survival. *Clin Exp Metastasis* 25: 357-369.
289. Hu Y, Ippolito JE, Garabedian EM, Humphrey PA, Gordon JI (2002) Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice. *J Biol Chem* 277: 44462-44474.
290. Kuwajima T, Nishimura I, Yoshikawa K (2006) Necdin promotes GABAergic neuron differentiation in cooperation with Dlx homeodomain proteins. *J Neurosci* 26: 5383-5392.

291. Brunelli S, Tagliafico E, De Angelis FG, Tonlorenzi R, Baesso S, et al. (2004) Msx2 and neccin combined activities are required for smooth muscle differentiation in mesoangioblast stem cells. *Circ Res* 94: 1571-1578.
292. Lebel M, Mes-Masson AM (1994) Establishment and characterization of testicular cell lines from MT-PVLT-10 transgenic mice. *Exp Cell Res* 213: 12-19.
293. Lebel M, Mes-Masson AM (1994) Sequence analysis of a novel cDNA which is overexpressed in testicular tumors from polyomavirus large T-antigen transgenic mice. *DNA Seq* 5: 31-39.
294. Bossolasco M, Lebel M, Lemieux N, Mes-Masson AM (1999) The human TDE gene homologue: localization to 20q13.1-13.3 and variable expression in human tumor cell lines and tissue. *Mol Carcinog* 26: 189-200.
295. Bossolasco M, Veillette F, Bertrand R, Mes-Masson AM (2006) Human TDE1, a TDE1/TMS family member, inhibits apoptosis in vitro and stimulates in vivo tumorigenesis. *Oncogene* 25: 4549-4558.
296. Bohnlein E, Gruss P (1986) Interaction of distinct nuclear proteins with sequences controlling the expression of polyomavirus early genes. *Mol Cell Biol* 6: 1401-1411.
297. Dynan WS, Tjian R (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35: 79-87.
298. Deyerle KL, Subramani S (1988) Linker scan analysis of the early regulatory region of human papovavirus BK. *J Virol* 62: 3378-3387.
299. Sun D, Hurley LH (1994) Cooperative bending of the 21-base-pair repeats of the SV40 viral early promoter by human Sp1. *Biochemistry* 33: 9578-9587.
300. Pilon AA, Mes-Masson AM (1996) Polyomavirus large T antigen zinc finger is not required for efficient cellular immortalization of primary rat embryo fibroblasts. *Virus Res* 46: 171-175.

301. Holman PS, Gjoerup OV, Davin T, Schaffhausen BS (1994) Characterization of an immortalizing N-terminal domain of polyomavirus large T antigen. *J Virol* 68: 668-673.
302. Dey D, Dahl J, Cho S, Benjamin TL (2002) Induction and bypass of p53 during productive infection by polyomavirus. *J Virol* 76: 9526-9532.
303. Nygard M, Becker N, Demeneix B, Pettersson K, Bondesson M (2006) Thyroid hormone-mediated negative transcriptional regulation of Necdin expression. *J Mol Endocrinol* 36: 517-530.
304. Kulaeva OI, Draghici S, Tang L, Kraniak JM, Land SJ, et al. (2003) Epigenetic silencing of multiple interferon pathway genes after cellular immortalization. *Oncogene* 22: 4118-4127.
305. McCabe MT, Low JA, Daignault S, Imperiale MJ, Wojno KJ, et al. (2006) Inhibition of DNA methyltransferase activity prevents tumorigenesis in a mouse model of prostate cancer. *Cancer Res* 66: 385-392.
306. McCabe MT, Low JA, Imperiale MJ, Day ML (2006) Human polyomavirus BKV transcriptionally activates DNA methyltransferase 1 through the pRb/E2F pathway. *Oncogene* 25: 2727-2735.
307. Slack A, Cervoni N, Pinard M, Szyf M (1999) DNA methyltransferase is a downstream effector of cellular transformation triggered by simian virus 40 large T antigen. *J Biol Chem* 274: 10105-10112.
308. Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Huang G, et al. (2009) p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* 4: 37-48.
309. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, et al. (2005) DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434: 864-870.
310. Carroll PE, Okuda M, Horn HF, Biddinger P, Stambrook PJ, et al. (1999) Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* 18: 1935-1944.

311. Sidorova JM, Breeden LL (2003) Precocious G1/S transitions and genomic instability: the origin connection. *Mutat Res* 532: 5-19.
312. Jacobs JJ, de Lange T (2004) Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol* 14: 2302-2308.
313. Benanti JA, Galloway DA (2004) Normal human fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *Mol Cell Biol* 24: 2842-2852.
314. Hirao T, Bueno R, Chen CJ, Gordon GJ, Heilig E, et al. (2002) Alterations of the p16(INK4) locus in human malignant mesothelial tumors. *Carcinogenesis* 23: 1127-1130.
315. Dreyling MH, Bullinger L, Ott G, Stilgenbauer S, Muller-Hermelink HK, et al. (1997) Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 57: 4608-4614.
316. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358: 80-83.
317. Florenes VA, Maelandsmo GM, Forus A, Andreassen A, Myklebost O, et al. (1994) MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. *J Natl Cancer Inst* 86: 1297-1302.
318. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, et al. (1990) p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 50: 7717-7722.
319. Mazars R, Pujol P, Maudelonde T, Jeanteur P, Theillet C (1991) p53 mutations in ovarian cancer: a late event? *Oncogene* 6: 1685-1690.
320. Apple SK, Hecht JR, Lewin DN, Jahromi SA, Grody WW, et al. (1999) Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53, and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis. *Hum Pathol* 30: 123-129.

321. Horio Y, Chen A, Rice P, Roth JA, Malkinson AM, et al. (1996) Ki-ras and p53 mutations are early and late events, respectively, in urethane-induced pulmonary carcinogenesis in A/J mice. *Mol Carcinog* 17: 217-223.
322. Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330.
323. Draetta G, Brizuela L, Potashkin J, Beach D (1987) Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2+* and *suc1+*. *Cell* 50: 319-325.
324. Draetta G, Beach D (1988) Activation of *cdc2* protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* 54: 17-26.
325. Furukawa Y, Terui Y, Sakoe K, Ohta M, Saito M (1994) The role of cellular transcription factor E2F in the regulation of *cdc2* mRNA expression and cell cycle control of human hematopoietic cells. *J Biol Chem* 269: 26249-26258.
326. Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-1512.
327. Zhang H, Hannon GJ, Beach D (1994) p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 8: 1750-1758.
328. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, et al. (1997) New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11: 847-862.
329. Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, et al. (1999) The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J* 18: 1571-1583.
330. Gartel AL, Tyner AL (1999) Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* 246: 280-289.
331. Ouellet V, Provencher DM, Maugard CM, Le Page C, Ren F, et al. (2005) Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling. *Oncogene* 24: 4672-4687.

332. Normandin K, Peant B, Le Page C, de Ladurantaye M, Ouellet V, et al. (2010) Protease inhibitor SERPINA1 expression in epithelial ovarian cancer. *Clin Exp Metastasis* 27: 55-69.
333. Sieben NL, Oosting J, Flanagan AM, Prat J, Roemen GM, et al. (2005) Differential gene expression in ovarian tumors reveals Dusp 4 and Serpina 5 as key regulators for benign behavior of serous borderline tumors. *J Clin Oncol* 23: 7257-7264.
334. Nakanishi Y, Kodama J, Yoshinouchi M, Tokumo K, Kamimura S, et al. (1997) The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Pathol* 16: 256-262.
335. Rudlowski C, Pickart AK, Fuhljahn C, Friepoertner T, Schlehe B, et al. (2006) Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer patients: a long-term follow-up. *Int J Gynecol Cancer* 16 Suppl 1: 183-189.
336. Cooper BC, Ritchie JM, Broghammer CL, Coffin J, Sorosky JI, et al. (2002) Preoperative serum vascular endothelial growth factor levels: significance in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 8: 3193-3197.
337. Paley PJ, Staskus KA, Gebhard K, Mohanraj D, Twiggs LB, et al. (1997) Vascular endothelial growth factor expression in early stage ovarian carcinoma. *Cancer* 80: 98-106.
338. Woo MM, Salamanca CM, Miller M, Symowicz J, Leung PC, et al. (2008) Serous borderline ovarian tumors in long-term culture: phenotypic and genotypic distinction from invasive ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Cancer* 18: 1234-1247.
339. Provencher DM, Lounis H, Champoux L, Tetrault M, Manderson EN, et al. (2000) Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36: 357-361.
340. Ouellet V, Zietarska M, Portelance L, Lafontaine J, Madore J, et al. (2008) Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines. *BMC Cancer* 8: 152.

341. Bernardini MQ, Baba T, Lee PS, Barnett JC, Sfakianos GP, et al. (2010) Expression signatures of TP53 mutations in serous ovarian cancers. *BMC Cancer* 10: 237.
342. Culig Z, Bartsch G (2006) Androgen axis in prostate cancer. *J Cell Biochem* 99: 373-381.
343. Eastham JA, Stapleton AM, Gousse AE, Timme TL, Yang G, et al. (1995) Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1: 1111-1118.
344. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Goodrow TL, Palmer JL, et al. (1993) p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85: 1657-1669.
345. Heidenberg HB, Sesterhenn IA, Gaddipati JP, Weghorst CM, Buzard GS, et al. (1995) Alteration of the tumor suppressor gene p53 in a high fraction of hormone refractory prostate cancer. *J Urol* 154: 414-421.
346. Shenk JL, Fisher CJ, Chen SY, Zhou XF, Tillman K, et al. (2001) p53 represses androgen-induced transactivation of prostate-specific antigen by disrupting hAR amino- to carboxyl-terminal interaction. *J Biol Chem* 276: 38472-38479.
347. Sengupta S, Wasylyk B (2004) Physiological and pathological consequences of the interactions of the p53 tumor suppressor with the glucocorticoid, androgen, and estrogen receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1024: 54-71.
348. Alimirah F, Panchanathan R, Chen J, Zhang X, Ho SM, et al. (2007) Expression of androgen receptor is negatively regulated by p53. *Neoplasia* 9: 1152-1159.
349. Eder IE, Culig Z, Ramoner R, Thurnher M, Putz T, et al. (2000) Inhibition of Lncap prostate cancer cells by means of androgen receptor antisense oligonucleotides. *Cancer Gene Ther* 7: 997-1007.
350. Quinn MC, Wilson DJ, Young F, Dempsey AA, Arcand SL, et al. (2009) The chemiluminescence based Zplex automated workstation focus array reproduces ovarian cancer Affymetrix GeneChip expression profiles. *J Transl Med* 7: 55.

ANNEXE I : Figures supplémentaires

Index des figures supplémentaires

Figure supplémentaire 1 La déplétion de Necdin dans des fibroblastes primaires humains augmente leur potentiel prolifératif en faible densité.

Figure supplémentaire 2 Le niveau basal de p21 est affecté par Necdin dans les NIH et NIHLT

Figure supplémentaire 3 Expression de Necdin dans différentes lignées cellulaires du cancer de l'ovaire.

Figure supplémentaire 4 Expression de Necdin dans différentes lignées cellulaires du cancer de la prostate.

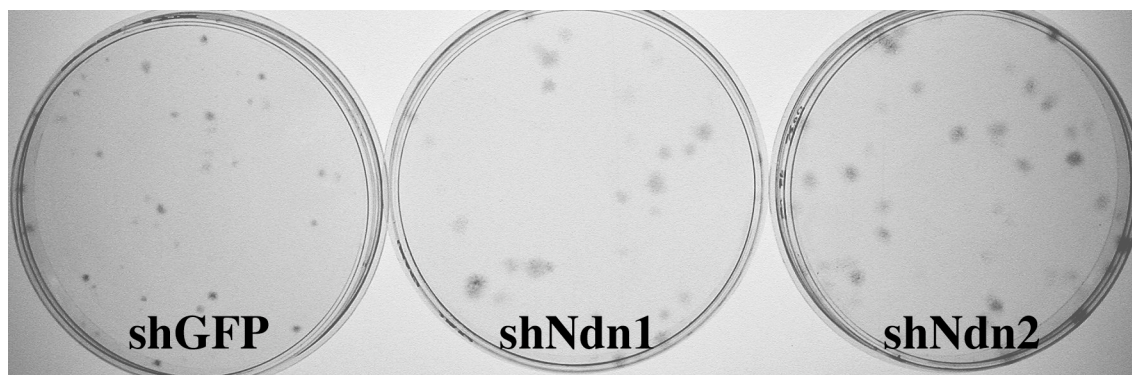


Figure supplémentaire 1 La déplétion de Necdin dans des fibroblastes primaires humains augmente leur potentiel prolifératif en faible densité.

IMR90 infectées avec des lentivirus contenant deux différents shARN ciblant Necdin ou avec le control shGFP. Les colonies ont été fixées et colorées au Crystal violet 12 jours après ensemencement de 100 cellules dans un pétri de 100mm. (Cette figure est tirée de l'expérience de formation de colonies décrite au chapitre IV et correspond aux cellules contrôles non-irradiées dans cet essai).

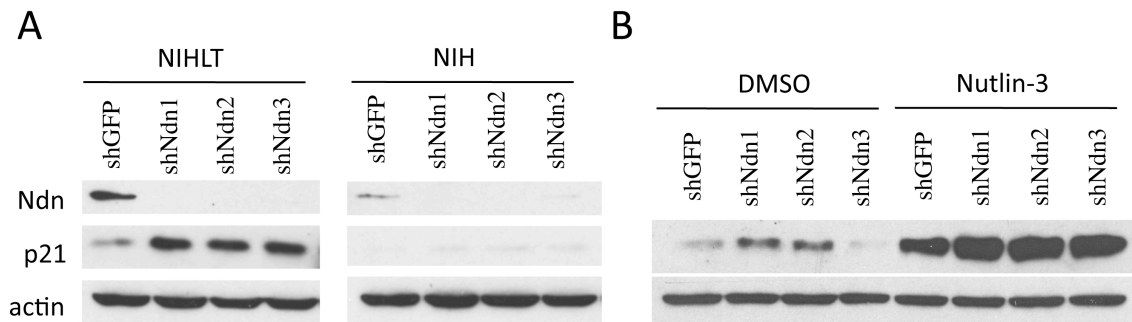


Figure supplémentaire 2 Le niveau basal de p21 est affecté par Necdin dans les NIH et NIHLT

Les populations hétérogènes NIH et NIHLT ont été infectées avec des lentivirus contenant trois différents shARN dirigés contre Necdin ou le shGFP comme contrôle négatif. (A) La figure montre le niveau protéique de Necdin qui est réprimé efficacement par chacun des shARN. Cette répression de Necdin est accompagnée d'une augmentation du niveau basal de p21 principalement visible dans les NIHLT. (B) Ces mêmes cellules (NIHLT) traitées avec la Nutlin-3 (5 μ M) pour une période de 48h permettent de démontrer que, malgré que le niveau de p21 soit plus élevé dans les cellules où Necdin est déplété par shARN, ce niveau est bien en dessous de celui atteint par la stimulation de p53 et qui provoque un arrêt du cycle cellulaire.

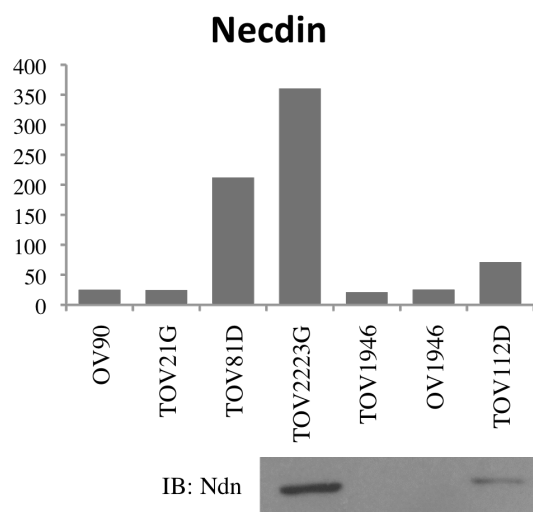


Figure supplémentaire 3 Expression de Necdin dans différentes lignées cellulaires du cancer de l’ovaire.

L’analyse de l’expression génique a été réalisée à partir de la plateforme automatisée Zplex contenant un nombre limité de gènes qui, dans ce cas ci, présente des gènes en relation avec le cancer de l’ovaire ([350] Tonin et Mes-Masson communication personnelle). En bas du graphique montre la corrélation au niveau protéique de l’expression de Necdin pour quatre des lignées cellulaires (en bas du graphique). Une quantité égale de protéines (25ug) a été utilisée pour chacune des lignées.

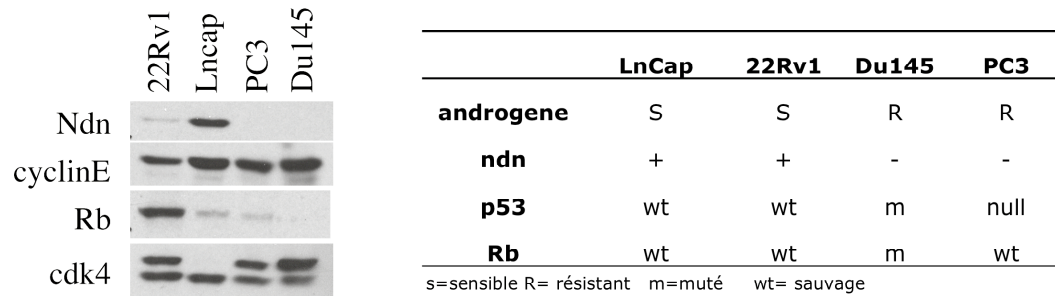


Figure supplémentaire 4 Expression de Necdin dans différentes lignées cellulaires du cancer de la prostate.

Niveau protéique retrouvé dans différentes lignées du cancer de la prostate hormonosensible (22Rv1 et LNCaP) et hormono-réfractaires (PC3 et Du145). À droite, le statut de différents gènes dans ces lignées cellulaires du cancer de la prostate.

ANNEXE II : Signatures des co-auteurs

ANNEXE III : Droits d'auteurs

Index des figures

Figure 1 Le cycle cellulaire et la voie de signalisation de Rb/E2F (adaptation de [22])

Figure 2 La voie de signalisation de p53 (adaptation de [35])

Figure 3 Le locus INK4 est au cœur de la sénescence (adaptation de [103])

Figure 4 Le raccourcissement des télomères détermine la durée de vie des cellules humaines primaires. (adaptation de [128])

Figure 5 Les protéines virales comme outil pour l'inactivation de p53 et Rb (adaptation de [129])

Figure 7 Infection par SV40 et la transformation cellulaire (adaptation de [174])

Figure 9 PyLT lie Rb pour l'inactiver (adaptation de [204])

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 19, 2010

This is a License Agreement between Julie Lafontaine ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2492640077437
License date	Aug 19, 2010
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Cancer
Licensed content title	Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response
Licensed content author	Erik S. Knudsen, Karen E. Knudsen
Volume number	
Issue number	
Pages	
Year of publication	2008
Portion used	Figures / tables
Number of figures / tables	1
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis / Dissertation
Billing Type	Invoice
Company	Julie Lafontaine
Billing Address	
	
Customer reference info	
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 19, 2010

This is a License Agreement between Julie Lafontaine ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2492641052124
License date	Aug 19, 2010
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Cancer
Licensed content title	Rescuing the function of mutant p53
Licensed content author	Alex N. Bullock, Alan R. Fersht
Volume number	
Issue number	
Pages	
Year of publication	2001
Portion used	Figures / tables
Number of figures / tables	1
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis / Dissertation
Billing Type	Invoice
Company	Julie Lafontaine
Billing Address	
Customer reference info	
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 19, 2010

This is a License Agreement between Julie Lafontaine ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2492641438858
License date	Aug 19, 2010
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Cancer
Licensed content title	Senescence, apoptosis and therapy — cutting the lifelines of cancer
Licensed content author	Clemens A. Schmitt
Volume number	
Issue number	
Pages	
Year of publication	2003
Portion used	Figures / tables
Number of figures / tables	1
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis / Dissertation
Billing Type	Invoice
Company	Julie Lafontaine
Billing Address	
Customer reference info	
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Feb 01, 2011

This is a License Agreement between Julie Lafontaine ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2492641223827
License date	Aug 19, 2010
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Cancer
Licensed content title	Milestones in cell division: Cell senescence and cancer
Licensed content author	Nicole F. Mathon, Alison C. Lloyd
Licensed content date	Dec 1, 2001
Type of Use	Thesis / Dissertation
Pages	
Portion used	Figures / tables
Number of figures / tables	1
Requestor type	Student
Details of use	STM signatory
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for,

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 19, 2010

This is a License Agreement between Julie Lafontaine ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2492650095952
License date	Aug 19, 2010
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Cancer
Licensed content title	p53 and E2f: partners in life and death
Licensed content author	Shirley Polager, Doron Ginsberg
Volume number	
Issue number	
Pages	
Year of publication	2009
Portion used	Figures / tables
Number of figures / tables	1
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis / Dissertation
High-res requested	No
Billing Type	Invoice
Company	Julie Lafontaine
Billing Address	
	
Customer reference info	
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 19, 2010

This is a License Agreement between Julie Lafontaine ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2492650220687
License date	Aug 19, 2010
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Cancer
Licensed content title	SV40 and human tumours: myth, association or causality?
Licensed content author	Adi F. Gazdar, Janet S. Butel, Michele Carbone
Volume number	
Issue number	
Pages	
Year of publication	2002
Portion used	Figures / tables
Number of figures / tables	1
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis / Dissertation
Billing Type	Invoice
Company	Julie Lafontaine
Billing Address	
Customer reference info	
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions



Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Aug 23, 2010

This is a License Agreement between Julie Lafontaine ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	2494850751600
License date	Aug 23, 2010
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Molecular Cell Biology
Licensed content title	Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm
Licensed content author	Steven M. Frisch, Joe S. Mymryk
Volume number	
Issue number	
Pages	
Year of publication	2002
Portion used	Figures / tables
Number of figures / tables	1
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis / Dissertation
Billing Type	Invoice
Company	Julie Lafontaine
Billing Address	
	
Customer reference info	
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

