

UNIVERSITE DE NANTES
UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ECOLE DOCTORALE DE BIOLOGIE SANTE

Année 2010

HEF1 et B2, deux cibles moléculaires potentielles dans le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules et leur mécanisme de régulation impliquant les miRNA.

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Cancérologie préclinique

Présentée

et soutenue publiquement par

Marine MALLETER

Le 22 juin 2010, devant le jury ci-dessous

Président **M. ROBERT Jean-Michel**, Professeur, Université de NANTES

Rapporteurs **Mme SERGENT Odile**, Professeur, Université de RENNES
M. CREPIN Michel, Professeur INSERM U553, PARIS

Examineurs **M. GARNIER Cyrille**, Maitre de Conférences, Université de RENNES
Mme JACQUOT Catherine, Maitre de Conférences, Université de
NANTES (co-encadrante)

Directeur de Thèse : **M. ROUSSAKIS Christos** Professeur, Université de NANTES

Sommaire

Sommaire	1
Index des figures	4
Index des tableaux	6
Liste des abréviations	7
Avant – Propos	9
Etude bibliographique	11
Chapitre I. Le cancer	11
I.1- Définition du cancer :	11
I.2- Le cancer conséquence d'une perturbation de la communication cellulaire lors de la carcinogénèse:	11
I.3-Cancer et santé publique :	12
Chapitre II. Les cancers broncho-pulmonaires	15
II.1- Classification	15
II.2- Le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (NSCLC ou CBNPC)	16
II.3- Carcinome broncho-pulmonaire à petites cellules (CBPC)	17
II.4- Classification TNM	17
II.5- Facteurs de risque.	19
II.5.1-Le tabac :	19
II.5.2-L'exposition professionnelle	21
II.5.3-Les pollutions atmosphériques	22
Chapitre III - Gènes impliqués dans le cancer broncho-pulmonaires	23
III.1 - Comment la cigarette peut elle mener au cancer du poumon ?	23
III.2- Les altérations génétiques dans les cancers pulmonaires	23
III.2.1-Les altérations génétiques au niveau au niveau de la prolifération cellulaire :	25
III.2.1.1- Les altérations des suppresseurs de tumeurs et des inhibiteurs de croissance :	25
III.2.1.2 Les altérations génétiques au niveau des suppresseurs de tumeurs RB et cdk inhibiteurs :	29
III.2.1.3-Les altérations génétiques au niveau des suppresseurs de tumeurs dans la région 3p :	30
III.2.1.4-Les altérations génétiques au niveau de la région chromosomique 9p21	32
III.2.1.5 Les altérations génétiques au niveau des oncogènes et les growth-promoting signals:	32
III.2.1.6-Les altérations génétiques au niveau des facteurs de croissance et de leur récepteur :	34
III.2.1.7-Les points de contrôle du cycle cellulaire et réparation de l'ADN.	35
III.2.2- Gènes impliqués dans l'apoptose	35
III.2.2.1 - La voie intrinsèque :	36
III.2.2.2 -Voie extrinsèque	37
III.2.2.3- Liaison entre les deux voies	37
III.2.2.4- Régulation de l'apoptose	38
III.2.3 Les altérations conduisant à la métastase	40
III.2.3.1- Les mutations sur le RB	40
III.2.3.2- Les facteurs angiogènes :	41
III.2.3.4- Les Télomérase :	41
Chapitre IV. Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire	43
IV.1-Le Gène <i>HEF1</i>	43
IV.1.1- Localisation du gène <i>HEF1</i>	43
IV.1.2- La famille de la protéine HEF1 : Protéines Cas	44
IV.1.3 – Les protéines HEF1	48
IV.1.4. - Les fonctions de HEF1	50
IV.1.4.1- Implications dans le cycle et la différenciation cellulaire	50

Sommaire

IV.1.4.2- Implications dans la mitose	51
IV.1.4.3. Implications dans l'apoptose	51
IV.1.4.4- Implication dans la morphologie et la motilité cellulaire	52
IV.2- Le gène B2	53
IV.2.1- L'ARN B2	53
IV.2.2- Les ARN non codants	55
IV.2.2.1 - Les ARNs non codants de grandes tailles	55
IV.2.2.2- Les mi RNA et ARN interférence	59
IV.2.2.2.1- Mécanisme de l'ARNi	60
IV.2.2.2.1.1- Mécanisme de la phase d'initiation	61
IV.2.2.2.1.2- Mécanisme de la phase effectrice : RISC	65
IV.2.2.2.2- Deux mécanismes d'action : dégradation d'ARNm ou inhibition de la traduction	66
IV.3- Mise en situation du sujet de thèse	68
Matériel et méthodes	70
Chapitre I. Approche méthodologique.	70
I.1-Les Lignées cellulaires :	70
I.1.1-La lignée NSCLC-N6	70
I.1.2-La lignée A 549	71
I.1.3- L'entretien des lignées	72
I.1.4-La synchronisation des cellules NSCLC-N6	73
I.2-La molécule cytostatique utilisée A190	73
Chapitre II – Etude des cibles moléculaires	77
II.1-Extraction d'ARN et séparation des ARN cytoplasmiques et nucléaires	77
II.2-Traitement DNase :	78
II.3- La reverse transcription	78
II.4- La Polymérase Chain Reaction (PCR)	79
II.5-La RACE PCR	80
II.5.1-Une reverse transcription spécifique	81
II.5.2-Ajout des résidus C en 3'	82
II.5.3-PCR ancrées	82
II.6-Purification du produit de PCR sur gel d'agarose	83
II.7-Séquençage des fragments réamplifiés après RACE PCR ou PCR .	83
II.7.1-Clonage dans le vecteur pGEMT Easy	84
II.7.2-Extraction d'ADN plasmidique et vérification de la ligation	85
II.7.3-Séquençage	85
II.8-Panel d'ARN	86
II.9- PCR Quantitative ou PCR en temps réel	86
II.10-qRT-PCR des miRNA	89
II.10.1- Etape de polyadénylation :	90
II.10.2- Synthèse du brin complémentaire	91
Chapitre III. Conclusion :	92
Résultats	93
Chapitre I. Identification du gène B2	93
I.1- Caractérisation de la séquence de l'ARN B2	93
I.2-Détermination de l'extrémité 5'	95
I.3- Détermination de l'extrémité 3'	98
I.4- Détermination d'un cadre de lecture éventuel :	98
Chapitre II. Localisation du compartiment cellulaire de l'ARN B2	100
II.1-L'ARN B2 un ARN nucléaire	100
Chapitre III. La localisation tissulaire des gènes <i>HEF1</i> et <i>B2</i>	106
III.1-Localisation par RT-PCR	106
III.2-Localisation par <i>PCR quantitative</i> .	108

Sommaire

Chapitre IV. Les cibles moléculaires <i>B2</i> et <i>HEF1</i> au niveau cellulaire :	110
Chapitre V. L'expression des miRNA dans les cellules NSCLC-N6	113
V.1 -Les différents miRNA retrouvés et isolés chez l'homme	113
V.2 - Les différents miRNA pouvant réguler HEF1	116
<i>Discussion</i>	119
<i>Conclusions et perspectives</i>	127
<i>Références</i>	130
Annexe 1	150
Annexe 2	153
Annexe 3	165
Communications	167
Publications	167

Index des figures

Figure 1. Évolution de la mortalité pour les principales localisations de cancer. _____	13
Figure 2 : Schéma montrant le lien entre les cigarettes, les substances carcinogènes qu'elles contiennent et la survenue du cancer du poumon. Adapté et traduit de Hecht. (Hecht S.S., 1999) _____	23
Figure 3 : Accumulation des altérations dans la progression de la carcinogenèse pulmonaire.._____	25
Figure 4 : Altérations des voies des suppresseurs de tumeurs dans le cancer du poumon. _____	27
Figure 5 : . Mécanisme de l'apoptose: la voie de l'apoptose extrinsèque qui utilise les récepteurs (CD95, TRAIL); et la voie intrinsèque qui utilise la mitochondrie.) _____	36
Figure 6 : Rôle de p53 et p16 dans le raccourcissement des télomères. _____	41
Figure 7 : Localisation du gène <i>HEF1</i> et de l'ARN B2 sur le chromosome 6. _____	44
Figure 8 : Schéma des domaines conservés des protéines Cas _____	45
Figure 9 : Le complexe d'adhérence est une large structure composée de protéines connectées entre elles par leur domaine SH2 ou SH3 (Src homology regions 2 and 3). _____	48
Figure 10: Modifications post-traductionnelles de la protéines p105 ^{HEF1} , intervenant au cours de la mitose et de l'apoptose, et produisant différentes isoformes. _____	49
Figure 11 : Mécanisme du gène <i>HEF1</i> _____	52
Figure 12 : Histogramme représentant l'évolution de l'expression des gènes <i>HEF1</i> et B2 dans les cellules NSCLC-N6 sur 70 heures avec traitement ou non par la molécule cytostatique A190 à 39,4 µM. _____	54
Figure 13 : Structure de l'enzyme Dicer _____	61
Figure 14 : Deux voies de l'ARNi : par les siARN ou par les miARN. _____	62
Figure 15 : Biosynthèse des miARN. _____	64
Figure 16 : Mode d'activation du complexe RISC. _____	66
Figure 17 : Comparaison des mécanismes d'action des siARN et des miRNA. _____	67
Figure 18 : Fonctionnement classique de la machinerie de l'ARN interférence. _____	68
Figure 19 : A droite, observation microscopique (x200) de la lignée NSCLC-N6 en croissance dans le milieu RPMI supplémenté en sérum et antibiotique, fixée sur support solide. _____	71
Figure 20 : Observation microscopique (x200) de la lignée A549 en croissance en milieu RPMI, fixée sur support solide. Extraite d'un site web : http://www.atcc.org/Attachments/1753.jpg . _____	72
Figure 21 : Structure chimique de A190 _____	74
Figure 22 : Cinétiques de croissance discontinues sur cellules traitées par A190 à différentes concentrations réalisées sur les deux lignées de cancer bronchopulmonaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b) _____	75
Figure 23 : Résultats de l'étude en cytofluorimétrie en flux. _____	76
Figure 24 : Technique de race-PCR. _____	81
Figure 25 : Schéma du vecteur pGEMT Easy _____	84
Figure 26: Représentation schématique de l'organisation d'une plaque pour un test de PCR quantitative _____	88

Index des figures

Figure 27 : Les différentes étapes d'une qRT-PCR spécifique des miRNA. _____	90
Figure 28: Schéma représentant la stratégie d'identification de la séquence de B2. _____	94
Figure 29 : Schéma de positionnement des différents exons du gène <i>HEF1</i> et de l'ARN B2. _____	95
Figure 30 : Dernier amplicon obtenu par la technique de marche sur le chromosome. _____	96
Figure 31 : Blast entre la séquence issue de la RACE PCR avec la séquence de l'ADN génomique de <i>HEF1</i> . « query » est la séquence de l'ADN génomique de <i>HEF1</i> et sbjct la séquence obtenue par la RACE PCR. _____	97
Figure 32 : Analyse bio-informatique de la séquence de B2 pour la recherche de cadre de lecture. _____	99
Figure 33 : Profil de migration des ARN nucléaires et cytoplasmique. _____	100
Figure 34 : Stratégie de choix des amorces permettant le contrôle de la bonne séparation des ARN nucléaires et cytoplasmiques _____	101
Figure 35: Profils électrophorétiques après amplification PCR avec les amorces β 2-M-INT et β 2-M-EX. _____	102
Figure 36 : Profil électrophorétique après amplification PCR avec les couples d'amorces B2-EX-1, B2-Si3 _____	104
Figure 37 : Etude de l'expression du gène <i>B2</i> (gris) et <i>HEF1</i> (noir) sur les ARN issus des différents tissus du panel commercial "FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel » (Ambion) par PCR quantitative. _____	109
Figure 38 : Histogramme de l'évolution de l'expression des gènes <i>HEF1</i> dans les cellules NSCLC-N6 de 55 à 65 heures avec traitement ou non par la molécule cytostatique A190 à 39,4 μ M pour NSCLC-N6. _____	111
Figure 39 : Histogramme représentant l'évolution de l'expression de gène B2 dans les cellules NSCLC-N6 de 55 à 65 heures avec traitement ou non par la molécule cytostatique A190 à 39,4 μ M. _____	112
Figure 40 : Les différents miRNA sélectionnées à partir d'une banque de données sont testés par PCR quantitative sur des cellules issues du modèle NSCLC N-6 (L16) synchronisés et traitées (en noir) ou non traitées (en bleu) par la molécule témoin A190 à 39,4 μ M. Le rapport gène d'intérêt / beta actine est effectué. _____	115
Figure 41 : Les différents miRNA potentiels dessinés à partir d'un logiciel en accès libre sur internet sont testés par PCR quantitative sur des cellules issues du modèle NSCLC N-6 (L16) synchronisés et traitées (en noir) ou non traitées (en bleu) par la molécule témoin A190 à 39,4 μ M. Le rapport gène d'intérêt / beta actine est effectué. _____	117

Index des tableaux

<i>Tableau 1 : nombre de décès observé par cancer en 2003 en France.)</i>	14
<i>Tableau 2 : Classification histologique WHO-IASLC des carcinomes bronchiques de 1999</i>	15
<i>Tableau 3 : Classification TNM des cancers broncho-pulmonaires.</i>	18
<i>Tableau 4 : Classification des sous catégories TNM par stade. .</i>	19
<i>Tableau 5 : Risque relatif de cancers du poumon en Europe chez l'homme et la femme.</i>	20
<i>Tableau 6 : Exemple d'ARN non codants de grandes tailles chez l'organisme eucaryote.</i>	58
<i>Tableau 7 : Séquences des amorces antisens pour la technique de RACE PCR sur l'extrémité 5'.</i>	80
<i>Tableau 8 : Amorces utilisées par PCR quantitative pour les gènes HEF1 et B2</i>	88
<i>Tableau 9 : Amorces utilisées pour la localisation cellulaire de B2 et leurs caractéristiques.</i>	104
<i>Tableau 9 bis: Amorces spécifiques de B2 et HEF1</i>	107
<i>Tableau 10 : Amplification des gènes B2 et HEF1 dans les ARNs de différents tissus</i>	107
<i>Tableau 11: Les différents Hsa sélectionnés et testés par PCR quantitative..</i>	114
<i>Tableau 12 : Les miRNA potentiels issus de B2 pouvant agir sur les exons du gène HEF1.</i>	116

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AR : Amphi-Regulin
ARN : Acide ribonucléique
ARNdb : ARN double brin
ARNnc : ARN non codant
ATM : « Ataxia Télangiectasia mutated »
ATP : Adénosine Triphosphate
Bcl-2 : « B cell lymphoma 2 »
BET : Bromure d'ETHidium
CB : Cancer Bronchique
CBPC : Cancer Bronchopulmonaire à Petites Cellules
CBNPC : Cancer Bronchopulmonaire Non à Petites Cellules
CDK : Cycline dépendante de kinase
CI50 : Concentration inhibitrice 50%
CKI : Inhibiteur de CDK
CKS : Cycline Kinase Sub-units
DD : Death Domain
DED : Death Effector Domain
DM : chromosome Double Minutes
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
ECM : Extra Cellular Matrice
EGF : "Epidermal Growth Factor"
ERBB : "ErythroBlastose aviare B"
FADD : "Fas Associated Death Domain"
FAK : "Focale Adhésion Kinase "
GADD : "Growth Arrest and DNA Damage"
GDP : Guanosine Di-Phosphate
GST : Gène suppresseur de tumeur
GTP : Guanosine Tri-Phosphate
HDM2 : « Human Double Minute 2 »
HEF1 : « Homo sapiens Enhancer Filamentation 1 »
IAP : Protéine Inhibitrice de l'Apoptose
IGF2 : "Insulin Growth Factor 2"
IL : InterLeukine
INF : Interféron
IPTG : Isopropylthio-β-D-Galactosidase
JNK : "Jun N-terminal protein Kinase"
MDR : « Multidrug résistance »
miRNA : Micro RNA
MMLV-RT : "Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase"
NEDD9 : "Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated 9"
NCI : « National Cancer Institute »

Liste des abréviations

NSCLC : Non Small Cell lung Cancer
NSCLC-N6 : lignée cellulaire Cancer bronchopulmonaire non à petites cellules patient 6
ODN : Oligodésoxynucléotide
ORF : « Open Reading Frame »
pb : paire de base
PBS : « Phosphate Buffered Saline »
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PTPC : Complexe de pore à perméabilité transitoire
RACE : « Rapid Amplification of cDNA Ends »
RB: protéine du RB
REG : Réticulum endoplasmique granuleux
REL : Réticulum endoplasmique lisse
RNAi : ARN interférent
Rnase : Ribonucléase
RPM : Rotation par minute
RPMI : « Rosewell Park Memorial Institute »
RT-PCR: “Reverse-Transcriptase-PCR”
SCLC : Small Cells Lung Cancer
SH2/3 : Src homology regions 2 ou 3
SIMP : Protéine mitochondriale inter-membranaire soluble
SSH : Hybridation soustractive suppressive
Taq Polymérase : *Thermus aquaticus* polymérase
TGF : « Transforming Growth Factor »
TKI : Inhibiteur de tyrosine kinase
TNF : Tumor necrosis factor
Waf1: “Wild type p53 Associated Fragment 1”

Avant – Propos

Le cancer était une maladie encore rare au début du 20^{ème} siècle. Pourtant le cancer du poumon est à l'origine de plus de 6 % des décès en France actuellement. Il se place même au premier rang des décès par cancer alors que la France est considérée comme un pays à risque moyen parmi les pays occidentaux. Le cancer du poumon représente également la première cause de mortalité par cancer au niveau mondial, avec plus d'un million de décès dans le monde par an. Pour la mortalité comme pour l'incidence, la part masculine reste prédominante dans la plupart des pays du monde (80 % à 85 % des cas ou des décès). La découverte de nouveaux traitements anticancéreux toujours plus efficaces et spécifiques, est donc primordiale. (Perol M. R.G., 2007)

Malheureusement aujourd'hui, les moyens thérapeutiques dont disposent les cliniciens pour combattre ces cancers, ne sont pas suffisants. Les récents progrès de la recherche en chimiothérapie et la découverte de nouvelles molécules ont permis de mettre en place de nouveaux protocoles certes plus efficaces, mais qui restent encore bien insuffisants. De plus, le cancer broncho-pulmonaire est confronté à d'autres problèmes comme la forte toxicité des drogues, leur manque de spécificité et la résistance aux traitements de chimiothérapie. Dans ce contexte, les biologistes et les cliniciens tentent d'élaborer des traitements moins toxiques et plus spécifiques des cellules tumorales.

Ainsi l'une des stratégies utilisées consiste en la découverte de nouveaux composés antiprolifératifs. Cette investigation passe par l'étude d'un grand nombre de composés chimiques (le screening) sur lignées cellulaires cancéreuses, ici NSCLC-N6 et A549. Ces composés peuvent avoir des origines diverses allant du milieu naturel à la chimie de synthèse ou aux biotechnologies. Dans cet objectif, nous avons utilisé une molécule issue de la chimie de synthèse (A190). Cette molécule est une triazine sélectionnée, parmi près de 200 analogues, grâce à des tests *in vitro* effectués par le laboratoire préalablement. (Moreau D. and al., 2008)

L'activité très spécifique engendrée par un composé doit aujourd'hui tenter de cibler spécifiquement les mécanismes de proliférations des cellules cancéreuses. Il nous faut donc découvrir des principes actifs capables de pharmaco-moduler des gènes indispensables à la survie et à la croissance de la cellule cancéreuse. C'est pourquoi les recherches menées ici visent à décrire les

mécanismes génomiques impliqués dans l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses et la relation entre les cibles impliquées.

La découverte et la sélection de nouvelles molécules intéressantes passent ainsi par la comparaison des pools ARN de cellules traitées et de cellules témoins. Il est ainsi possible de mettre en évidence une variation de l'expression génique, quelle soit positive ou négative, induite par le traitement des cellules cancéreuses par cette molécule potentiellement intéressante.

La compréhension de la modulation d'une cible passe alors par l'étude de son implication dans le cycle cellulaire et par l'analyse la plus détaillée possible de sa modulation. Différentes techniques de biologie moléculaire entrent alors en jeu pour sélectionner un gène puis étudier sa régulation au niveau de la transcription puis de la traduction. C'est ainsi qu'au cours de différents travaux au sein du laboratoire deux cibles particulières ont pu être identifiées par RT-Differential display : le gène *HEF1* et l'ARN B2 non codant.

Il paraît donc important de comprendre la relation et élucider le mécanisme qui lie le gène *HEF1* et *B2* et vérifier que *B2* passe par le mécanisme des miRNA pour réguler le gène *HEF1* et d'autres gènes.

Etude bibliographique

Chapitre I. Le cancer

I.1- Définition du cancer :

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormale au sein d'un tissu normal de l'organisme. Ces cellules anormales dérivent toutes d'un même clone nommée cellule initiatrice du cancer. Cette cellule initiatrice a acquis certaines caractéristiques comme la capacité de se diviser indéfiniment qui conduit à terme à une extension progressive de la tumeur à tout l'organisme par l'intermédiaire de métastases.

I.2- Le cancer conséquence d'une perturbation de la communication cellulaire lors de la carcinogénèse :

Dans l'organisme, il y a sans cesse un renouvellement cellulaire qui est assuré par la naissance et la mort de cellules qui forme un état dynamique dit aussi homéostasie. Ainsi le cancer est une conséquence d'un déséquilibre entre les différents mécanismes qui régulent l'état dynamique de la cellule. (May G.H. and al., 1998) Au cours de la vie d'une cellule normale, elle doit répondre à des signaux de prolifération et de différenciation mais aussi de mort cellulaire programmée (Vaux D.L., 1999) . Ces étapes cellulaires sont parfois utiles ou dangereuses lorsqu'elles deviennent anarchiques d'où la nécessité d'avoir des mécanismes de régulations au sein même de la cellule. L'accumulation de plusieurs anomalies sur différents gènes au cours des divisions cellulaires conduisent à l'apparition d'une tumeur qui va alors échapper progressivement à tous les contrôles cellulaires. Le cancer est donc bien une conséquence de la perturbation de la communication cellulaire caractérisée par une prolifération anarchique de la cellule, une perte de la différenciation et l'absence de mort cellulaire programmée. Ainsi sans traitement, cette prolifération aboutit à un envahissement des tissus environnants et conduit à la mort de l'individu.

La carcinogénèse décrit tous les mécanismes et les facteurs impliqués dans la transformation de la cellule. Plusieurs types d'inducteurs et de nombreuses étapes sont en cause dans la cancérisation d'une cellule saine (Yokota S. and al., 2000) et résulte d'une accumulation successive de mutations dans le patrimoine génétique de ces cellules.

Première étape : L'initiation.

L'initiation est due aux premières mutations génétiques irréversibles de la cellule qui vont se transmettre aux cellules filles du fait d'une lésion définitive de l'ADN. En général, les mécanismes de réparation de l'ADN interviennent pour empêcher la transmission d'un matériel génétique altéré. Au moment de l'initiation, ces mécanismes sont inopérants car altérés. Il apparaît alors les cellules initiées qui ne sont pas encore des cellules tumorales. Elles n'ont pas acquis une autonomie de croissance. Il est tout de même possible de les distinguer morphologiquement des autres cellules non initiées.

La 2eme phase : La promotion

C'est l'expansion clonale des cellules initiées qui manifeste en général un taux de croissance accrue. La prolifération de telles cellules va faciliter l'apparition de mutations supplémentaires directement proportionnelles au taux de division et accélèrent la conversion.

La 3eme phase : La conversion est l'étape qui provoque la transformation proprement dite de cellules pré-néoplasiques en cellules malignes : elle résulte de mutations complémentaires

La 4eme phase : La progression : elle permet d'augmenter l'agressivité de cellules déjà transformées. (Yokota S. and al., 2000)

I.3-Cancer et santé publique :

En 2003, le nombre de décès par cancer en France a été de 147 000, 88 000 chez l'homme et 59 000 chez la femme. La mortalité diminue depuis 1987 chez l'homme et depuis la fin des années 1960 chez la femme, la diminution étant plus importante chez l'homme que chez la femme. (Hill C. and al., 2006)

Chez l'homme, la mortalité par cancer diminue pour chacune des localisations principales selon le bulletin du cancer. Depuis 1993, la mortalité par cancer du poumon a diminué d'environ 10 % en 10 ans. Cette diminution peut s'expliquer par une baisse de la consommation de tabac observée depuis 1980. La mortalité par cancer de la bouche, du pharynx du larynx et de l'œsophage diminue fortement depuis 1976, la baisse est de plus de 50 % en 27 ans, expliquée par une diminution de la consommation d'alcool régulière depuis 1950 et, la diminution de la consommation de tabac. La diminution de la mortalité par cancer colorectal et par cancer de la prostate est probablement due à un diagnostic plus précoce et à une amélioration des traitements

Etude bibliographique : Le cancer

de ces cancers. La diminution de la mortalité par cancer de l'estomac s'explique par une meilleure maîtrise des infections bactériennes.

Chez la femme, la mortalité diminue pour l'ensemble des cancers excepté pour le poumon ou le nombre de cancers est en nette augmentation ; celle-ci augmente de plus de 50 % en 10 ans. Cette augmentation correspond à l'entrée des femmes dans le tabagisme à partir des années 1960. La consommation du tabac chez les femmes a en effet considérablement augmenté entre 1960 et le début des années 1990. Depuis, elle s'est stabilisée. La généralisation des mammographies de dépistage et l'amélioration des traitements ont permis une diminution considérable (11%) de la mortalité par cancer du sein en 10 ans. L'ensemble des diminutions de mortalité par cancers sont donc dus à une meilleure prévention et une nette amélioration des traitements. Toutefois, il est important de noter que le cancer du poumon reste la première cause de mortalité par cancer notamment pour les hommes. En ce qui concerne les femmes il se place à la 3ème place de la cause de mortalité par cancer. (Hill C. and al., 2006) (Cf. Tableau 1 et Figure 1).

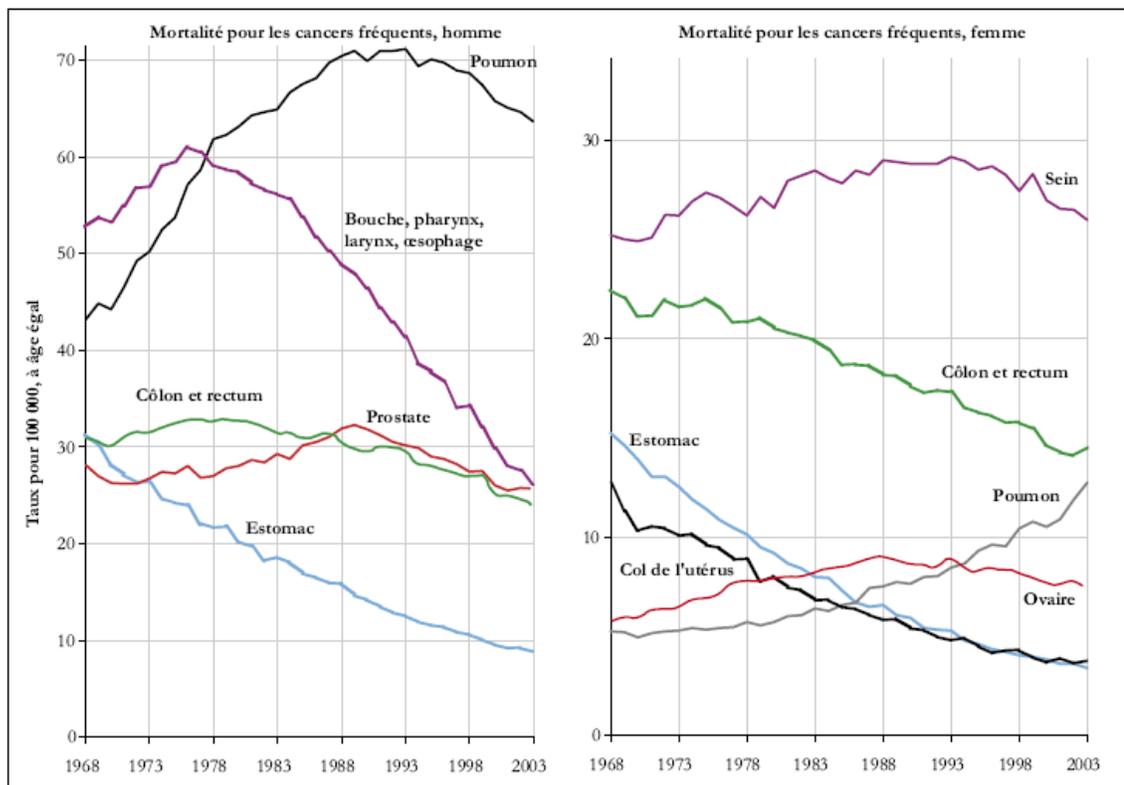


Figure 1. Évolution de la mortalité pour les principales localisations de cancer. Attention les échelles sont différentes dans les deux graphiques, le rapport des échelles est égal au sex-ratio pour l'ensemble des cancers en 2003, soit 2,1 en France. (Hill C. and al., 2006).

Etude bibliographique : Le cancer

Tableau 1 : nombre de décès observé par cancer en 2003 en France. (Hill C.and al., 2006)

Localisation	Décès hommes	Décès femmes
Bouche, pharynx et larynx	5041	858
œsophage	3332	676
Estomac	3050	1810
Colon et rectum	8568	7870
foie	5271	1820
vésicule	557	831
Pancréas	3900	3531
Poumon	20 996	5218
Mélanome	759	673
Peau non mélanome	293	259
Mésothéliome	611	184
Sein	185	11127
Col utérin		1540
Endomètre		1444
Utérus : col et corps		2984
Ovaire		3247
Prostate	9448	
Testicule	97	
Vessie	3471	1083
Rein ou urinaire autre et sans précision	2401	1317
Encéphale et autres parties du système nerveux central	1677	1351
Thyroïde	129	250
Lymphome non hodgkinien	2261	1991
Hodgkin	162	117
Myélome	1179	1289
Leucémies	2886	2450
Autres	11852	5094
Tous cancers	88126	59014

Chapitre II. Les cancers broncho-pulmonaires

II.1- Classification

Elle est obtenue à partir des critères histopathologiques déterminés sur l'aspect microscopiques des tumeurs. La classification de référence est établie par l'O.M.S (Organisation Mondiale de la Santé) en 1967. La dernière publiée date de 1999 et fut actualisée en 2004. Il s'agit de la troisième. Cette classification fondée sur les critères morphologiques en microscopie optique peut être complétées par une étude immuno-histochimique. Les tumeurs bronchiques primitives sont souvent hétérogènes avec la présence au sein de la même tumeur de plusieurs différenciations cellulaires qui peuvent ne pas être vues au sein d'une biopsie bronchique de petite taille. (Perol M. R.G., 2007)

Tableau 2 : Classification histologique WHO-IASLC des carcinomes bronchiques de 1999 (Perol M. R.G., 2007)

Classification histologiques WHO-IASLC des carcinomes bronchiques de 1999

- 1 Tumeurs épithéliales bénignes
 - Papillomes
 - Adénomes
 - 2 Lésions pré-invasives
 - Dysplasie/ carcinome in situ
 - Hyperplasie atypique adénomateuse
 - Hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique
 - 3 Tumeurs malignes
 - Carcinome épidermoïde
 - Carcinome à petite cellule
 - Adénocarcinome
 - Carcinome à grande cellule
 - Carcinome adénosquameux
 - Carcinome pléomorphe, sarcomatoïde, ou avec éléments sarcomateux
 - Tumeur carcinoïde
 - Carcinome de type glande salivaire
 - Carcinome non classable
-

II.2- Le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (NSCLC ou CBNPC)

Ce type de cancer est regroupé dans les groupes histologiques du Tableau 2. Les cancers bronchiques non à petites cellules ont une origine malpighienne, un temps de doublement lent de l'ordre de quelques mois. Ils sont peu sensibles aux cytotoxiques, le traitement curatif reposant sur la chirurgie (Mabry M. and al., 1991) . Il existe trois grands groupes de NSCLC :

Le carcinome épidermoïde représente 40 à 50% des cancers pulmonaires. Sa présence est liée aux habitudes tabagiques. Il prend généralement naissance au niveau des grosses bronches. Son évolution est lente par rapport aux autres cancers bronchiques et peut aboutir à des nécroses ou à l'obstruction complète des bronches. Des métastases délocalisées entraînant des récives après exérèse sont fréquemment retrouvées. Il est possible de distinguer 3 sous-types de NSCLC : les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules. (Perol M. R.G., 2007)

L'adénocarcinome représente 20% des cancers broncho-pulmonaires. Ces cancers sont localisés au niveau des bronches périphériques ou bronches de plus gros calibres. Ils sont inégalement indifférenciés.

Ces 25 dernières années, la proportion d'adénocarcinome a augmenté chez les hommes (10 à 23 %) comme chez les femmes (32 à 43 %) aux dépens de la proportion de carcinomes épidermoïdes et de carcinome à grandes cellules. (Perol M. R.G., 2007) Cette augmentation est certainement la cause d'une plus grande consommation de tabac sur cette période.

Le carcinome anaplasique indifférencié à grandes cellules représente 5% des cancers broncho-pulmonaires. Il a un comportement proche des adénocarcinomes, le mélange des différents tissus est possible mais sous une forme très peu différenciée. Les cellules peuvent être claires, de tailles géantes et parfois contenir des substances mucoïdes.

En fonction du stade, les NSCLC peuvent être traités par chirurgie, par radiothérapie ou par chimiothérapie, ou par une combinaison de ces modalités thérapeutiques. (Perol M. R.G., 2007) Malheureusement, les taux de survie sont médiocres puisqu'ils sont de l'ordre de 42 % de survie dans l'année qui suit le diagnostic et de l'ordre de 10 % sur une période de 5 ans en Europe.

II.3- Carcinome broncho-pulmonaire à petites cellules (CBPC ou SCLC)

Contrairement aux NSCLC les SCLC constituent une entité quasi homogène ou la proportion s'est plus nettement élevée chez les femmes que chez les hommes. Cette augmentation a concerné principalement les patients de plus de 55 ans. Les SCLC appartiennent à un ensemble de carcinomes à différenciation neuroendocrine. Les SCLC apparaissent comme des tumeurs très agressives, le plus souvent découvertes à des stades métastatiques ; elles sont chimio-sensibles, mais la rémission est le plus fréquemment de courte durée et le taux de survie à 30 mois est d'environ 5 %. La survie est fonction du stade, elle est meilleure à 5 ans que pour les NSCLC (de 17 % à 60 %). (Perol M. R.G., 2007)

II.4- Classification TNM

Le système de classification TNM de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) est le mode de classification le plus communément utilisé. Elle est présentée dans de 2 tableaux (Tableau 3 et 4) Le tableau 3 est la classification TNM des cancers broncho-pulmonaires qui décrit la taille et situe l'emplacement de la tumeur. Cette classification apprécie l'extension tumorale (T), ganglionnaires (N) et métastatiques (M). Le tableau 4 représente la classification TNM selon les stades du cancer (Mountain C.F., 2000)

Etude bibliographique : Les cancers broncho-pulmonaires

Tableau 3 : Classification TNM des cancers broncho-pulmonaires. (Perol M. R.G., 2007)

Tumeur primitive	
TX	Tumeur primitive ne pouvant être évaluée ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les crachats ou les sécrétions bronchopulmonaires mais non visibles aux examens radiologiques et endoscopiques.
TO	Pas de tumeur primitive retrouvée.
Tis	Carcinome <i>in situ</i> .
T1	Tumeur de 3 cm ou moins dans sa plus grande dimension, entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale, sans signe d'envahissement plus proximal que la bronche lobaire (c.-à-d. pas dans la bronche souche).
T2	Tumeur ayant l'une des caractéristiques de taille ou d'extension suivantes : plus de 3 cm dans son plus grand diamètre, atteinte de la bronche souche, à 2 cm ou plus de distance de la carène, envahissement de la plèvre viscérale, associée à une atelectasie ou à une pneumopathie obstructive qui s'étend à la région hilare mais pas à l'ensemble du poumon.
T3	Tumeur quelle que soit sa taille avec extension directe soit à la paroi thoracique (y compris les tumeurs de l'apex), au diaphragme, à la plèvre médiastinale ou au feuillet pariétal du péricarde; ou tumeur de la bronche souche située à moins de 2 cm de la carène sans l'envahir; ou associée à une atelectasie ou à une pneumopathie obstructive intéressant l'ensemble du poumon.
T4	Tumeur quelle que soit sa taille envahissant soit le médiastin, le coeur, les gros vaisseaux, la trachée, l'oesophage, le corps vertébral, la carène; nodule(s) satellite(s) séparé(s) dans le même lobe; tumeur associée à un épanchement pleural malin.
NX	Atteinte ganglionnaire régionale ne pouvant être établie.
N1	Métastases aux ganglions péribronchiques ou hilaires homolatéraux, y compris par extension directe.
N2	Métastases aux ganglions médiastinaux homolatéraux ou sous-carénaires.
N3	Métastases dans les ganglions médiastinaux controlatéraux, les ganglions hilaires contro-latéraux, les ganglions scalènes homolatéraux ou controlatéraux, ou les ganglions sus-claviculaires.
Métastase à distance	
MX	Atteinte métastatique ne pouvant être établie.
M0	Aucune métastase à distance.
M1	Métastases à distance, y compris nodule(s) dans un autre lobe (homolatéral ou controlatéral).

Etude bibliographique : Les cancers broncho-pulmonaires

Tableau 4 : Classification des sous catégories TNM par stade. (Perol M. R.G., 2007) .

Stades	Classification TNM		
Cancer occulte	TX	NO	MO
Stade 0	Tis	NO	MO
Stade 1A	T1	NO	MO
Stade 1B	T2	NO	MO
Stade 11A	T1	N1	MO
Stade 11B	T2	N1	MO
	T3	NO	MO
Stade 111A	T1	N2	MO
	T2	N2	MO
	T3	N1, N2	MO
Stade 111B	T1-4	N3	MO
	T4	NO-3	MO
Stade IV	T1-4	NO-3	M1

II.5- Facteurs de risque.

II.5.1-Le tabac :

La pandémie actuelle de cancers bronchiques a suivi l'introduction des cigarettes manufacturées. La relation directe entre la consommation tabagique et le développement d'un cancer bronchique, suggérée dès les années 1930 en raison de la présence des goudrons dans la fumée de cigarettes, a été prouvée dès 1950 par 2 grandes études épidémiologiques, avec un risque relatif de survenue de cancer bronchique actuellement de 23,9 chez l'homme fumeur et de 8,7 chez la femme fumeuse. Il est estimé alors que 91% des cancers bronchiques chez l'homme et 57% chez la femme sont attribuables au tabac. (Doll R.and al., 1952, Wynder E.L.and al., 1950) Il existe une relation dose effet démontrée avec :

- le nombre de cigarettes fumées par jour
- avec la durée de l'exposition au tabagisme (un doublement de la durée du tabagisme multiplie le risque de cancer bronchique par 20)
- l'intensité de l'inhalation
- l'âge de début du tabagisme

Etude bibliographique : Les cancers broncho-pulmonaires

Mais il existe aussi une influence du type de tabagisme. En effet, le risque de cancer bronchique est moins élevé chez les fumeurs de cigares, de pipes que chez les fumeurs de cigarettes, mais le risque de cancer ORL reste majeur. Par ailleurs, l'utilisation de cigarettes dites légères ou avec filtres en raison de leur plus faible teneur en nicotine, entraîne des inhalations plus volumineuses et plus profondes de fumées et, de ce fait, serait à l'origine de la modification de la répartition des types histologiques, avec une augmentation de la fréquence des adénocarcinomes qui sont plus volontiers périphériques (Cf. Tableau 5). (Christiani D.C., 2000)

Tableau 5 : Risque relatif de cancers du poumon en Europe chez l'homme et la femme. (Tyczynski J.E. and al., 2003)

	Homme		Femme	
	Epidermoïde +CBPC	Adénocarcinome	Epidermoïde +CBPC	Adénocarcinome
Non fumeur	1	1	1	1
Ex-fumeur	16,2*	3,5*	3,8*	1,1*
Fumeur actuel	57,9*	8,0*	18,2*	4,1*

* p<0.05

Le risque carcinogène broncho-pulmonaire du tabac est apparu supérieur chez la femme par rapport à l'homme aux états unis. Cette donnée n'a pas été confirmée en Europe. L'adénocarcinome est plus habituel chez la femme. (Kreuzer M. and al., 2000, Prescott E. and al., 1998) Par ailleurs, le tabagisme passif majore de 15 à 25 % le risque de cancer bronchique par rapport au risque du non fumeur. Le courant secondaire de la fumée de tabac contient une concentration plus élevée de produits toxiques. (Cf. Tableau 5) (Tredaniel J. and al., 2006, Zhong W.Z. and al., 2000)

II.5.2-L'exposition professionnelle

Nous avons vu précédemment que le tabac engendre des cancers bronchiques mais il n'est pas le seul. En effet, les facteurs professionnels existent aussi dont les plus connus sont l'exposition à l'amiante et au radon

Le radon est un gaz inerte provenant de la décomposition de l'uranium en différentes particules ionisantes. L'exposition naturelle au radon concerne surtout les mineurs des exploitations d'uranium qui se retrouve avec un risque multiplié par 12 de mourir d'un cancer du poumon. (Baysson H. and al., 2005, Jostes R.F., 1996)

Les risques liés à l'exposition à l'amiante demeurent dans l'inhalation des fibres qui sont toutes potentiellement carcinogènes. Les cancers bronchiques induits par une exposition à l'amiante sont particulièrement long à se déclencher de 25 à 30 ans. (Alberg A.J. and al., 2003) . Récemment, l'institut de veille sanitaire a estimé que 12 % des cancers du poumon des hommes de plus de 55 ans et environ 7 % de ceux de 35 à 55 ans peuvent être attribué à une exposition à l'amiante. Cependant il existe d'autres facteurs professionnels qui sont :

- **Acide chromique et chromates** : Les ouvriers travaillant au chromage, au tannage, à la production de pigments ou les soudeurs à l'arc utilisant une électrode enrobée sont exposés au risque de cancer bronchique.

- **Les hydrocarbures** provenant du charbon et du pétrole ont été impliqués dans le développement du cancer bronchique chez les ouvriers d'usines chimiques, les imprimeurs, les couvreurs, les travailleurs du goudron. L'exposition aux huiles minérales (utilisées pour lubrifier les tours et les axes) et aux suies est aussi à l'origine de cancers bronchiques.

- **Vapeurs arsenicales** : L'exposition professionnelle concerne les mineurs, les fondeurs de minerai et les ouvriers travaillant dans la production et l'utilisation de pesticides. L'excès de cancers bronchiques porte essentiellement sur le type adénocarcinome et le risque relatif serait proche de 7.

- **Nickel** : Les cancers des bronches (et de la muqueuse nasale) sont plus fréquents chez les ouvriers travaillant à l'affinage, au frittage et à l'extraction.

- **Bis-chlorométhyl-ether** : Ces substances sont largement employées comme intermédiaires dans les synthèses organiques et dans la préparation de résines échangeuses d'ions. L'augmentation du risque porte sur le cancer broncho-pulmonaire à petites cellules.

- **Le gaz moutarde** : La production des gaz toxiques pendant la première guerre mondiale a été à l'origine d'une augmentation de l'incidence des cancers bronchiques spécialement dans la trachée et les bronches souches. Les types histologiques concernés sont les cancers épidermoïdes et les cancers indifférenciés à grandes cellules.

II.5.3-Les pollutions atmosphériques

Son rôle dans la genèse des cancers bronchiques est considéré comme probable, notamment en raison de l'incidence plus élevée du cancer bronchique dans les régions urbaines et industrielles. Sa place reste difficile à mesurer entre le rôle possible du dioxyde de soufre et des oxydes de fer et le rôle de certains benzopyrènes. (Vineis P. and al., 2005) Il reste à noter que les radiations ionisantes naturelles provenant principalement de la désintégration naturelle de l'uranium contenu dans les sous sols granitiques et volcaniques en gaz radon 222 sont responsables d'un risque accru chez les femmes travaillant dans les mines d'uranium. (Baysson H. and al., 2005)

Il apparaît clairement que le tabac est la première cause de cancer du poumon voyons donc à travers cet exemple le mécanisme impliqué et ses gènes lors d'un développement du cancer.

Chapitre III - Gènes impliqués dans le cancer broncho-pulmonaires

III.1 - Comment la cigarette peut elle mener au cancer du poumon ?

La fumée de la cigarette apporte dans les poumons un certain nombre de substances carcinogènes, dont des Hydrocarbures Aromatiques polycycliques (HAP) et des N-nitrosamines telle que la NNK. Ces substances sont activées métaboliquement dans les cellules pulmonaires et induisent des interactions avec l'ADN causant des dommages. La cellule possède différents systèmes de détoxification (excrétion), de réparation des dommages, d'élimination des cellules anormales (apoptose) qui lui permettent de prévenir la transformation maligne. Cependant lorsque les causes (c'est-à-dire ici la fumée) persistent et que les cellules répliquent un ADN endommagé, il y a risque de mutations, c'est-à-dire de changements dans la séquence d'ADN de gènes impliqués notamment dans le maintien de l'intégrité du génome et le contrôle du cycle cellulaire. (Cf. Figure 2)

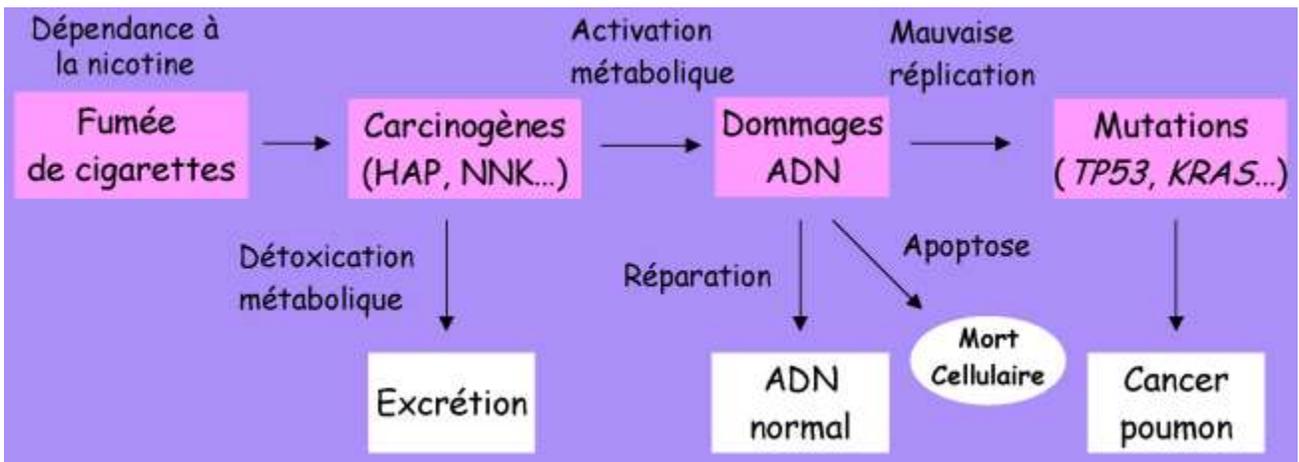


Figure 2 : Schéma montrant le lien entre les cigarettes, les substances carcinogènes qu'elles contiennent et la survenue du cancer du poumon. Adapté et traduit de Hecht. (Hecht S.S., 1999)

III.2- Les altérations génétiques dans les cancers pulmonaires

Les principales anomalies moléculaires qui ont été associées au développement du cancer du poumon se rangent dans les catégories suivantes (Osada H. and al., 2002) :

Mutation ponctuelle

Dans une séquence codante pour un proto-oncogène aboutissant à une modification fonctionnelle de l'oncoprotéine. Les mutations faux-sens entraînent la substitution d'un acide aminé

par un autre. Elles sont capables d'activer des proto-oncogènes en oncogènes, en touchant par exemple un site catalytique ou en entraînant une activation substitutive de la protéine.

Délétion

Les délétions, qui aboutissent le plus souvent à une perte de fonction, peuvent parfois entraîner une activation ou une inhibition anormale de certains gènes, si elles touchent une région régulatrice. *Exemple* : l'activation du proto-oncogène *Erb B* qui code pour le récepteur à l'EGF peut résulter de la délétion de la partie extra-membranaire et le domaine kinase intra cytoplasmique est alors actif de façon constitutive.

Réarrangement structural

Des altérations chromosomiques (translocations, inversions...) peuvent avoir pour conséquence moléculaire la formation d'un gène hybride généré par la fusion de régions codantes entraînant la synthèse de protéines chimériques non fonctionnelles. *Exemple* : Les translocations t (2 ; 13) (q35 ; q14) et t (1 ; 13) (p36 ; q14) sont constamment observées dans les rhabdomyosarcomes alvéolaires.

Amplification génique

L'amplification correspond à une augmentation anormale du nombre de copies du gène dans la cellule, les copies surnuméraires se trouvant alors, soit sous forme intégrée dans un chromosome, soit sous forme de mini-chromosomes surnuméraires, les chromosomes double-minute (DM). Cette amplification entraîne généralement une augmentation du niveau de l'expression du gène. *Exemple* : Les proto-oncogènes *C-MYC* et *N-MYC* sont souvent amplifiés dans les tumeurs solides.

Dérégulation de l'expression, stabilisation d'un ARNm codant pour une oncoprotéine

Les proto-oncogènes, lors de translocations chromosomiques, peuvent être déconnectés de leur environnement moléculaire normal et placés sous le contrôle inapproprié d'autres séquences à l'origine d'une modification de leur expression. Beaucoup de gènes ont pu être associés à ces différents types d'anomalies moléculaires et présentent un fonctionnement déficient dans les tumeurs pulmonaires. Certains gènes plus fréquemment altérés ont pu être mis en évidence et la Figure 3 montre les différentes étapes de la transformation maligne dans le poumon, telle qu'elle peut être comprise à ce jour. La séquence des événements peut être reconstituée en tenant compte de la fréquence de ces modifications et du stade de la transformation maligne aux quelles elles peuvent être détectées. (Osada H. and al., 2002)

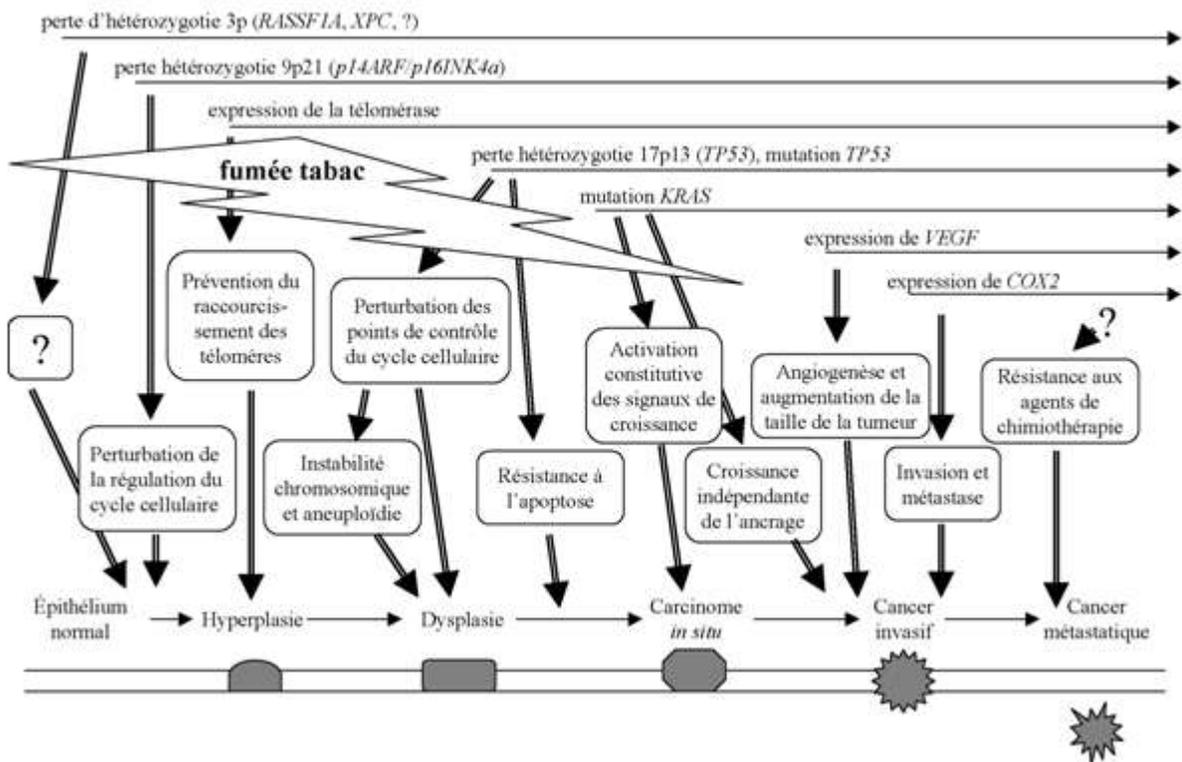


Figure 3 : Accumulation des altérations dans la progression de la carcinogénèse pulmonaire. Extrait et traduit de Osada and al. (Osada H.and al., 2002) .

III.2.1-Les altérations génétiques au niveau au niveau de la prolifération cellulaire :

III.2.1.1- Les altérations des suppresseurs de tumeurs et des inhibiteurs de croissance :

Certaines particularités ont pu être distinguées dans la séquence des événements associés avec le développement des Cancers pulmonaires à petites cellules par rapport aux cancers pulmonaires non à petites cellules. En particulier, les mutations de P53 sont plus fréquentes dans les Cancers pulmonaires à petites cellules alors que les mutations de KRAS sont plus fréquentes dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC). En effet, P53 est muté dans 80 % des cancers broncho-pulmonaires à petites cellules mais seulement dans 50 % des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules.(Agarwal S.and al., 1998) De la même manière, RB est muté dans quasiment tous les cancers pulmonaires à petites cellules (> 90 %) mais plutôt rarement dans les cancers pulmonaires non à petites cellules (15 – 30 %) (Hensel C.H.and al., 1990) (Xu H.J.and al., 1991) . Des études cytogénétiques ont également permis d'identifier des régions subissant des pertes d'hétérozygotie qui sont plus spécifiques d'un type ou l'autre de can-

Etude bibliographique : Gènes impliqués dans le cancer broncho-pulmonaire

cer du poumon. (Girard L. and al., 2000) . Cependant, beaucoup de gènes semblent communs aux deux grandes catégories de cancers pulmonaires. Les voies cellulaires les plus fréquemment affectées dans le cancer du poumon sont indiquées dans la figure 4 page suivante.

En effet, cette figure 4 met en évidence les 3 voies possibles qui inhibent la croissance cellulaire. La première voie est celle due à un ADN endommagé. Lorsque l'ADN est altéré cela active l'ATM qui va à son tour activer P53 (comme cela est décrit dans un paragraphe page 27). La deuxième voie possible est l'activation de TGF- β . En réponse aux signaux par TGF- β superfamily de ligands associés de ces protéines avec le récepteur kinases. Ces protéines lient alors typiquement aux médiateurs communs Smad et Co-SMAD : Smad 4. Ce complexe protéique active alors p15ink4b qui régule la phase G1 du cycle cellulaire en inhibant les complexes cyclines-cyclines dépendantes kinases. Ce qui conduit à un arrêt du cycle cellulaire. La troisième voie est la régulation de la prolifération cellulaire via les oncogènes et notamment EGFR, ERBB2, Ras et MYC. L'altération de l'un d'entre eux, altérations fréquentes dans les CBNPC, notamment pour le récepteur à l'EGFR va agir sur l'expression p16ink4a ou p14arf ou encore p15ink4b qui sont des régulateurs du cycle cellulaire en G1. Ainsi, les deux voies majeures de suppresseurs de tumeurs impliquées dans le cancer du poumon (p14ARF-p53 et p16INK4a-RB) sont liées fonctionnellement et sont des composantes des points de contrôle et des inhibiteurs de la croissance cellulaire. Ainsi cela conduit, lorsqu'une cellule est normale à un arrêt du cycle cellulaire. (Cf. Figure 4)

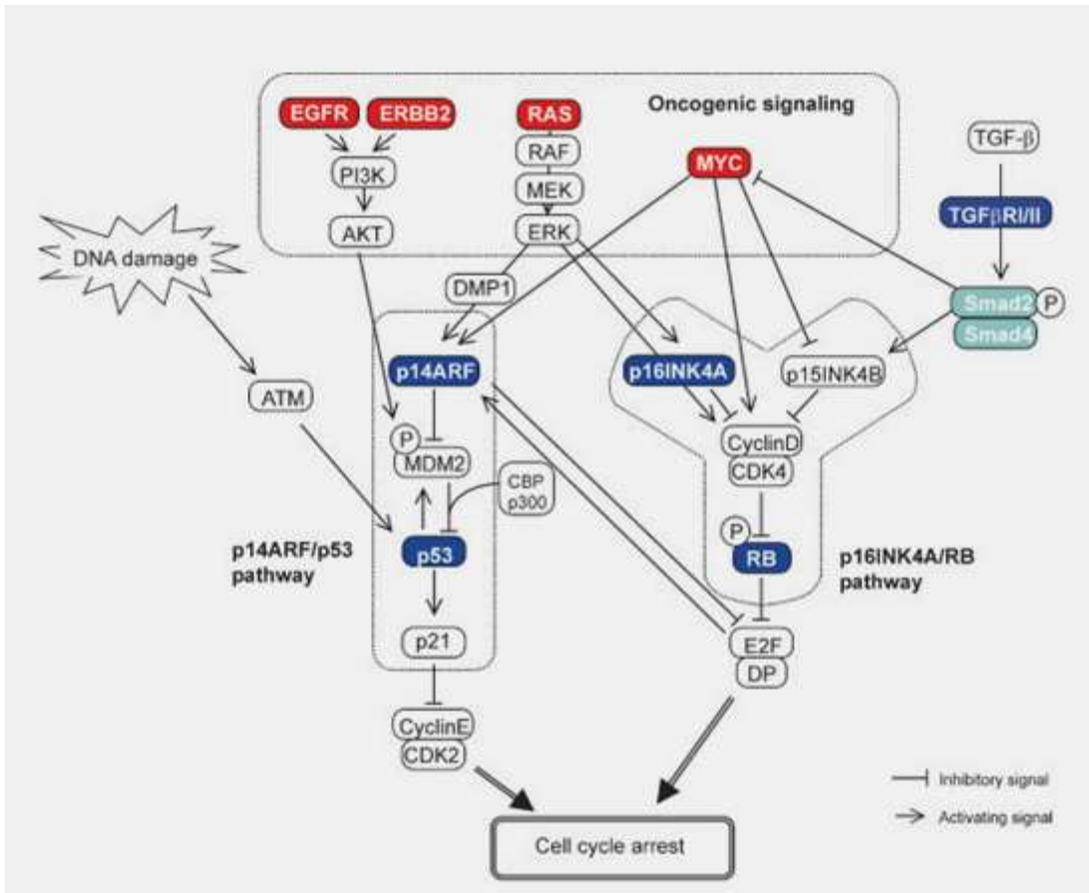


Figure 4 : Altérations des voies des suppresseurs de tumeurs dans le cancer du poumon. Deux voies principales (à savoir, p14ARF-p53 et p16INK4a-RB) impliqués dans la pathogenèse du cancer du poumon. Elles sont fonctionnellement liées et jouent un rôle en tant que composante de points de contrôle et de l'inhibition de croissance. En outre, les signaux des différents oncogènes et facteurs de croissance sont également liées à ces voies. Notez que beaucoup de composants sont inactivés dans les cancers du poumon. Molécules avec des changements fréquents dans l'activation de cancers du poumon sont marquées en rouge. Molécules montrant inactivations fréquentes et peu fréquentes sont indiquées bleu foncé et marquées en bleu clair, respectivement. (Osada H.and al., 2002)

- La protéine P53

Dans une cellule normale, le gène suppresseur de tumeur p53 a un rôle important dans les points de contrôles du cycle cellulaire. Il agit sur la réparation de l'ADN du génome. Lorsque l'ADN est endommagé, les kinases ATM et ATR sont activées. L'activation des kinases ATM et ATR entraînent une série de phosphorylations conduisant à l'activation de la protéine p53 (Cf. Figure 4). Son activation est elle-même induite par phosphorylation. En effet, l'activation de l'ATM conduit à terme à la phosphorylation de la sérine 15 de p53 par l'intermédiaire de CHK2 et l'activation de la kinase ATR conduit quant à elle à la phosphorylation de la sérine 20 par CHK1. L'activation de p53 induit alors différents gènes comme *p21*/*CIP/waf1*, *14-3-3σ*, *BAX* et

Etude bibliographique : Gènes impliqués dans le cancer broncho-pulmonaire

GADD45. (Yu Y. and al., 1999) La régulation positive de ces gènes via p53 induit alors un arrêt du cycle en phase G1 et G2 et une réparation de l'ADN est enclenchée. L'ADN non réparé conduit alors la cellule qui le contient en apoptose par des gènes dont l'expression dépendant de la production de p53 comme la famille de gènes *BCL-2* (incluant *BAX*), *APAF-1*, *PIG3* et *p53 AIP*.

Cependant, depuis que l'implication de p53 dans le cancer du poumon a été reporté (Takahashi T. and al., 1989) de nombreuses mutations de p53 sont répertoriées sur les différents codons comme 157, 245, 248, 273 (Harty L.C. and al., 1996) qui sont des CpG. Ces mutations impliquent une non fonctionnalité de la protéine et donc des mécanismes de régulations associés. Ces mutations qui ne sont donc pas favorables à la guérison et ceci même après chirurgie seraient causées par la fumée de cigarette. (Mitsudomi T. and al., 2000) Citons parmi ces régulations négatives sur p53, MDM2 qui est un gène permettant l'exportation nucléaire et la dégradation de p53 par le protéasome. En effet, l'interaction de MDM2 avec l'ubiquitine E3 ligase et la p53 engendre une diminution de l'expression de p53. Dans cette configuration, p53 joue le rôle d'un oncogène. Alors que p53 régule aussi l'expression de MDM2 en retour et la phosphorylation de MDM2 est régulée par AKT (Cf. Figure 4). MDM2 a donc le rôle d'un facteur de croissance pour la p53. Ainsi, si la p53 devient non fonctionnelle comme dans de nombreux cas de cancer, il n'y a plus de rétrocontrôle sur MDM2 par la p53. Ce qui engendre une séquestration de MDM2 dans le noyau et aboutit alors à une inactivation complète de p53. (Augello C. and al., 2006, Sherr C.J. and al., 2000, Weber J.D. and al., 1999) (Higashiyama M. and al., 1997)

Le gène *p53* contrôle la transcription de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ce qui explique son importance dans le processus de cancérisation. (Yamaguchi T. and al., 2001)

III.2.1.2 Les altérations génétiques au niveau des supresseurs de tumeurs RB et cdk inhibiteurs :

Au niveau des altérations génétiques impliquées dans le cancer broncho-pulmonaires nous pouvons aussi répertorier les altérations du *RB* et des CDK inhibitrices. Le gène *RB* est d'ailleurs l'un des premiers gènes supresseurs de tumeurs identifié dans le cancer du poumon. (Harbour J.W.and al., 1988, Xu H.J.and al., 1991, Yokota J.and al., 1989) Ces altérations agissent sur la prolifération cellulaire et donc sur le développement de tumeurs. (Tamura S.and al., 1997) La protéine correspondante est nucléaire. Elle se présente sous deux formes au cours du cycle cellulaire. Une forme non phosphorylée pendant la phase G0 et G1 précoce puis, hyper phosphorylée jusqu'à la fin de la mitose (DeCaprio J.A.and al., 1989) . Seule la forme non phosphorylée est active. Elle séquestre les facteurs de transcription E2F empêchant l'expression des gènes de la phase S et bloque alors la progression du cycle. RB est un élément clef du point de contrôle G1/S.

Le RB est régulé par une protéine P16INK-4A. En effet, lorsque la protéine RB est peu phosphorylée en G1 du cycle, RB est alors phosphorylée par le complexe Cycline D - CDK4/6 et cycline E-CDK2 au cours de la phase G1 / S. Cette modification conduit à la dissociation par RB de l'hétérodimère E2F/DP. Ainsi la transcription est active. (Muller H.and al., 2001) (Ishida S.and al., 2001) (Kalma Y.and al., 2001) (Ren B.and al., 2002) . Alors que si la protéine P16INK-4A inhibe le complexe Cycline D - CDK4 / 6, la protéine RB reste liée à E2F et DP. Ce complexe inhibe la transcription et la progression dans le cycle cellulaire. Malheureusement, les anomalies de p16 sont très fréquentes dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules alors que celle du RB sont plus caractéristiques des cancers broncho-pulmonaires à petites cellules. Ainsi, lorsque les mutations rendent p16 inactive, les cellules cancéreuses progressent dans le cycle cellulaire.

III.2.1.3-Les altérations génétiques au niveau des suppresseurs de tumeurs dans la région chromosomique 3p :

La plus fréquente des altérations génétiques dans le cancer pulmonaire à petites cellules et non à petites cellules est la perte allélique. Elle s'opère le plus souvent sur le bras court du chromosome 3. Cette perte allélique implique de nombreux gènes comme la *p53*, *RASSF1A*, *XPC*, *TGF-β*.

P53

Commençons par la protéine p53 dont l'implication fut déjà montrée auparavant comme suppresseur de tumeurs. Là encore l'influence de p53 sur la perte d'hétérozygotie en 3p21 a été démontrée. En effet, si la délétion initiale dans la région 3p a bien été associée avec une exposition aux carcinogènes, une perte de la fonctionnalité de p53 a été aussi associée. En effet, les tumeurs avec une p53 mutante ont significativement plus de risque de perte d'hétérozygotie à un ou plusieurs locus de 3p21 que les tumeurs avec une p53 sauvage. (Marsit C.J.and al., 2004) Or une majorité des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules ont une p53 mutée.

RASSF1A

Par ailleurs, le gène *RASSF1A* (Ras-association domain family 1, isoform A) est aussi l'un des gènes suppresseurs de tumeurs candidat présent dans la région mais il n'est vraisemblablement pas le seul au côté de *p53*. *RASSF1A* est un inhibiteur de la croissance cellulaire mais son mécanisme d'action n'est pas clairement élucidé. (Agathangelou A.and al., 2005) De nombreux gènes sont régulés de manière dépendante de *RASSF1A* (Agathangelou A.and al., 2003) et plusieurs de ces gènes sont également régulés par *RAS* activé, mais de manière opposée. *RASSF1A* et *RAS* activé ont donc un effet antagoniste sur l'expression de certains gènes, ce qui suggère leur implication dans la même voie mais via des effets opposés. (Agathangelou A.and al., 2005) Une perte d'hétérozygotie au niveau de *RASSF1A* a été associée à une méthylation aberrante de ce gène sur l'autre allèle.(Agathangelou A.and al., 2001) Ainsi son altération laisse libre court à la voie de *RAS* activé.

XPC

Au niveau de la région 3p, nous retrouvons aussi le gène *XPC* qui est un autre candidat pouvant participer à la carcinogenèse pulmonaire. La protéine XPC est impliquée dans la détection des dommages de l'ADN devant être réparés par la voie d'excision de nucléotides. Des polymorphismes au niveau de celui-ci sont associés avec un plus grand risque de développer un cancer du poumon. (Marin M.S.and al., 2004) (Hu Z.and al., 2005) (Lee G.Y.and al., 2005) Ces résultats sont confirmés par une étude faite sur des souris déficientes pour le gène *XPC* par l'équipe de Hollander. Il a ainsi montré que 100 % des souris déficientes pour XPC ont développées spontanément des tumeurs du poumon, essentiellement des adénomes.(Hollander M.C.and al., 2005) De plus, la présence d'une perte allélique au locus de XPC a été montrée dans une grande proportion (75 %) des cancers pulmonaires non à petites cellules chez l'homme. (Hollander M.C.and al., 2005) (Miyakis S.and al., 2003) Ainsi, la perte de XPC pourrait être un événement précoce dans la transformation maligne pulmonaire qui favoriserait la formation de mutations induites par les carcinogènes pulmonaires. (Hollander M.C.and al., 2005)

TGF- β

TGF- β , superfamille de ligands associés de ces protéines avec le récepteur kinase, inhibe la prolifération de cellules épithéliales normales ; ce qui implique aussi les cellules bronchiques et les cellules épithéliales périphériques du poumon à travers l'induction des inhibiteurs de CDK. En effet, TGF- β a une action inhibitrice sur MYC. (Cf. Figure 4) Les cellules cancéreuses de poumon sont souvent sans réponse au TGF- β et notamment de TGF- β RII issu du chromosome 3 d'où la prolifération cellulaire. (Osada H.and al., 2001) De plus les médiateurs smad 2 et 4 sont souvent mutés dans le cancer du poumon. Or ce complexe protéique active dans les cellules normales p15ink4b qui régule la phase G1 du cycle cellulaire en inhibant les complexes cyclines-cyclines dépendantes kinases. Ce qui conduit à un arrêt du cycle cellulaire. Ainsi la non réponse de TGF- β et les mutations de Smad 2 et 4 induisent une prolifération anormale des cellules cancéreuses du poumon.

Par ailleurs il faut noter aussi que la perte d'hétérozygotie sur le chromosome 3 a pour effet d'inactiver d'autres suppresseurs de tumeurs tels que : FHIT SEMA3B, PTEN, hOGG1 et BAP1. (Kopper L.and al., 2005)

III.2.1.4-Les altérations génétiques au niveau de la région chromosomique 9p21

Nous avons répertorié auparavant les pertes alléliques relatives au locus 3p. Cependant une perte allélique en 9p21 a également été rapportée dans les lésions épithéliales pré-malignes et dans les cellules bronchiques normales. (Sanz-Ortega J.and al., 2001)

La région chromosomique 9p21 contient le locus p16INK4a/p14ARF/p15INK4b (gène *CDKN2A*). Or, les protéines de la famille INK4 telles que p15 et p16 sont des inhibiteurs des kinases 4 et 6 cyclines - dépendantes (Cf.Figure 4) et sont donc des suppresseurs de tumeurs qui inhibent la croissance cellulaire. (Caputi M.and al., 2005) p16 est inactivée dans plus de 40 % des cancers pulmonaires non à petites cellules, soit par perte d'hétérozygotie, soit par hyperméthylation du gène. (Belinsky S.A.and al., 1998) Les inactivations de p16 ne sont pas significativement plus fréquentes dans les cancers pulmonaires non à petites cellules chez les fumeurs que chez les non-fumeurs mais les inactivations par mutations ponctuelles semblent plus fréquentes chez les fumeurs. (Cespedes R.D.and al., 1994)

III.2.1.5 Les altérations génétiques au niveau des oncogènes et les « growth-promoting signals »:

Les altérations génétiques touchant les oncogènes et les facteurs de croissances impliquent de nombreux gènes comme les gènes de la famille *RAS* mais aussi *EGFR* et *C-MYC*. Nous allons donc les présenter dans cette partie.

Les gènes KRAS et EGFR

La famille *Ras* comprend trois proto-oncogène *KRAS*, *HRAS*, et *NRAS* qui sont tous trois liés au GTP dans leur forme active. La famille *Ras* intervient dans la transduction du signal des facteurs de croissance. (Kratzke R.A.and al., 1992) Lorsque qu'un facteur de croissance se lie à son récepteur à activité tyrosine kinase, il provoque sa dimérisation. Grâce à des phosphorylations de protéines, la protéine *Ras* est activée. (Brunet A., 1998) *RAS* lié au GTP interagit avec la sérine/ thréonine kinase *Raf* pour l'activer. (Morrison D.K.and al., 1997) Il y a alors hydrolyse du GTP en GDP qui permet à *Ras* de redevenir inactif. (Salgia R.and al., 1998) Ainsi, une seule mutation sur un acide aminé sur les codons 12, 13, ou 61 du gène *ras* affecte l'activité GTPase qui produit alors une accumulation de GTP. Cette accumulation de GTP inhibe alors

RAF1/MAPK. Le gène *RAF1* joue un rôle dans l'induction de la transcription de plusieurs gènes de facteurs de croissance comme *MYC*, *cycline D1* mais aussi les facteurs de croissance liés à la voie de *MAPK* (Schulze A. and al., 2001) Par ailleurs, l'oncogène *RAS* mutant à la particularité d'induire l'arrêt du cycle cellulaire au travers de l'activation de *ARF*, *P16INK4A*, et *p53*. Il apparaît clair qu'une mutation sur l'un des trois oncogènes de ras peut donc provoquer de nombreuses conséquences sur la carcinogénèse.

Généralement parmi ces 3 oncogènes, *KRAS* est le plus souvent muté par rapport aux autres dans le cancer du poumon. Sa mutation se situerait le plus souvent (25 – 40% des cas) sur le codon 12. Cette mutation serait consécutive à l'exposition à la fumée de tabac. (Rodenhuis S., 1989) Cependant les mutations de *KRAS* et son implication ne sont pas encore aujourd'hui toutes élucidées. Toutefois aujourd'hui il est clair qu'une mutation à la fois sur les protéines *KRAS* et *EGFR* sont activées constitutivement et favorisent la croissance cellulaire.

Le gène *EGF* est un facteur de croissance. Ce facteur est souvent surexprimé dans le cancer bronchopulmonaire et son récepteur membranaire *EGF* est souvent lui aussi surexprimé. Ainsi, la stimulation de ce récepteur entraîne un signal constitutif de prolifération cellulaire. En ce qui concerne les mutations de l'*EGFR*, il n'y aurait pas de points chauds de mutations dans le gène *EGF* même si la majorité des mutations ont été trouvées sur les exons 19 et 21. (Tam I.Y. and al., 2006) En effet, sur 131 mutations différentes analysées, pas moins de 40 types de mutations différentes ont été recensées, essentiellement des mutations ponctuelles et des délétions. (Tam I.Y. and al., 2006) Il est important de noter que la fréquence des mutations dans *EGFR* est associée à la consommation de tabac, mais de manière inversement proportionnelle à l'exposition. Ainsi, ce sont les non-fumeurs qui sont le plus susceptibles d'avoir une mutation dans *EGFR* : 74 % d'entre eux contre seulement 19 % des fumeurs. (Tam I.Y. and al., 2006) (Cf Figure 4) Ainsi, ces mutations engendrent une prolifération anarchique des cellules cancéreuses.

L'oncogène MYC

MYC codent des phosphoprotéines nucléaires qui agissent tels que fos et jun comme facteur de transcription. L'oncogène *MYC* forme un hétérodimère avec *MAX* et régule les gènes des cellules du cycle cellulaire. *MYC* agit avec des protéines homologues telle que *MAX* (*MYC Associated Protein*) . (Kratzke R.A. and al., 1992) Ils forment alors un hétérodimère *MYC/MAX* qui

reconnait une séquence ADN consensus E-box MYC sequence. Cette séquence est souvent présente dans les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire qui sont donc des cibles pour *MYC*. Les altérations de *MYC* existent dans le CBNPC. Elles sont même très fréquentes. (Fong K.M.and al., 1999) Ainsi la surexpression de *MYC* est due à la dérégulation de sa transcription ou à une forte amplification de celui-ci (Sabichi A.L.and al., 1996) qui induit alors une prolifération anormale des cellules cancéreuses. En effet, il induit l'expression de la cycline kinase subunits (CKS) qui agit sur les CDK qui inhibent p27KIP1. *MYC* induit aussi l'expression des cyclines D1/D2 qui induisent l'accumulation de cyclines D-CDK4 qui aboutissent à la séquestration de p27KIP1 et p21CIP1 qui ont pour but de permettre par l'intermédiaire d'autres cyclines (cyclines E-cdk2) la poursuite des cellules dans le cycle cellulaire. Cependant les cyclines D/CDK4 permettent aussi la phosphorylation du RB permettant de libérer les facteurs de transcription E2F et DP qui permet la production d'autres protéines intervenant dans la prolifération cellulaire.

III.2.1.6-Les altérations génétiques au niveau des facteurs de croissance et leur récepteur :

Les principaux facteurs de croissance impliqués dans le cancer du poumon sont répertoriés dans la famille des ERBB et regroupe 4 types de récepteurs tyrosine kinase : EGFR (ERBB), ERBB2(HER-2/neu), ERBB3, ERBB4 et dont les ligands sont EGF, TGF- α et l'amphi-regulin (AR) . Ces récepteurs et ligands spécifiques ont des effets sur différents voies comme RAS, RAF, MAPK, P13K-AKT et PLC-PKC. Généralement EGFR est peu exprimé dans le cancer du poumon. Cependant il est fréquemment muté par une délétion au niveau du domaine extracellulaire, cette mutation apparaît aujourd'hui selon la littérature comme une cible potentielle permettant de cibler les cellules cancéreuses. (Garcia M.and al., 1993)

III.2.1.7-Les points de contrôle du cycle cellulaire et réparation de l'ADN.

Les points de contrôle induisent un arrêt ou un blocage du cycle cellulaire. Ainsi les cellules ne progressent plus dans le cycle cellulaire le temps qu'une réparation de l'ADN soit effectuée. Mais le système de réparation de l'ADN n'est pas encore totalement bien compris. Toutefois, il est clair que les kinases ATM et ATR jouent un rôle capital par la phosphorylation de plusieurs molécules dont CHK1 et CHK2, p53, BRCA1, et NBS1. Ces activations par phosphorylation induisent des arrêts du cycle cellulaire. Une mutation de l'une des kinases ATM et ou ATR peuvent engendrer une prolifération anarchique des cellules.

III.2.2- Gènes impliqués dans l'apoptose

L'apoptose ou mort programmée désigne la mort d'une cellule. En 1972, Kerr, Wyllie et Currie (Kerr J.F. and al., 1972) ont décrit une mort cellulaire préalablement observée dans divers tissus et divers types cellulaires. Ces cellules mourantes montraient des caractéristiques morphologiques communes, mais cependant distinctes de celles observées dans les cellules mourant accidentellement par nécrose. Ils ont suggéré que ces caractéristiques morphologiques communes puissent être le résultat d'un programme endogène sous-jacent de mort cellulaire. Ils ont donné le nom d'apoptose à ce processus. Ce phénomène est hautement régulé et il est nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Par ailleurs, l'apoptose a été démontré comme étant fondamentale au développement embryonnaire puisqu'elle permet la régression de certains tissus, participe à l'homéostasie des tissus qui se renouvellent en permanence et élimine les cellules indésirables, mutées ou infectées. (Larsen C.J., 1998) (Alvarez M.G. and al., 2000) En cancérologie, l'apoptose a trouvé son intérêt lorsque certains oncogènes tels que *BCL-2* ont été déterminés comme des gènes impliqués dans la mort cellulaire. (White E., 1996) Le cancer résulte donc d'un effet à la fois sur la prolifération accrue et sur la résistance à l'apoptose.

Typiquement, les cellules d'organismes multicellulaires s'autodétruisent lorsque celles-ci ne sont plus utiles, lorsqu'elles sont endommagées ou lorsqu'elles sont dysfonctionnelles. L'apoptose implique habituellement des cellules individuelles dans un tissu et ne provoque pas l'inflammation. Cependant une dérégulation de la mort cellulaire programmée peut être à l'origine de nom-

Etude bibliographique : Gènes impliqués dans le cancer broncho-pulmonaire

breuses pathologies. (Jeremias I. and al., 2001) En effet, un dysfonctionnement de l'apoptose peut engendrer un cancer ou des syndromes lymphoprolifératifs,...).

Il existe principalement 2 voies d'induction de l'apoptose dans la cellule : la voie mitochondriale ou voie intrinsèque, induite lors du re-largage de protéines mitochondriales et la voie des récepteurs à domaine de mort ou voie extrinsèque situé dans la membrane plasmique.

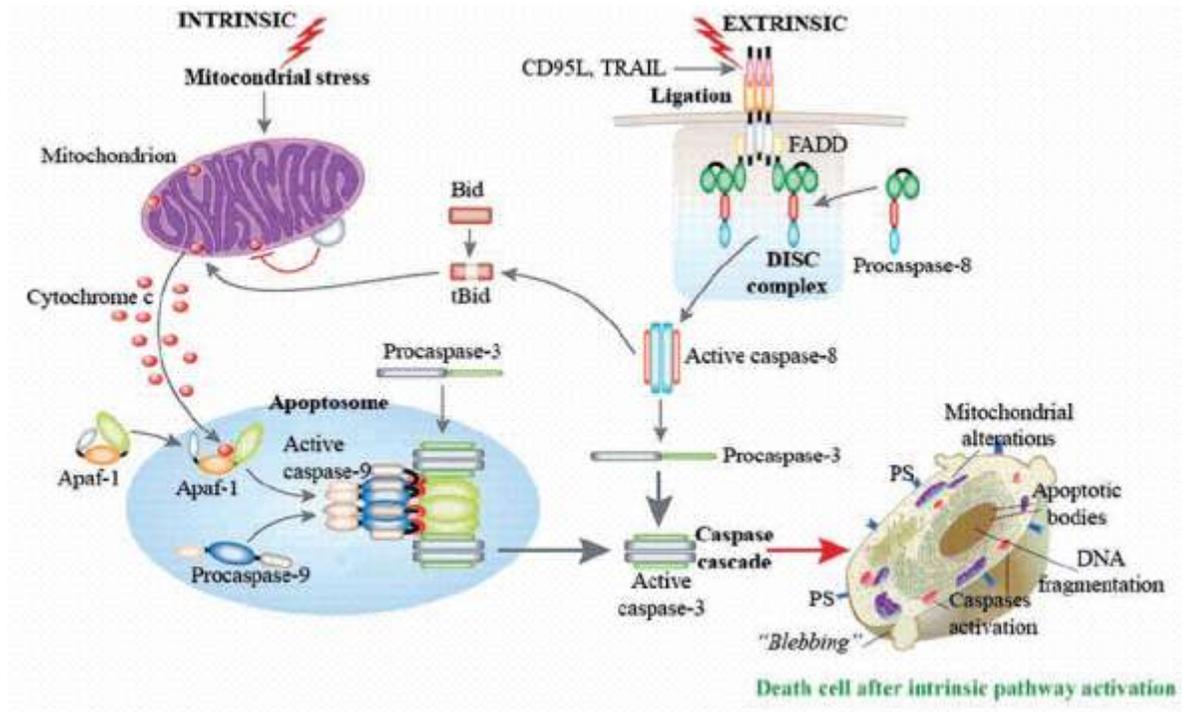


Figure 5 : Mécanisme de l'apoptose : la voie de l'apoptose extrinsèque qui utilise les récepteurs (CD95, TRAIL); et la voie intrinsèque qui utilise la mitochondrie. (Calvino Fernández M P.C.T., 2010)

III.2.2.1 - La voie intrinsèque :

Lors de l'apoptose, les cellules sont d'abord modifiées au niveau physiologique. Le premier point de non retour dans l'apoptose induite par la voie mitochondriale est la libération du cytochrome c de la mitochondrie et la dégradation du potentiel membranaire mitochondrial. Les caspases sont ensuite activées et celles-ci provoquent la coupure des protéines associées à l'apoptose. Les phosphatidylsérines sont ensuite transloquées de la face interne de la membrane cellulaire à la face externe. Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose comme la condensation du cytoplasme, du noyau et de la chromatine, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la

membrane plasmique ainsi qu'une perte de l'asymétrie membranaire sont alors visibles. Il y a ensuite formation de corps apoptotiques qui sont digérés par les macrophages environnants.

L'existence d'un programme moléculaire responsable du déclenchement de la mort cellulaire programmée a été identifiée d'abord chez le nématode *C.elegans*, puis chez les mammifères dont les homologues ont été identifiés. Chez *C.elegans*, on retrouve 4 protéines-clés: Ced-3 est une cystéine protéase à substrat aspartate (caspase) synthétisée sous forme de précurseur inactif par la cellule; Ced-4 est un activateur qui se lie à Ced-3, permettant la production de la caspase active; Ced-9 en interagissant avec Ced-4 l'empêche d'activer Ced-3; Egl-1 en se liant à Ced-9 permet la libération de Ced-4 qui peut se lier à Ced-3 pour l'activer. Chez les mammifères, Ced-3 a pour homologue la caspase-1, Ced-4 est l'homologue d'Apaf (une protéine pro-apoptotique), Ced-9 a pour homologues les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et Egl-1 a pour homologues les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 à domaine BH3. (Elmore S., 2007) .

III.2.2.2 -Voie extrinsèque

Cette voie passe par les récepteurs membranaires dont le plus connu est le récepteur au TNF et au ligand Fas. Ces récepteurs ont en commun le domaine reconnaissable « death domain » ou DD. Lorsque les 3 ligands Fas se fixent, ils déclenchent la trimérisation des récepteurs. Le trimère Fas en complexe avec les récepteurs DD recrute les molécules adaptatrices dits FADD (Fas Associated Death Domain). Ce complexe avec ces domaines effecteurs ou DED (Death Effector Domain) permet alors d'activer les pro-caspase 8. La caspase 8 ainsi active les caspases 3, 6 et 7. Il y a alors un phénomène d'amplification qui va permettre d'activer l'apoptose. (Elmore S., 2007)

III.2.2.3- Liaison entre les deux voies

Très rapidement certaines molécules apparaissent dans la bibliographie comme impliquées dans le mécanisme des deux voies. En effet, Bid, membre pro-apoptotique de la famille BCL-2 (Li L.and al., 1998) . Bid est activé par la caspase 8 dans la voie extrinsèque. Bid peut alors agir tel que BAX pour permettre l'ouverture de mégacanaux dans la membrane des mitochondries. Ainsi le cytochrome C est libéré. (Cf Figure 5) Il permet aussi de relier la voie d'activation de la caspase 8 à celle de la caspase 9. (Carbonnelle D.and al., 2001) La mitochondrie est donc un acteur majeur dans la mort cellulaire programmée. (Green D.R., 1998) (Green D.R.and al., 1998)

III.2.2.4- Régulation de l'apoptose

L'apoptose est enclenchée lorsque la cellule est arrivée au point de non retour. Mais avant ce point, l'apoptose peut être modulée en poursuivant de manière irréversible la destruction de la cellule ou au contraire en l'échappant à la mort cellulaire. L'activation de la mitochondrie est considérée comme un point de non retour pour l'apoptose. Voyons ce qui peut moduler l'activation de la mitochondrie :

- la molécule de la famille de BCL-2

L'une des caractéristiques communes de cette famille est d'avoir un ancrage par une partie carboxyterminale hydrophobe qui assure leur ancrage au niveau de la membrane externe mitochondriale, mais aussi de la membrane externe du réticulum endoplasmique et du noyau. Il en existe deux types

- Les protéines pro-apoptotiques qui activent l'apoptose comme BAX, BAD, BID siègent au niveau du cytosol ou des microtubules qui à la suite d'un signal apoptotique s'insèrent dans la membrane mitochondriale et permettent ainsi sa perméabilisation. (Crompton M., 2000a, Crompton M., 2000b)

- Les protéines anti-apoptotiques permettent de protéger de l'apoptose ; les principales sont BCL-2 ou BCL-xl. Elles siègent au niveau de la mitochondrie. (Kim R.and al., 2006) ainsi à la suite d'un signal apoptotique, elles s'inséreraient dans la membrane mitochondriale et induiraient la perméabilisation. C'est l'interaction de BCL-2 avec les canaux ioniques VADC (Voltage Dependant Anion Channel) de la membrane externe des mitochondries qui va permettre de fermer les canaux ioniques et ainsi supprimer le passage des molécules telles que le cytochrome c. (Juin P.and al., 2000)

- Les IAP (Inhibitor of Apoptose Protein)

Cette famille a pour objectif d'inhiber l'activation et par conséquent l'activité des caspases. Par exemple XIAP, cIAP-1, cIAP-2 inhibent les caspases 3,7 et 9 mais pas les caspases 1, 6, ou 8 . (Deveraux Q.L.and al., 1998, Deveraux Q.L.and al., 1997) Au cours de l'apoptose Smac/DIABLO est libéré et se lie a XIAP empêchant leur action protectrice et permettant ainsi aux caspases 3 d'être activées et ainsi d'activer la cascade de caspase de l'apoptosome.

- p53

La protéine p53 est une protéine qui joue un rôle à la fois dans le cycle cellulaire et dans le phénomène d'apoptose. Toutefois, le rôle de la protéine p53 n'est pas aussi clair dans l'apoptose que dans l'arrêt du cycle cellulaire. Cela est dû à l'hétérogénéité de cette fonction apoptotique. Il y aurait deux voies, l'une passant par l'activité de transactivation de la protéine et l'autre utilisant un mécanisme indépendant de la transcription. Pour la voie dépendante de la transcription, plusieurs gènes ont été identifiés. Il s'agit de *Bax*, *IGF-BP3* et *PIG3*. Il est fort possible que leurs contributions soient très variables selon le type cellulaire. Les mécanismes de l'apoptose indépendante de la transcription, induite par p53, ne sont pas connus. Ceux-ci impliqueraient des interactions protéine-protéine. La protéine 53 BP2, qui interagit de façon compétitive avec p53 et Bcl2, est une bonne candidate. Il est également intéressant de noter que de faibles quantités de p53 sont capables de protéger les cellules de l'apoptose. (Lassus J. and al., 1996, Lassus P. and al., 1996) Plusieurs facteurs semblent intervenir dans ce choix : la quantité de lésions de l'ADN, la quantité de p53 induite, le type cellulaire ou l'altération d'autres oncogènes. Il n'y a pas, à l'heure actuelle, de schéma unificateur qui pourrait rendre compte de l'hétérogénéité des études sur ce sujet. L'induction de p53 dans des cellules non transformées est généralement suivie d'un arrêt du cycle cellulaire alors qu'elle est capable d'induire l'apoptose dans des cellules transformées. Cette différence pourrait être due à l'expression élevée de E2F-1 dans les cellules tumorales. Une synergie entre E2F-1 et p53 pour induire l'apoptose a été observée dans de nombreux types cellulaires. La sensibilité préférentielle des cellules tumorales à une apoptose induite par p53 est une voie de signalisation qui doit être approfondie. Elle pourrait être à la base de nouveaux développements thérapeutiques avec la possibilité d'induire spécifiquement une apoptose des cellules tumorales. Dans la même famille, notons p21 qui s'oppose à l'apoptose induite par le TNF, de plus cette action anti-apoptotique interviendrait aussi lors de traitement par radiothérapie ou par chimiothérapie.

- Inhibition de l'activité de NFκB.

NFκB est un facteur nucléaire reconnu parmi les proto-oncogènes. La transcription de NFκB est activée par de nombreux stimuli. Il intervient dans différents types cellulaires et régule plusieurs gènes cibles. Il a souvent été référencé jusqu'à présent comme un médiateur important dans les réponses immunitaires. Aujourd'hui, NFκB est connu pour son rôle apoptotique lorsqu'il est inactivé. (Li L. and al., 1998) En effet sans une inactivation de celui-ci, il induirait la

prolifération cellulaire et la progression cellulaire par la régulation de l'expression de gènes cibles comme *C-MYC* et la *Cyclin D1*. (Pahl H.L., 1999) (Rayet B.and al., 1999) Dans certains système sa surexpression est associée avec un stade avancé de la tumeur et indique donc la métastase de celle-ci. Il a donc été démontré comme un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein. (Newton T.R.and al., 1999)

- Inhibition des oncogènes *c-myb* et *c-raf*.

Leur régulation négative par stratégie antisens a démontré une augmentation de l'apoptose, LR-3001 cible *c-myb* chez des cellules leucémiques *in vitro* et induit l'apoptose. (Monia B.P.and al., 2000) L'ODN ISIS 5132 lui induit l'apoptose chez des cellules épithéliales en ciblant l'oncogène *c-raf*. (O'Dwyer P.J.and al., 1999)

La mort cellulaire programmée est au centre de nombreuses stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses. Il reste malgré tout dans de nombreux cas des problèmes de toxicité envers les cellules saines. C'est pourquoi la poursuite des études vise à mieux comprendre les mécanismes particuliers mis en place par les cellules cancéreuses pour échapper à l'apoptose.

III.2.3 Les altérations conduisant à la métastase

Généralement la métastase est la conséquence d'altérations antérieures de l'ADN de gènes intervenants dans l'apoptose ou dans la prolifération cellulaire. Ainsi l'ensemble des gènes énoncés auparavant favorisent la métastase. Cependant, nous pouvons tout de même souligner l'effet de certains comme le *RB*, les facteurs angiogènes , et les télomérases.

III.2.3.1- Les mutations sur le *RB*

Le *RB* est muté dans 15 à 30 % des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules.(Hensel C.H.and al., 1990) (Xu H.J.and al., 1991) lorsque ces mutations engendrent une perte totale de l'expression de la protéine *RB*, il y a alors une possible association à la progression tumorale.(Xu H.J.and al., 1991) Même si cette altération ne représente que 15 à 30 % dans le CBNPC, cette proportion se révèle encore plus importante dans les CBNPC de stades tardifs. Toutefois, l'inactivation de *RB* dans CBNPC ne semble pas être en corrélation avec le délai de rechute ou de décès. (Reissmann P.T.and al., 1993) (Shimizu E.and al., 1994)

III.2.3.2- Les facteurs angiogènes :

Les facteurs angiogènes sont des facteurs permettant de stimuler la croissance, la migration et la différenciation des cellules. Ils sont donc importants dans la progression et le développement des métastases du cancer. Les régulations qui font appel à ses mécanismes sont souvent les cytokines ainsi que les facteurs de croissance. Nous pouvons citer parmi ceux impliqués dans le cancer du poumon : *VEGFs*, *VEGFR2* (son récepteur) dont l'effet est positif alors que *VEGFR1* et *VEGFR3* ont un effet négatif dans la régulation des *VEGFs*. Selon les études *VEGFR3* via un signal serait responsable de la métastase du cancer du poumon. Mais il reste de nombreux points à clarifier sur le sujet.

III.2.3.4- Les Télomérase :

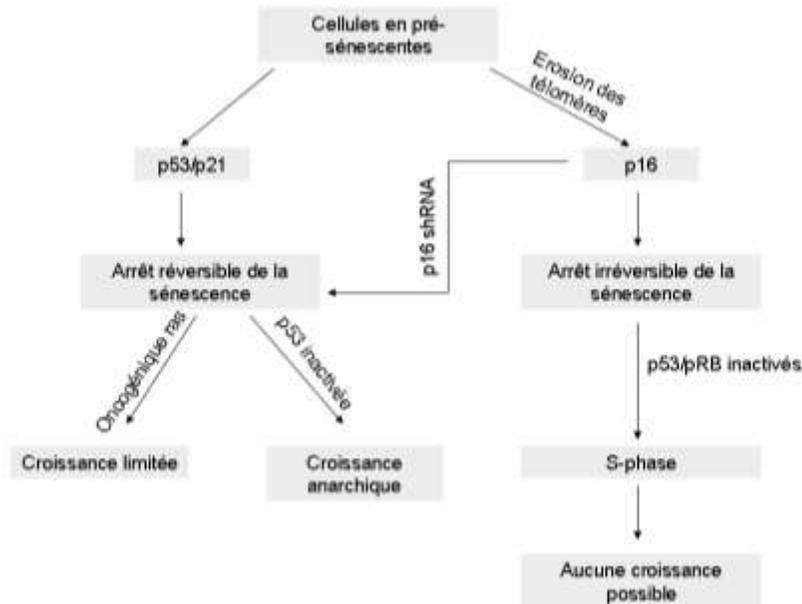


Figure 6 : Rôle de p53 et p16 dans le raccourcissement des télomères.

Les télomérases quant à elles participent à l'immortalisation. La cellule a des problèmes avec les extrémités de ses chromosomes, les télomères : à chaque division, la machinerie répliquative est incapable d'en assurer la polymérisation complète. Chaque mitose s'accompagne donc d'une perte de matériel chromosomique. Cette diminution télomérique, après un certain nombre de divisions, devient incompatible avec la survie de la cellule. En effet, elle déstabilise les chromosomes, ce qui entraîne des anomalies reconnues par les points de contrôles du cycle cellulaire.

Etude bibliographique : Gènes impliqués dans le cancer broncho-pulmonaire

Ainsi, la perte de l'activité télomérase est un mécanisme suppresseur de tumeur. (Juin P. and al., 2000) Cette mort cellulaire répllicative constitue une sorte d'horloge biologique régulant la survie des cellules en fonction de leur passé réplcatif. Il a été suggéré que lorsque les télomères sont endommagés il y aurait activation de p16INK4A/RB et d'une autre voie p53/P21. Cependant dans le cancer du poumon, p53 est souvent inactivée par mutation. Ainsi l'une des voies est déjà non fonctionnelle pour venir induire l'apoptose face aux télomères endommagés ne restant que la voie par l'activation de p16. Cependant, lorsque p16 est aussi non fonctionnelle alors il y a progression des cellules aux télomères endommagés dans le cycle cellulaire et immortalité des cellules. (Cf. Figure 6)

Chapitre IV. Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

Au vu des nombreux gènes qui sont impliqués dans le cancer, la recherche s'est orientée depuis quelques années sur la recherche de traitement anticancéreux qui auraient pour caractéristiques principales d'être plus spécifiques des cellules cancéreuses et moins toxiques pour l'organisme. Dans cet objectif, le laboratoire travaille sur deux cibles moléculaires potentiellement intéressantes.

- Le gène *HEF1* découvert par une équipe de recherche de Philadelphia en 1996. Ils ont montré que ce gène possédait la caractéristique d'une protéine déjà existante p130cas. Mais ce gène va se révéler bien plus complexe et impliqué dans de nombreuses fonctions du cycle cellulaire. (Law S.F.and al., 1996)

- Le gène *B2*, découvert par l'équipe en 2004, ne code pour aucune protéine ou seules 13 480 paires de bases de cet ARN étaient identifiés et sans aucun cadre de lecture. (Jacquot C.and al., 2004) Cet ARN (GenBank AY166681) se situe sur le chromosome 6 dans la région 6p24-25 de l'intron 2 du gène *HEF1*. Il superpose ainsi le gène *HEF1*.

Nous allons décrire ces nouvelles cibles potentiellement intéressantes dans les parties qui suivent.

IV.1-Le Gène *HEF1*

Le gène *HEF1* (Homo sapiens Enhancer Filamentation 1) possède plusieurs noms comme NEDD9 (Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated 9) ou aussi Cas-L du fait de son homologie p130Cas. Il présente de nombreuses implications et fonctions intéressantes dans le cancer et notamment le cancer broncho-pulmonaires non à petites cellules.

IV.1.1- Localisation du gène *HEF1*

Le gène *HEF1* ou nommé aussi NEDD9 fut découvert en 1996. (Law S.F.and al., 1996) (Minegishi M.and al., 1996) *HEF1* code pour une protéine de 834 acides aminés, elle fait partie de la famille de protéine adaptateur Cas (Crk associated substrate) (Law S.F.and al., 2000) avec p130Cas (Sakai R.and al., 1994) et Efs. (Alexandropoulos K.and al., 1996, Ishino M.and al., 1995) NEDD9 fut d'abord identifié comme un composant impliqué dans la transformation virale.(Ishino M.and al., 1995, van Seventer G.A.and al., 2001) Mais aujourd'hui, NEDD9 ou

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

HEF1 possède des protéines aux rôles plus divers qui font l'objet de nombreuses études. En effet, son implication a été démontrée, dans les processus de migration dépendant des intégrines, dans le déroulement du cycle cellulaire, dans la mort cellulaire programmée, dans la différenciation et dans la prolifération cancéreuse. (Law S.F. and al., 1996, O'Neill G.M. and al., 2007) L'ADN génomique de ce gène est de 199 016 pb. Le gène est localisé sur le bras court du chromosome 6 en position p24-25. (Cf. Figure 7)

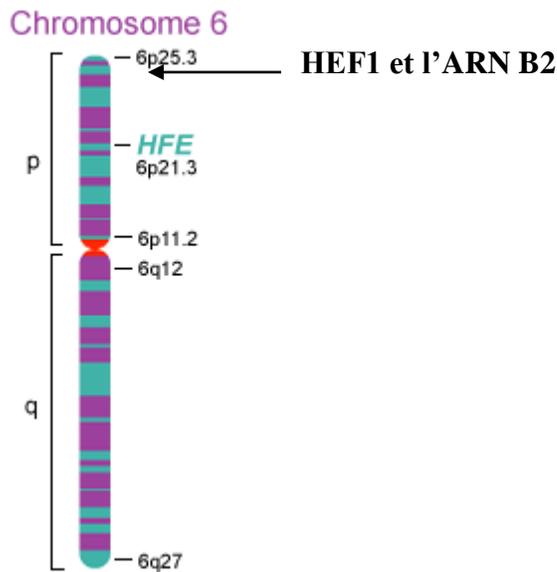


Figure 7 : Localisation du gène *HEF1* et de l'ARN *B2* sur le chromosome 6. http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/posters/chromosome/Gifs/chr6.gif

La transcription du gène donnera naissance à un ARN messager de 3817 paires de bases composé de 7 exons. (Cf. Annexe 1)

IV.1.2- La famille de la protéine *HEF1* : Protéines Cas

HEF1 fait partie de la famille des adaptateurs Cas qui contiennent plusieurs domaines d'interactions protéiques, pour former des complexes multi-protéiques impliqués dans les cascades de signalisation de l'adhésion cellulaire. (Alexandropoulos K. and al., 1996) (Ishino M. and al., 1995) (Law S.F. and al., 1996) (Manie S.N. and al., 1997) (Minegishi M. and al., 1996) (Nojima Y. and al., 1995) (Sakai R. and al., 1994) (Vuori K. and al., 1995) Les protéines Cas sont d'importants médiateurs intracellulaires des signaux d'activation des intégrines. (Law S.F. and al., 2000) Ces protéines sont associées principalement à la protéine FAK (focal adhesion kinase). Ces protéines sont liées à des intégrines transmembranaires, et permettent la liaison entre les

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

points de fixation au niveau de la matrice extracellulaire (ECM) et au niveau du cytosquelette. (Burrige K.and al., 1988) Elles sont impliquées dans la transmission des signaux extracellulaires pour le contrôle de la prolifération, de la différenciation, de la migration et de l'apoptose. (Giancotti F.G.and al., 1999, O'Neill G.M.and al., 2001) (Schoenwaelder S.M.and al., 1999a, Schoenwaelder S.M.and al., 1999b)

La structure des protéines Cas (Cf. Figure 8) possède (Law S.F.and al., 2000) : un domaine SH3 (Src Homology 3) N-terminal hautement conservé, un domaine central composé de multiples sites de fixation de motifs SH2, de site de fixation de Src après phosphorylation des résidus tyrosine par FAK, d'une région riche en sérine et d'un motif C-terminale homo ou hétérodimérisé (Law S.F.and al., 2000) , qui peut réguler des interaction avec d'autres protéines. (Sakakibara A.and al., 2000)

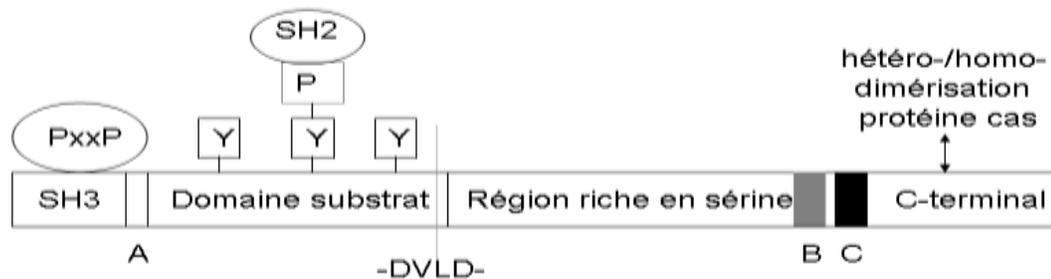


Figure 8 : Schéma des domaines conservés des protéines Cas (O'Neill *and al.*, 2000). Le domaine Src homology 3 (SH3) qui interagit avec des protéines contenant des motifs poly-proline (PxxP) ; Domaine substrat est une région contenant un grand nombre de tyrosines qui une fois phosphorylées recruteront une protéine contenant un domaine SH2 ; le domaine suivant est une région riche en sérine comme indiqué ; la partie C-terminale peut être homo ou hétérodimérisée (Law S.F.and al., 1998)

Les protéines de la famille Cas diffèrent par leur expression dans les différents tissus. Alors que *p130Cas* est uniformément exprimé, *Efs* est présent uniquement dans le placenta, dans l'embryon, dans les muscles et dans le cerveau (Alexandropoulos K.and al., 1996) et *HEF1* est exprimés dans différents tissus comme le placenta, thymus, foie, reins...(Singh M.K.and al., 2008) (Law S.F.and al., 1996) (Law S.F.and al., 1998) (Minegishi M.and al., 1996) (Manie S.N.and al., 1997, Minegishi M.and al., 1996) . Cette distribution spécifique suggère que la protéine HEF1 a des fonctions très spécifiques. (Singh M.K.and al., 2008)

La structure des protéines Cas (Cf. Figure 8) indique que ce sont des protéines d'accrochage. Lors de l'interphase, les protéines Cas sont situées au niveau des sites d'adhésion

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

focaux et leur domaine SH3 interagit avec la région poly-proline C-terminale des protéines FAK. (Law S.F. and al., 1996) (Sakai R. and al., 1997) ; (Ohba T. and al., 1998, Polte T.R. and al., 1995, Tachibana K. and al., 1997) Elles sont phosphorylées par les FAK et les Src kinases en réponse à la liaison des récepteurs intégrines à l'ECM (Law S.F. and al., 2000) (Cf. Figure 9). Cette phosphorylation active le site de fixation à SH2 pour recruter les protéines adaptatrices Crk qui stimulent alors la cascade Ras/Raf/Jun terminale kinase (JNK) (Astier A. and al., 1997) (Blaukat A. and al., 1999) (Dolfi F. and al., 1998) (Law S.F. and al., 1996, Manie S.N. and al., 1997, Minegishi M. and al., 1996, Nojima Y. and al., 1995, Sakai R. and al., 1994, Vuori K. and al., 1995) qui contribue à la migration cellulaire. (Cary L.A. and al., 1998, Cheresh D.A. and al., 1999, Klemke R.L. and al., 1998, Ohashi Y. and al., 1999)

Les protéines Cas sont largement modifiées par des tyrosines sérine/thréonine kinases en réponse à une mutation oncogénique (Sakai R. and al., 1994) , à la ligation d'une intégrine et l'adhésion cellulaire (Harte M.T. and al., 1996) (Hunter C.A. and al., 1997, Manie S.N. and al., 1997) (Minegishi M. and al., 1996, Nojima Y. and al., 1995, Vuori K. and al., 1995) , ou à l'entrée dans le cycle cellulaire. (Law S.F. and al., 1998) (Oktay M. and al., 1999) (Yamakita N. and al., 1995) . L'état de phosphorylation des protéines Cas influe sur leur localisation. C'est particulièrement le cas pour HEF1 dont le niveau de phosphorylation et la structure même de la protéine varient en fonction des phases du cycle cellulaire. Les protéines Cas sont aussi impliquées dans les processus de mort cellulaire par apoptose. (Bannerman D.D. and al., 1998) (Law S.F. and al., 2000) (O'Neill G.M. and al., 2007) (Weng L.P. and al., 1999) Certaines études ont aussi démontré l'implication des protéines Cas dans les processus de cancérisation. C'est le cas pour p130Cas qui est une cible d'hyperphosphorylation par les protéines oncogéniques Src et Crk. (Sakai R. and al., 1994)

Les sites adhésions focaux sont des points de liaisons entre la matrice extracellulaire, les intégrines et la matrice intracellulaire, mais ce sont aussi des transmetteurs de signaux extracellulaires contrôlant la prolifération, la différenciation et l'apoptose.

Les intégrines sont des protéines membranaires hétérodimériques, constituées de sous-unités α et β , exprimées sur les cellules épithéliales et endothéliales. Leur partie externe se fixe sur des composants de la matrice extracellulaire et transmet des signaux via les composants des complexes d'adhésion focale (FAK) qui s'agrègent sur la partie interne de la sous-unité α . Les intégrines participent au couplage de la régulation de l'adhésion cellulaire et de la prolifération.

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

FAK (Focal Adhésion Kinase) est une protéine cytoplasmique ubiquitaire retrouvée au sein du complexe d'adhérence. La kinase d'adhérence focale (FAK) joue un rôle primordial dans les phénomènes d'adhérence et de migration cellulaire. Préférentiellement localisée près des intégrines au niveau des complexes d'adhérence (Cf. Figure 9), FAK fonctionne comme transmetteur des signaux extracellulaires qui agissent sur la cellule par l'intermédiaire des intégrines et des facteurs de croissance. Les intégrines sont des médiateurs impliqués dans différents processus physiologiques du développement cellulaire et notamment dans la croissance des cellules tumorales et des métastases. (Petersen S.and al., 1998) La phosphorylation des FAK est contrôlée par les complexes de signalisation induits par les récepteurs à intégrines.(Schlaepfer D.D.and al., 1998)

FAK possède de nombreux r siduals tyrosine qui, une fois phosphorylés, agissent comme des points d'amarrage pour le recrutement et l'activation de plusieurs protéines de signalisation SH2 et SH3. La FAK joue un rôle central au sein du complexe d'adhésion, interagissant avec des protéines du cytosquelette telles que l'actine, la paxilline, la taline, ainsi que des protéines qui participent au remaniement de ce même cytosquelette telle que la PI3-kinase, ou la p130Cas. Son activation se traduit par l'autophosphorylation d'un r sidual tyrosine libérant un site de liaison pour la protéine Src ainsi que d'autres kinases des familles Src et Fyn dont les cascades de transduction aboutiront à l'activation de programmes géniques de régulation du cycle cellulaire ou de migration. La modulation des FAK affecte la mobilité cellulaire et induit l'apoptose. (Crouchand al., 1996, Frisch S.M.and al., 1996, Hungerford J.E.and al., 1996, Ilic D.and al., 1995, Xu L.H.and al., 1996) En effet FAK est impliqué dans la perte d'adhésion cellulaire lors de l'apoptose . (Weng L.P.and al., 1999)

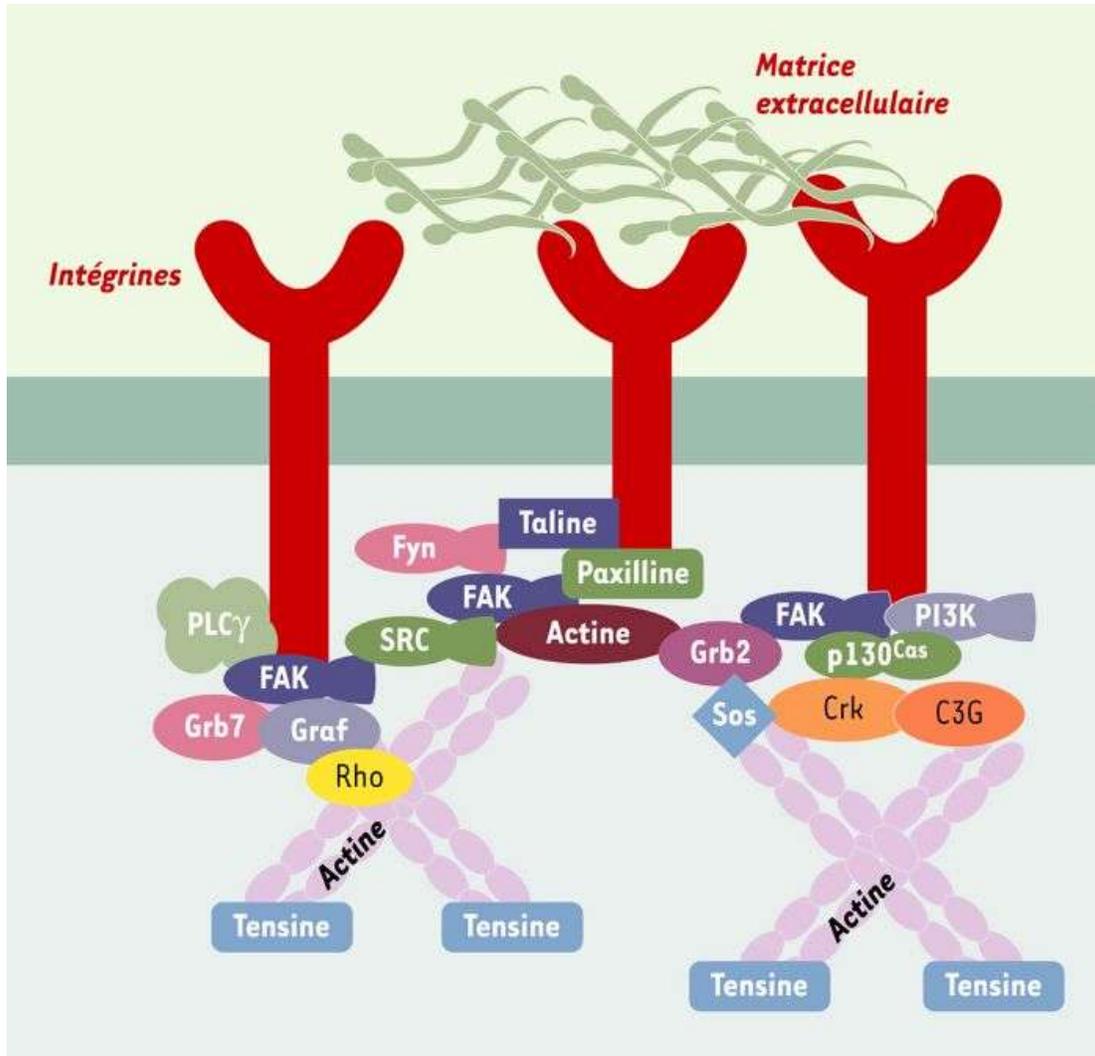


Figure 9 : Le complexe d'adhérence est une large structure composée de protéines connectées entre elles par leur domaine SH2 ou SH3 (*Src homology regions 2 and 3*). Au sein de ces complexes, FAK est l'un des points centraux de ces connexions en étant l'intermédiaire entre les signaux activateurs des intégrines ou des facteurs de croissance et les autres protéines. Le nombre de protéines nécessite l'association de plusieurs protéines FAK pour permettre une bonne cohésion du système. FAK: *focal adhesion kinase*; Fyn: tyrosine kinase Fyn; Graf: *GTPase regulator associated with focal adhesion kinase*; Grb2, Grb7: *growth factor receptor-bound protein 2, 7*; p130^{cas}: protéine de 130 kDa associée à Crk (*Crk-associated substrate*); PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; PLC γ : phospholipase C γ ; Rho: protéines Rho; Sos: protéine sos; SRC: tyrosine kinase src. (Bergeron M. D.J.C., 2003)

IV.1.3 – Les protéines HEF1

Le gène *HEF1* est responsable de la production de 4 protéines différentes : p115^{HEF1}, p105^{HEF1}, p65^{HEF1} et p55^{HEF1}. (Law S.F. and al., 1998) p115^{HEF1} et p105^{HEF1} correspondent à deux niveaux de phosphorylation de la protéine totale localisés au niveau des sites d'adhésions focaux pendant l'interphase. (Law S.F. and al., 2000) La p115^{HEF1} est la forme hyperphosphorylée de p105^{HEF1} induite par la stimulation des intégrines. *HEF1* est régulé au cours du cycle cellulaire : à la limite G2/M (Law S.F. and al., 1998) , et de l'apoptose, la protéine est spécifiquement tron-

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

quée, au niveau des sites DLVD (aa 360 à 363) caspase-like 3 ou 7 (Law S.F.and al., 2000) et DDYD (aa 627 à 630) (Cf. Figure 10), en différents isoformes impliquées dans la croissance et la mort cellulaire. Ceci suggère une convergence entre les mécanismes de contrôle de l'adhésion cellulaire lors de ces deux processus. En effet, lors de la mitose, la protéine p105^{HEF1} est clivée et produit : p55^{HEF1}, non tyrosine-phosphorylée, qui contient en partie N-terminale le domaine SH3 et une majorité du motif d'adhésion au site SH2 (Law S.F.and al., 1998) , et p65^{HEF1}, partie C-terminale. p55^{HEF1} va ensuite migrer vers le fuseau mitotique, malgré la présence résiduelle de la séquence interagissant avec FAK, et semble donc être un facteur déclenchant de la division cellulaire. L'isoforme p28^{HEF1}(aa 631 à 834) est produite par clivage de p65^{HEF1} sur le site DDYD au cours de l'apoptose . (O'Neill G.M.and al., 2001)

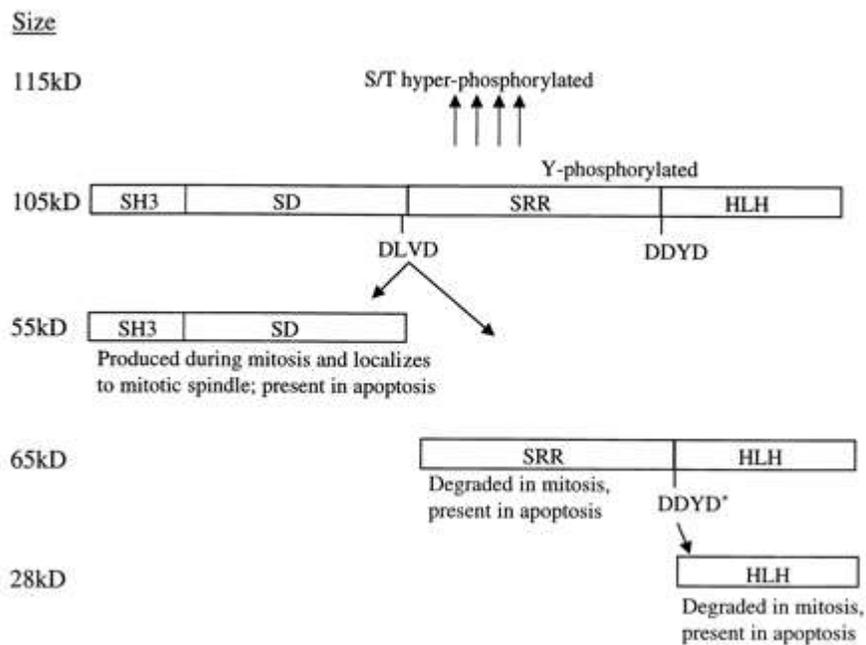


Figure 10: Modifications post-traductionnelles de la protéines p105^{HEF1}, intervenant au cours de la mitose et de l'apoptose, et produisant différentes isoformes. Le schéma indique la présence des domaines, SH3 (Src Homology 3), SD (substrate domain) qui inclut des résidus tyrosine dont la phosphorylation régule les interactions avec les protéines SH2, SRR qui est une région riche en sérine et HLH contenue dans la région très conservée C-terminale. (O'Neill G.M.and al., 2001)

Les différentes isoformes de *HEF1* sont sujettes à des dégradations par le protéasome. Le degré de dégradation est variable entre la mitose et l'apoptose, il contribue aux différences d'abondances de chaque forme observée. (Law S.F.and al., 2000)

IV.1.4. - Les fonctions de HEF1

HEF1 a tout d'abord été isolé lors d'un screening de protéine humaine et a démontré sa capacité chez *Saccharomyces cerevisiae* à modifier la morphologie cellulaire passant de ronde à filamenteuse. (Law S.F. and al., 1996) La protéine HEF1 est impliquée dans le contrôle de la croissance, de la mort et dans la motilité cellulaire, par l'intermédiaire d'interaction au niveau des sites d'adhésion cellulaire et du fuseau mitotique. En effet il a été démontré depuis longtemps que les modifications morphologiques des cellules intervenantes au cours de ces processus sont régies par les mêmes voies protéiques. (King K.L. and al., 1995) Ces différents événements débutent par un arrondissement et un détachement des cellules de la matrice extra-cellulaire.

IV.1.4.1- Implications dans le cycle et la différenciation cellulaire

Plusieurs travaux semblent suggérer que p105^{HEF1} et p115^{HEF1} sont des relais intracellulaires des intégrines intervenant lors de la différenciation des cellules B et T. (Astier A. and al., 1997, Manie S.N. and al., 1997, Minegishi M. and al., 1996, Slatter J.G. and al., 1997, Tachibana K. and al., 1997) Law and al. (2000) démontrent que les quantités de ces deux formes de HEF1 sont régulées au cours du cycle cellulaire et sont particulièrement abondantes après l'initiation de la division de la cellule. p105^{HEF1} est formée avant p115^{HEF1} dans le cycle cellulaire ce qui suggèrent que la phosphorylation de cette dernière interviendrait à un stade précis du cycle. p105^{HEF1} et p115^{HEF1} coordonnent les complexes de signalisation au niveau des sites d'adhésions focaux en réponse à l'adhésion ou à l'initiation de la division cellulaire. L'équipe de E. Golemis a mis en évidence, chez des cellules MCF-7 qui surexpriment le gène *HEF1*, son importante implication dans la morphologie, dans la mobilité cellulaire (Fashena S.J. and al., 2002) et dans l'initiation du cycle cellulaire. En effet, Law and al. démontrent la surexpression de p105^{HEF1} puis de p115^{HEF1} très rapidement après l'induction de la croissance chez des cellules quiescentes MCF-7. (Law S.F. and al., 1998) Ces modifications phénotypiques sont corrélées à une régulation positive de gènes impliqués dans la migration et l'invasion comme ceux codant pour les kinases de chaîne légère de myosine.

IV.1.4.2- Implications dans la mitose

Le clivage de p105^{HEF1} et p115^{HEF1} en phase G2/M engendre l'apparition de la protéine p55^{HEF1} N-terminale, qui va se localiser au niveau du fuseau mitotique, alors que la partie C-terminale est dégradée. (Law S.F. and al., 1998) Ceci indique que *HEF1* joue un rôle important dans la transition entre la cellule qui adhère au support lors de l'interphase et la cellule mitotique ronde libre. (Law S.F. and al., 2000) p55^{HEF1} permet la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Cette progression se fait par une association avec la protéine régulatrice de la mitose : hsDim1p décrite chez *Schizo-saccharomyces* comme indispensable pour la transition G2/M. (Cf. Figure 11)

IV.1.4.3. Implications dans l'apoptose

Les données *in vitro* montrent que la régulation de l'activité des FAK contrôle l'apoptose. (Frisch S.M. and al., 1996, Hungerford J.E. and al., 1996) (Xu L.H. and al., 1996) En effet, il a été démontré l'importance chez de nombreux types cellulaires que la perte de l'attachement était un stimulus suffisant pour déclencher l'apoptose (Frisch S.M. and al., 1996) . En effet, les FAK actives lors du détachement de la cellule empêchent le déclenchement de l'apoptose (Frisch S.M. and al., 1996) , et donc le blocage des FAK peu engendrer celle-ci. (Hungerford J.E. and al., 1996) Les FAK sont donc clivées par des caspases, lors du détachement de la cellule pour permettre l'apoptose. (Levkau B. and al., 1998) (Wen L.P. and al., 1997) Law *and al.* (2000) montrent chez les cellules MCF-7 que la surexpression de *HEF1*, engendre un arrondissement des cellules et un décollement de leur support. Cette étude démontre aussi une influence de cette surexpression sur l'augmentation de l'activité protéolytique des caspases 3 et/ou 7. L'induction des caspases conduit au clivage de p105^{HEF1} et p115^{HEF1}, en : p55^{HEF1} (conservée lors de la mitose et dégradée lors de l'apoptose par le protéasome) et p65^{HEF1} (conservée lors de l'apoptose alors qu'elle est dégradée lors de la mitose), elle-même clivée au niveau du site DDYD pour donner p28^{HEF1} (Cf. Figure 10 et 11). L'induction de la surexpression de *HEF1* conduit à la phosphorylation et l'activation des JNK (Jun N-terminal kinase) qui forment un complexe avec HEF1 et se localisent au niveau des sites d'adhésions focaux. (Law S.F. and al., 2000) L'activité pro-apoptotique de HEF1 semble pouvoir être attribuée à l'expression de la région N-terminale de p28^{HEF1}. Il semble que p28^{HEF1} influe sur le clivage de FAK menant à l'apoptose. (O'Neill G.M. and al., 2001) En effet, O'Neill *and al.* a démontré que la séquence située entre les acides aminés 626 et 654 et le domaine HLH (Cf. Figure 10 et 11) contribue à l'induction de

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

l'apoptose. L'activité pro-apoptotique serait influencée par la dimérisation du motif HLH avec p130Cas ou HEF1, et/ou par une interaction avec une molécule signal.

Par ailleurs, l'équipe de Golémis a démontré plus récemment que l'apoptose était induite suivant le niveau d'expression de *HEF1*. Il existe donc des seuils qui permettent d'induire les cellules en apoptose. En effet, si *HEF1* est faiblement exprimé ou au contraire si il est trop fortement exprimé les cellules sont alors bloquées et induite en apoptose.

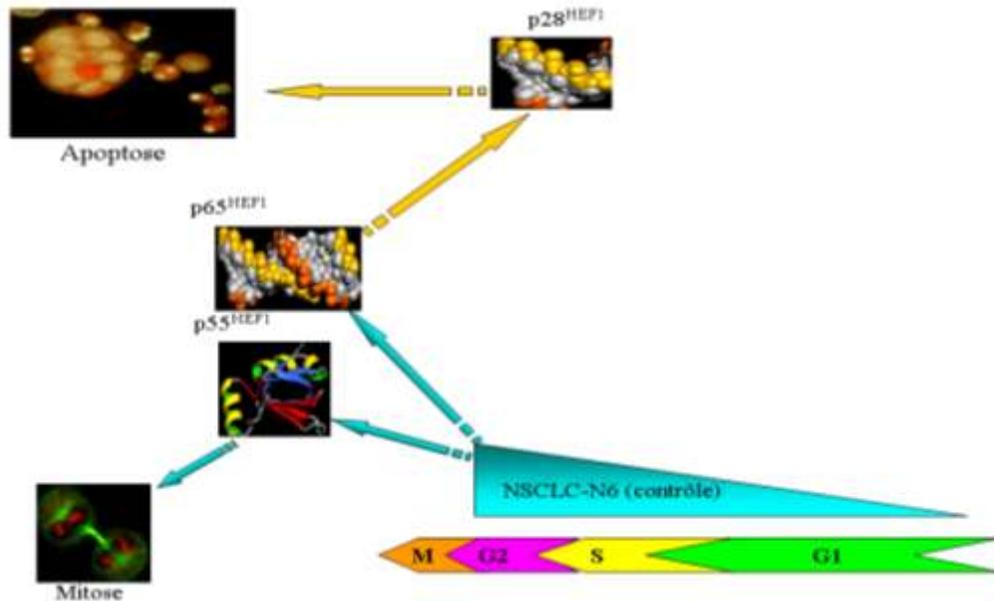


Figure 11 : Mécanisme du gène *HEF1*

IV.1.4.4- Implication dans la morphologie et la motilité cellulaire

Fashena *and al.* ont mis en évidence l'influence de la surproduction de *HEF1* sur la morphologie et la motilité cellulaire. (Fashena S.J. and al., 2002) Ils montrent d'importantes modifications morphologiques dès 4 à 6 heures après induction de l'expression de *HEF1* chez les cellules de cancer du sein MCF7. La microscopie optique met en évidence des cellules en forme de croissant de lune possédant des lamellipodes sur le bord antérieur, un hérissément de la membrane et un bord inférieur plus prononcé, similaire à la morphologie des cellules hautement motiles (Cooper M.S. and al., 1986). La détection par immunofluorescence met en évidence la présence de la protéine HEF1 principalement dans les lamellipodes au niveau des points de fixation de l'actine sur les sites d'adhésions focaux. (Fashena S.J. and al., 2002)

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

Les cellules tumorales effectuent des mouvements grâce à des fibres d'actine. La cellule passe au travers de la matrice extra cellulaire (ECM). Cette migration cellulaire implique une régulation très fine de l'organisation/désorganisation du cytosquelette, en coordination avec l'attachement à des éléments extracellulaires. La plus importante voie de régulation qui lie la signalisation par attachement à l'ECM via les intégrines, les modifications des fibres d'actine et la

Calvino Fernández M, Parra Cid T. voient diminuer très fortement leur capacité de migration in vitro. Ohashi and al. ont montré que l'expression de HEF1 contribue à la migration des cellules T suite à la ligation de CR3 et de $\beta 1$ intégrine. (Ohashi Y. and al., 1999) L'induction de HEF1 chez les cellules MCF7 permet d'augmenter la vitesse de déplacement ainsi que la quantité de déplacement. (Fashena S.J. and al., 2002) La production de la protéine HEF1 engendre aussi l'apparition des formes phosphorylées des kinases ERK et p38 (Fashena S.J. and al., 2002), elles même connues pour leur implication dans les processus de motilité cellulaire (Klemke R.L. and al., 1998) (Fincham V.J. and al., 2000) (Glading A. and al., 2000) (Zeigler M.E. and al., 1999). Les études menées sur les banques d'EST (expressed sequence tag) montrent une très faible différence entre des cellules témoins et des cellules surexprimant *HEF1*, ce qui suggère que l'induction de *HEF1* engendre une modification de l'expression génique uniquement chez un très faible nombre de gènes. (Fashena S.J. and al., 2002) Une augmentation du niveau de transcription a été mise en évidence pour des gènes impliqués dans la motilité cellulaire comme des membres de la famille des métallo-protéinases, des kinases associées à la motilité (MLCK, Nck-interacting kinase, Rhobinding kinase p160ROCK). Ces fonctions de motilité régulées par *HEF1* sont particulièrement importantes dans les processus de développement de l'organisme sain, mais aussi lors de la formation de métastases par les cellules cancéreuses. (McCawley L.J. and al., 1998) (Vu T.H. and al., 2000)

IV.2- Le gène B2

IV.2.1- L'ARN B2

Le gène *B2* a été découvert à partir d'une bande initiale de 180 pb isolée par « Differential Display ». La séquence de l'ARN *B2* superpose une partie de la séquence d'ADN génomique du gène *HEF1* situé sur le chromosome 6 dans la région p24-25 au niveau de l'intron 2 du gène *HEF1*. Au vu de son homologie avec l'ADN génomique du gène *HEF1*, notre équipe s'est intéressée à cet ARN. Tout d'abord, l'équipe a voulu le séquencer par la technique de « marche sur le chromosome » en utilisant pour matrice la séquence génomique de l'ADN du gène *HEF1*.

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

Ainsi en 2006, 13 400 pb de l'ARN B2 étaient connues, ne présentaient aucun cadre de lecture et ne codaient pour aucune protéine.

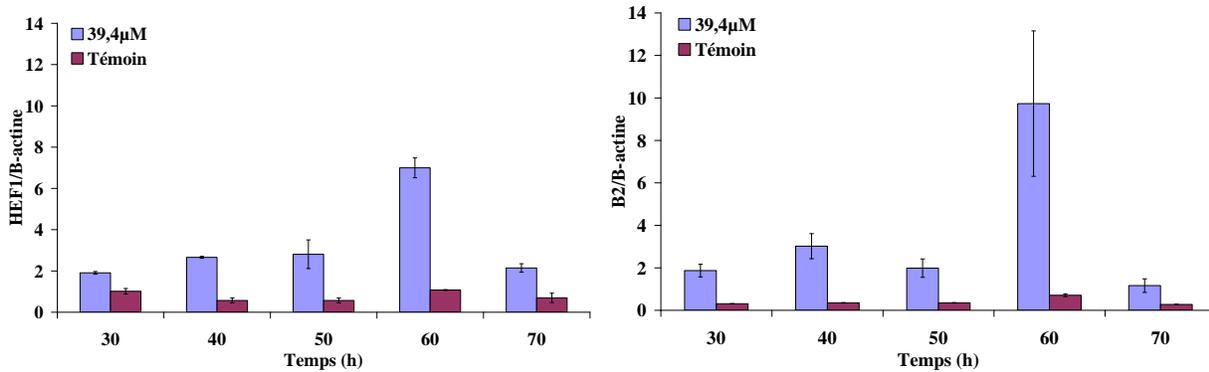


Figure 12 : Histogramme représentant l'évolution de l'expression des gènes *HEF1* et *B2* dans les cellules NSCLC-N6 sur 70 heures avec traitement ou non par la molécule cytotatique A190 à 39,4 µM.

Une étude de l'expression des gènes *HEF1* et *B2* par PCR quantitative sur les cellules NSCLC-N6 synchronisées en mitose manuellement témoins et traitées par une molécule cytotatique, A190 (39,4 µM) est effectuée. Cette étude a montrée que les deux gènes sont surexprimés après traitement. Cette surexpression est visible à partir de 30 heures de traitement et ce jusqu'à 70 heures. Il apparaît clairement un pic de surexpression des gènes *B2* et *HEF1* à 60 heures de traitement par la molécule cytotatique. (Cf. Figure 12) (Moreau D. and al., 2008) De plus, d'après une étude de cytométrie en flux, la molécule A190 bloque les cellules cancéreuses au niveau de la phase G1 et le pic de surexpression à 60 heures correspondait justement au temps que mettent les cellules synchronisées en mitose pour arriver jusqu'à la phase G1. Ceci confirmait donc l'hypothèse de l'existence d'une relation entre les deux gènes qui restait à définir.

Ainsi au vu de ses résultats, à savoir un ARN de plus de 13 000 pb, sans cadre de lecture, qui ne code pour aucune protéine mais qui présente une forte homologie avec l'ADN génomique du gène *HEF1* et un pic de surexpression à 60 heures pour les deux cibles, l'ARN B2 présente les caractéristiques d'un ARN non codant. De plus, selon la littérature de nombreux ARN non codants sont présentés comme des cibles potentiellement intéressantes pour de nouveaux traitements.

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

IV.2.2- Les ARN non codants

Les ARN messagers servent d'intermédiaire dans la synthèse protéique. Il existe néanmoins d'autres types d'ARN, issus de la transcription, mais qui ne subissent pas la traduction. Ces ARN sont fonctionnels par eux-mêmes, sans coder pour une protéine. Pour les distinguer des ARN messagers, ils sont appelés ARN non codants ou ARNnc.

A partir de 1961, il a été mis en évidence deux types d'ARN non codants : les ARN ribosomiques et les ARN de transfert. Ces ARN sont présents dans tous les organismes vivants et interviennent au niveau de la traduction. A partir de là, d'autres ARN non codants ont fait l'objet de découvertes voir de Prix Nobel de chimie comme en 1989 avec les ribozymes (ARNnc aux propriétés catalytiques), puis se succèdent les petits ARN nucléaires. Les petits ARN nucléaires (snARN ou ARN_{pn}) sont présents seulement chez les eucaryotes. Ils se trouvent dans le noyau et contiennent entre 100 et 200 nucléotides (environs comme l'ARNt). Ils ne sont jamais à l'état libre et toujours liés à des protéines. Ils ont une structure secondaire et tertiaire bien définie, à l'intérieur de complexes stables appelés «particules ribonucléo-protéiques nucléaire» ou RNP_{pn} (snRNP ou "snurp" en anglais). Leur rôle est d'intervenir dans la maturation des transcriptions primaires des gènes, mais également de transporter des ARNm vers le cytoplasme. Ainsi, les ARN nucléolaires qui peuvent guider une enzyme vers une base de l'ARN ribosomique. Puis en 2001 apparaît une nouvelle famille d'ARN impliqués dans la régulation de la traduction : les miARN. Cette nouvelle famille apparaît grâce à un nouvel outil la bio-informatique.

Mais il existe aussi les ARNs non codants de grandes tailles. Cette famille d'ARN en question ne présente pas de cadres de lecture. Cependant il peut présenter des introns et des exons.

A ce jour il existe plus de 100 familles d'ARN non codants connus et répertoriés dans les banques de données. Cependant pour ce travail nous préciserons uniquement deux familles qui nous intéressent par la suite ; les ARN non codants de grandes tailles qui correspondent à la structure de notre ARN B2 et les miRNA.

IV.2.2.1 - Les ARNs non codants de grandes tailles

Comme nous l'avons dit précédemment, il existe de nombreuses familles d'ARN non codants. Cette famille s'applique de manière générale aux ARNs d'une taille supérieure à plus de 10 Kb. (Eddy S.R., 2001) Ces ARNs non codants ont une activité au niveau du mécanisme de transcription soit comme antisens soit en superposant le gène transcrit. Leur fonction n'est pas toujours connue, souvent ce sont des ARNs qui interviennent au niveau de la régulation de

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

l'expression de gènes proches. Ils interagissent directement avec l'ADN ou la protéine qu'ils ciblent. Voici quelques exemples d'ARNs non codants :

SER3 isolé chez *S. cerevisiae* encode pour une enzyme qui catalyse une étape de biosynthèse de la sérine. Cependant Marten and al ont montré que la région régulatrice de ce gène continu à être transcrit même lorsque les conditions de répressions de ce gène sont effectives. (Martens J.A.and al., 2004) . En fait, une partie en amont et chevauchant SER3 de 500 pb nommé SRG1 (SER3 regulatory gene 1) est exprimée. Cette séquence va agir sur l'élément TATA qui alors devrait induire une répression de SER3. Ainsi, l'expression de SRG1 est nécessaire pour réguler SER3. Citons aussi, un gène toujours exprimé dans *S. cerevisiae* IME4, il est aussi régulé par deux antisens qui répriment alors le promoteur. Ce gène code pour une méthyl-transférase nécessaire pour la méiose dans les cellules diploïdes. Une étude récente a montré que dans les cellules humaines, un transcrit non codant issu du locus comprenant le gène DHFR qui se superpose au promoteur faible de ce dernier et induit la répression du promoteur fort par la formation d'un complexe ARN/ADN. Ainsi le complexe lié à la nucléique va conduire à la dissociation du complexe au niveau du promoteur fort. Ainsi, le mécanisme d'interférence de transcription permet de réguler le gène au niveau de son promoteur fort. (Martianov I.and al., 2007)

Les ARNs non codants evf-1 et evf-2 sont générés à partir d'une séquence intergénique hautement conservée entre Dlx-5 et Dlx-6 issus de cellules embryonnaires de cerveau de rat. evf-2 se localise après Dlx-6 et evf-1 commence après Dlx-5 inclut Dlx-6 et va au delà. Evf-1 inclut donc la région où se fixe dlx-2. Ainsi il a été démontré que l'expression de evf-1 est liée à celle du gène Dlx. Ainsi, dlx-5 et 6 génèrent aussi un ARN non codant, evf-1 qui pourrait être stabilisé par l'interaction avec dlx ou alors evf-1 pourrait séquestrer un inhibiteur de transcription. (Kohtz J.D.and al., 2004)

Mais nous pouvons aussi citer le premier ARN non codant découvert : H19. (Brannan C.I.and al., 1990) . Il est exprimé dans les keratinocytes de l'homme. Il induit une délétion agissant sur IGF2 (insulin- growth factor 2). (Pachnis V.and al., 1988) (Leighton P.A.and al., 1995) . L'action de ce type d'ARNnc s'effectue lors de son expression qui induit la répression de gènes codant des protéines sur le brin complémentaire à celui-ci. Cet ARN suscite tout particulièrement notre attention puisqu'il est impliqué au niveau de l'activité suppresseur de tumeur dans certains types de cancers. Il aurait le rôle biologique d'être un précurseur des miRNA qui alors régulerait

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

négativement d'autre ARNm. L'un des miRNA qu'il crée, permettrait d'agir sur des facteurs de croissance ou leur récepteur. (Cai X. and al., 2007) Par ailleurs, notons Air un autre ARNnc non épissé de 108 Kb qui agit aussi comme un « silencer » sur 3 gènes codants pour des protéines du cluster igf2r (Insulin Growth Factor 2). (Seidl C.I. and al., 2006, Sleutels F. and al., 2002)

Un autre exemple d'ARN non codant de grande taille : l'ARN NTT. NTT est un ARN non codant de 17 kb qui ne présente aucun cadre de lecture de plus de 270 bp et est polyadénylé. Il est situé sur le chromosome 6 dans la région q23-q24 à proximité du récepteur de l'interféron γ qu'il régule. Cette localisation suggère une éventuelle relation entre les deux dans les cellules T. L'hypothèse posée est que NTT, au cours du développement des cellules T, pourrait influencer la chromatine dans la région ou en réponse à l'activité de l'interféron γ ou d'autres gènes qui ont un rôle important sur les cellules T activées. (Liu A.Y. and al., 1997)

Il en existe bien d'autres répertoriés dans la littérature comme Xist, ARN nucléaire qui inactive le chromosome X de la femelle. (Rastan S., 1994) (Brown S.D., 1991) IPW isolé du syndrome de Prader et Willi qui induit une délétion au niveau d'un gène du chromosome 15. (Wevrick R. and al., 1994) Dans le cadre du cancer du poumon non à petites cellules, un ARN non codant de grande taille est cité MALAT-1. MALAT-1 est un ARN non codant de 8kb qui se localise sur le chromosome 11 et le locus q13. Il est fortement exprimé dans le poumon, le pancréas et d'autres organes sains aussi bien que dans le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules. Sa séquence est bien conservée entre les espèces, ce qui indique une fonction potentiellement importante. D'autre part il serait un facteur de pronostic défavorable dans le cancer CBNPC puisqu'il indiquerait le haut risque de développer des métastases. (Ji P. and al., 2003) Voici un tableau récapitulatif des différents ARN non codants de grandes tailles et de leurs fonctions supposées.

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

Tableau 6 : Exemple d'ARN non codants de grandes tailles chez l'organisme eucaryote. Extrait de la publication Costa. (Costa F.F., 2005) Les ARNs non codants de grandes tailles sont encerclés en rouge.

Non-coding transcript	Organism	Size (nt)	Genome map	Function	References
Small RNAs	Yeast	21 and larger	Unknown	Chromatin structure, RNAi-mediated heterochromatin formation	Reinhart and Bartel, 2002; Motamedi et al., 2004
roX1	<i>Drosophila</i>	3742	X	Dosage compensation	Meller et al., 2000
roX2	<i>Drosophila</i>	1293	X	Dosage compensation	Meller et al., 2000
RIAN	Mouse	5249	12	Genomic imprinting	Hatada et al., 2001
BORG	Mouse	2840	Unknown	Bone differentiation	Takeda et al., 1998
miR-375	Mouse	22	Unknown	Regulation of insulin secretion	Poy et al., 2004
miR-196	Mouse	22	Unknown	Pos-transcriptional regulation of HOXB8 in embryo development	Yekta et al., 2004; Mansfield et al., 2004
GADD7	Hamster	300–800	Unknown	Tumor suppressor features, DNA damage activated	Hollander et al., 1996
ADAPT33	Hamster	990–1460	Unknown	Stress-inducible, apoptosis related	Wang et al., 1996, 2003
NTAB	Rat	4397	3	Unknown	French et al., 2001
BIC	Human	800–1700	21q21	T cell specific transcript	Haasch et al., 2002
XIST	Human	17,000	Xq13.2	X chromosome inactivation	Rastan, 1994
TSIX	Human	40,000	Xq13.2	X chromosome activation	Lee et al., 1999
AIR	Human	108,000	6q26	Genomic imprinting	Sleutels et al., 2002
KHPS1a	Human	1290	10q32.3	DNA demethylation	Imamura et al., 2004
NTT	Human	17,000	6q23–q24	T cell specific transcript	Liu et al., 1997
NRSE	Human	20 dsRNA	Unknown	Neural stem cell differentiation	Kuwabara et al., 2004
miR-143	Human	22	5	Adipocyte differentiation	Esau et al., 2004
SRA	Human	700–850 and 1300–1500	5q31.3	Transcription co-activator	Lanz et al., 1999
GTL2/MEG3	Mouse/human	1252/2993	12/14q32	Genomic imprinting	Wylie et al., 2000; Takada et al., 2000
H19	Mouse/human	1899/2700	7/11p15.5	Genomic imprinting, post-translational regulation, cell morphogenesis and differentiation	Brannan et al., 1990; Paulsen et al., 1998; Lottin et al., 2002b; Adriaenssens et al., 2002
BC1/BC200	Mouse/human	152/200	7/2p16	Neural development, brain normal function and longevity	DeChiara and Brosius, 1987; Martignetti and Brosius, 1993; Lewejohann et al., 2004
let-7	Human and others	21-25	Human cr 22	Embryo development, tissue-specific functions	Pasquinelli et al., 2000

Les chercheurs ne sont pas d'accord sur les différentes fonctions de régulateurs associés aux ARNs non codants. Leurs tailles varient de 100 à des milliers de bases. Certains sont épissés d'autres pas. Les différences entre eux sont donc aussi nombreuses alors pourquoi n'auraient ils pas de nombreuses fonctions possibles ?

IV.2.2.2- Les mi RNA et ARN interférence

Les ARN interférents symbolisés ARNi sont de petits ARN qui permettent d'inhiber l'expression de gènes cibles. Le phénomène d'ARNi, depuis 1990, prend de plus en plus d'importance dans le monde de la biologie. Différentes étapes ont permis d'aboutir à la découverte et à la compréhension de ce mécanisme. La première manifestation du phénomène d'ARNi fut observée par l'équipe de Richard Jorgensen en 1990. Ce chercheur travaillait sur les mécanismes de coloration des pétunias et souhaitait intensifier la couleur des pétales. Pour cela, il introduisit dans l'organisme une copie du gène CHS (chalcone synthase), responsable de la coloration des fleurs. Contre toute attente, il observe que 42% des fleurs dans lesquelles le gène CHS a été introduit sont blanches (contre 9% des fleurs contrôle) ou anormalement pales. Ainsi, il a démontré qu'en introduisant ce gène CHS qui est un ARNi, pouvait inhiber l'expression d'un gène.

L'ARNi est aussi étudié dans le cadre de la médecine et de l'aspect thérapeutique de maladies diverses : infections virales, cancers, maladies neuro-dégénératives... Toutes ces pathologies restent aujourd'hui sans traitements efficaces et ont souvent une origine inconnue. L'ARNi, qui est au stade expérimental du point de vue thérapeutique, constitue un véritable espoir dans le cadre des thérapies de ces pathologies. Ce n'est qu'en 2004 que les premiers tests sur l'humain ont été effectués.

Au premier abord, il semblait peu probable que le mécanisme de l'ARNi fonctionne chez les vertébrés. En effet, l'introduction de tout types d'ARN étrangers à cet hôte dans les cellules de mammifères déclenche une forte réaction antivirale non spécifique, appelée réponse interféron. Il y a induction de la synthèse d'interféron de type I et activation de deux types d'enzymes : la protéine PKR et la 2',5'oligoadenylate synthétase. L'activation de ces voies bloque la synthèse des protéines cellulaires et provoque une dégradation non spécifique des ARN messagers dans les cellules atteintes. Ceci a pour but de bloquer la répllication de particules virales et de protéger les cellules voisines (McManus M.T.and al., 2002)

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

Les premiers résultats intéressants ont résulté des travaux des groupes de Carthew et de Sharp sur les extraits d'embryons de drosophile. Ils ont mis en évidence que l'extinction des gènes de façon séquence-spécifique avait lieu au niveau post-transcriptionnel et que la déstabilisation de l'ARN messager ciblé était provoquée par l'assemblage d'un complexe nucléasique au niveau de l'ARNm qui provoquait sa dégradation. (Dalmay T. and al., 2000) (Kennerdell J.R. and al., 1998) En 2001, Sayda M. Elbashir montre que le phénomène existe chez les mammifères. Dans cet article, l'équipe démontre *in vitro* que de petits fragments d'ARN inhibent rapidement, facilement et spécifiquement l'expression des gènes endogènes dans différentes lignées de cellules mammifères, y compris dans les cellules embryonnaires de rein humain et les cellules HeLa. L'équipe a mis en évidence que la nature de la réponse cellulaire était contrôlée par la taille de l'ARN introduit. De ce fait, l'introduction directe dans les lignées de cellules de mammifères de courts oligonucléotides (de 21 à 23 bases) pouvait bloquer spécifiquement l'expression du gène ciblé sans déclencher de réponse antivirale de type interféron (Elbashir S.M. and al., 2001) . Il apparaît alors une voie potentiellement intéressante à explorer pour le traitement de maladies encore incurables.

Depuis les années 1990, et particulièrement depuis 2001, un grand nombre de chercheurs s'intéresse au phénomène de l'ARNi pour tenter de mieux comprendre ce mécanisme. Cependant, certains points restent inexplicables : on ne sait actuellement pas pourquoi l'extinction de l'expression du gène n'est que partielle. Depuis 2001, le phénomène prend aux yeux des chercheurs un caractère universel. De nombreux laboratoires travaillent aujourd'hui en utilisant le phénomène d'ARNi, notamment dans la détermination de la fonction d'un gène.

IV.2.2.2.1- Mécanisme de l'ARNi

Dans l'état actuel des connaissances, le processus de l'ARNi consiste en deux étapes distinctes :

- La phase d'initiation : elle consiste en la production des petits ARN interférents à partir du brin d'ARN exogène. De façon intéressante, ces ARN interférents ne sont pas exprimés de façon endogène chez les mammifères.

- La phase effectrice : elle met en jeu une activité nucléasique qui détruit l'ARNm ciblé en le coupant. Elle est commune à tous les organismes. (Ketting R.F. and al., 2001)

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

IV.2.2.2.1.1- Mécanisme de la phase d'initiation

Les ARNs forment des structures en tiges boucles afin de se stabiliser dans la cellule. Ces structures forment donc des ARN doubles brins (ARNdb). Or Le phénomène de l'ARNi est initié par la reconnaissance de l'ARNdb par un complexe nucléasique. Ce complexe découpe cet ARNdb en petits fragments de 21 à 25 nucléotides avec des extrémités 3' symétriques comportant 2 nucléotides sortants. Grâce aux études réalisées sur la drosophile, on peut caractériser cette activité enzymatique capable de reconnaître et de découper l'ARNdb. Cette activité est assurée par une ribonucléase de la famille de la RNase III appelée Dicer. (Bernstein E.and al., 2001)

a) L'Enzyme Dicer

Cette enzyme, très conservée tant chez le nématode *C. elegans* que chez les mammifères, est localisée dans le cytoplasme, ce qui implique que l'ARNi est de façon prédominante, un processus cytoplasmique. (Bernstein E.and al., 2001) La protéine Dicer se compose d'un domaine ARN hélicase dans sa région N-terminale, un motif de liaison à l'ARNdb dans sa région C-terminale (dsRBD), un domaine PAZ, deux domaines ARNase III. (Cf. Figure 13) (Jaronczyk K.and al., 2005, Tahbaz N.and al., 2004) . (Blaszczyk J.and al., 2001)



Figure 13 : Structure de l'enzyme Dicer

L'équipe de Bernstein a pu caractériser en 2001 l'existence de deux types de Dicer chez la drosophile. Des mutations sur le gène Dicer-1 empêchent l'inhibition de la traduction de l'ARNm alors que des mutations sur Dicer-2 perturbent la dégradation des certains ARNm. Cependant chez les mammifères, un seul type de Dicer a été découvert. (Jiang F.and al., 2005) De plus, on savait que Dicer-2 se liait à une protéine R2D2 (R2 car elle a deux sous-unités et D2 pour Dicer-2), il a été récemment découvert que R3D1 se fixe de la même manière à Dicer-1. (Lee Y.S.and al., 2004)

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

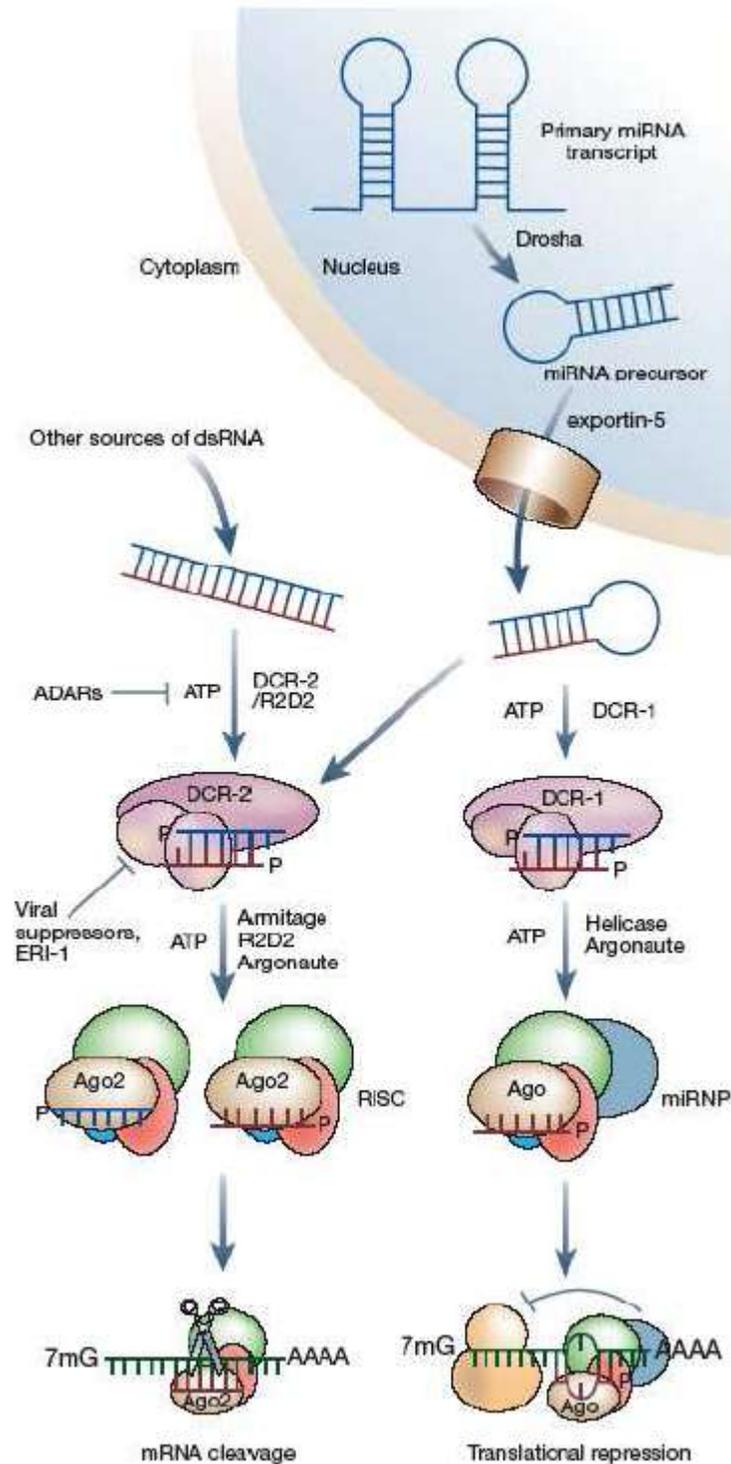


Figure 14 : Deux voies de l'ARNi : par les siARN ou par les miARN. La voie de l'ARNi peut être médiée par des siARN (à gauche) ; l'enzyme dicer-2 (DCR-2) s'associe à R2D2. Ou bien la voie d'ARNi empreinte l'utilisation des miARN (à droite) ; Dicer-1 (DCR-1) lie cette fois-ci R3D1. (Lee Y.S. and al., 2004)

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

b) Fonction nucléasique de Dicer : formation des siARN

La fonction principale de Dicer est de cliver l'ARNdb en petits fragments. Pour remplir cette fonction, Dicer doit reconnaître l'ARNdb et s'y lier. Dicer semble être synthétisé dans le réticulum endoplasmique, du moins pour le Dicer humain, ce qui procure une augmentation de sa spécificité. Dicer est capable de discriminer les ARNdb devant être rendu silencieux de ceux issus des gènes qui sont essentiels pour la traduction et autres processus. Une fois l'ARNdb reconnu, Dicer n'a pas besoin de Mg^{2+} pour s'y fixer, en revanche ce cation est indispensable pour le clivage. De plus, ces ions stabilisent la dimérisation Dicer/ARNdb.

Dicer se compose de deux domaines catalytiques, d'où un clivage des deux brins de l'ARN fixé tous les 22 nucléotides d'intervalle. Les fragments sont appelés small interfering ARN (siARN). Dicer clive l'ARNdb préférentiellement à ses extrémités. L'efficacité du clivage dépend de la longueur de l'ARNdb. Dicer reste liée au produit de clivage, ce qui ralentit l'activité enzymatique. (Cf. Figure 14 côté gauche)

c) Production des miARN par Drosha et Dicer

Dicer est également impliquée dans la production d'une autre classe de petits ARN, appelés miARN. (Ma Z.L. and al., 2003) Du fait de leur petite taille, les miARN sont longtemps passés inaperçus dans les processus classiques de purification d'ARN. Ils ont été identifiés, il y a une dizaine d'années chez le ver *C. elegans*. Par la suite, ils ont été bien décrits chez *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* et *Homo sapiens*. De façon remarquable, certains miARN sont très conservés au cours de l'évolution, ce qui suggère une fonction biologique importante. (Kim R. and al., 2006) La maturation des miARN fait intervenir au moins deux protéines apparentées à l'ARNaseIII : Dicer, comme dit précédemment, et Drosha. (Zeng Y. and al., 2005) Cette dernière appartient chez l'Homme à un gros complexe multiprotéique contenant de nombreuses hélicases et protéines du sarcome d'Ewing. Elle peut aussi être associée à DGCR8 (alias Pasha), une protéine se liant aux ARNdb. (Zeng Y. and al., 2005) Elle intervient dans le nucléoplasme où elle convertit un transcrite primaire (pré-miARN) en un ARN ayant une forme d'épingle à cheveux d'environ 70 nucléotides, on parle alors de pré-miARN. Ce dernier est pris en charge par Dicer qui façonne un intermédiaire de maturation transitoire nommé miARN. Seul un brin formera le miARN mature, généralement, celui dont l'extrémité 5' est la moins appariée.

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

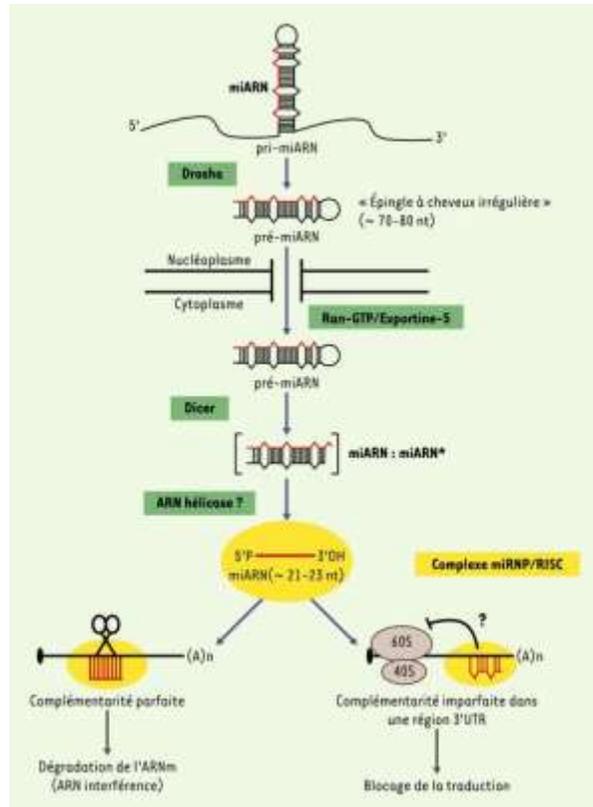


Figure 15 : Biosynthèse des miARN. La maturation des miARN fait intervenir deux enzymes, Drosha et Dicer, qui, à partir d'un ARN précurseur en tige boucle imparfaite produisent un ARN simple brin d'environ 21-23 nt: le miARN. Ce dernier s'associe alors avec des protéines pour former le complexe RISC/miRNP. Ce complexe RISC/miRNP - dont la composition protéique commence à être élucidée (eIF2C2, Gemin3, Gemin4, FMRP...) - s'apparie avec des ARNm via le miARN. Si la complémentarité est imparfaite, il y a blocage de la traduction alors que si la complémentarité est parfaite, il y a destruction de l'ARNm cible (c'est l'ARN interférence). (Cavaillé J., 2004)

Drosha et Dicer sont deux enzymes intervenant dans la maturation du miARN. A partir d'un ARN précurseur en tige boucle imparfaite ces enzymes produisent un ARN simple brin d'environ 21-23nucléotides. (Cavaillé J., 2004) (Cf. Figure 15)

Il semblerait que d'autres facteurs participent à cette biosynthèse, notamment l'exportine 5 qui assure le transport du pré-miARN du noyau vers le cytoplasme. Depuis 2002, plusieurs groupes se sont focalisés sur l'identification des séquences pouvant former des boucles et générer ces petits ARN de 21-23 nucléotides. (Tuschl T.and al., 1999) Leurs efforts ont conduit à l'identification d'environ 250 miARN chez l'Homme mais il est probable que ce nombre sera bientôt largement dépassé. Les premiers miARN découverts furent lin-4 et let-7, des « small temporal ARN » (st ARN) qui interviennent dans le contrôle du développement de l'animal. La molécule d'ARN lin-4 (lineage-abnormal-4) régule négativement les gènes du développement lin-14 et lin-28. Plusieurs travaux suggèrent qu'elle exerce une répression post-transcriptionnelle en se

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

fixant au niveau de séquences homologues situées dans la région 3'UTR des ARNm. D'une façon similaire, let-7 (lethal-7) est un régulateur transcriptionnel négatif qui cible les régions 3' UTR du messenger lin-41. (Banerjee D. and al., 2002) D'autres miARN peuvent être cités comme par exemple isy qui cible cog (gène déterminant l'asymétrie neuronale) chez *C. elegans*. Chez la drosophile miR-14, bantam et miR-2, entre autres, contrôlent la prolifération et/ou la différenciation cellulaires en modulant l'expression de gènes pro apoptotiques tel que hid (Brennecke J. and al., 2003) . Chez les mammifères, certaines cibles restent inconnues ; c'est le cas de l'ARNm attaqué par miRNA-181. (Chen C.Z. and al., 2004)

La phase d'initiation se termine en aboutissant à la production de petits fragments, siARN ou miARN.

IV.2.2.2.1.2- Mécanisme de la phase effectrice : RISC

Le but de cette étape est d'aboutir à l'inhibition de l'expression de gènes ciblés. Les siARN ou miARN, après avoir été produits grâce à Dicer, vont par la suite guider le complexe effecteur endonucléasique RNA-Induced Silencing Complex (RISC) sur l'ARNm homologue à détruire.

Le complexe RISC a été identifié à partir d'embryons de drosophile sous la forme d'un complexe précurseur de 250 kD par le groupe de Zamore (Matranga C. and al., 2005) . Il se compose de plusieurs domaines. (Scadden A.D., 2005)

Cette protéine peut varier selon les espèces. Néanmoins, la protéine Ago2 est très conservée entre les espèces. Son homologue chez l'homme est le facteur d'élongation eIF2C, initialement caractérisé par son association aux ribosomes et son rôle dans la traduction des protéines. La protéine argonaute/eIF2 est basique et a un poids moléculaire d'environ 100 kD. De plus, sa nature dans le complexe influence la fonction de RISC. En effet, dans les RISC s'associant aux siARN, on retrouve l'Argonaute Ago1 alors que dans les RISC contenant les miRNA on trouve Ago2. (Parker J.S. and al., 2004, Parker J.S. and al., 2005)

- le domaine PAZ de RISC s'apparierait avec le domaine PAZ de Dicer grâce au facteur R2D2 ou R3D1 ; cela permettrait alors de lier l'ARN simple brin. (Jaronczyk K. and al., 2005)

- le domaine Piwi en C-terminal une hélicase permettant de dissocier l'ARNdb engendré entre le miRNA et l'ARN cible. Celle-ci est ATP-dépendante. (Jaronczyk K. and al., 2005)

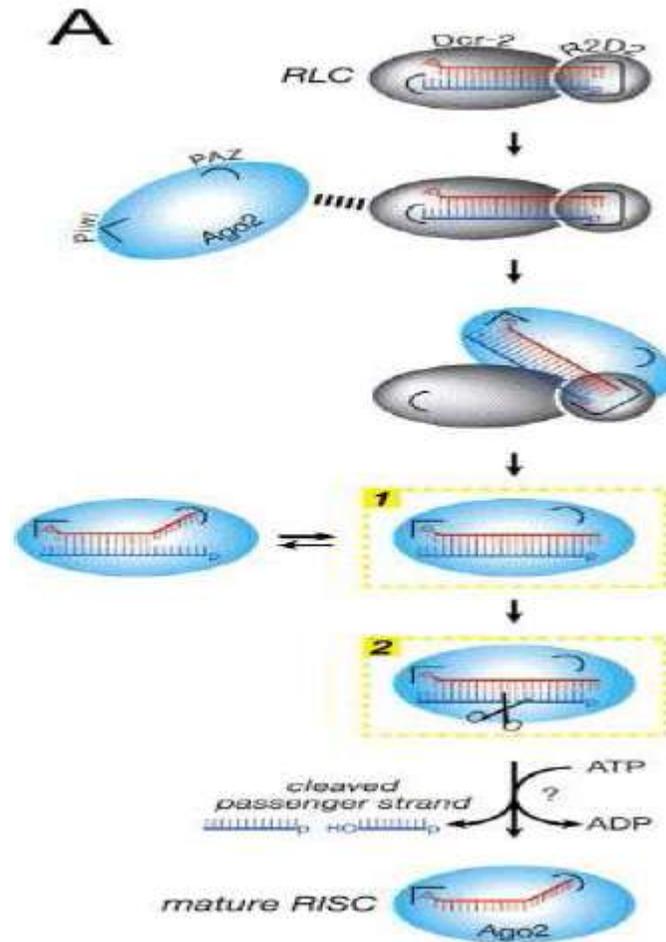


Figure 16 : Mode d'activation du complexe RISC.

Dicer (ici Dcr-2) et sa protéine associée (ici R2D2) sont liés au siARN double brin. Le domaine Ago-2 du complexe RISC reconnaît tout d'abord Dicer puis R2D2. Ensuite, Ago-2 clive le brin bleu. On obtient alors la forme active de RISC avec le simple brin. Elle peut maintenant aller reconnaître l'ARNm cible. (Zamore P.D. and al., 2000) (Cf. Figure 16)

IV.2.2.2.2- Deux mécanismes d'action : dégradation d'ARNm ou inhibition de la traduction

Une fois activé, RISC est guidé par l'ARNi vers l'ARNm auquel il se fixe. Une différence fondamentale entre les siARN et les miRNA réside dans la force de la liaison du fragment à l'ARNm cible. En effet, contrairement à la liaison des siARN sur leur séquence cible, la liaison du miRNA est imparfaite et forme une zone de mésappariement. Ceci a pour conséquence d'aboutir à deux mécanismes d'action différents. Dans le cas des siARN, il y a destruction de l'ARNm ; le siARN est fixé par RISC sur une région codante de l'ARNm cible. La fixation des

Étude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

miRNA sur l'ARNm se fait de manière imparfaite sur une région 3' non codante, donc cela a pour conséquence de bloquer la traduction du gène et d'empêcher la synthèse de la protéine correspondante.

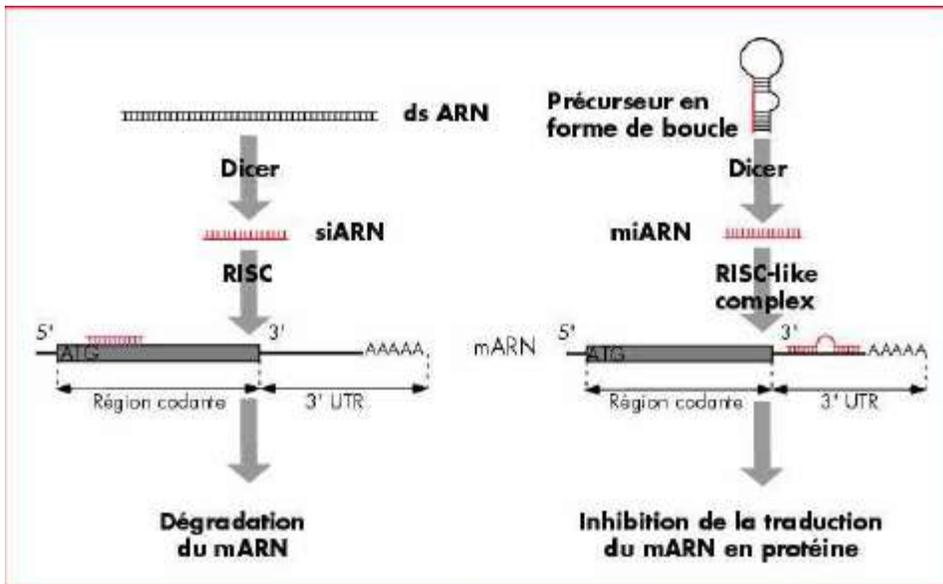


Figure 17 : Comparaison des mécanismes d'action des siARN et des miRNA.

Le siARN généré par l'action de l'enzyme Dicer se lie, par l'intermédiaire du complexe RISC, sur une région codante d'un ARN messager. La parfaite complémentarité de séquence entre le siARN et l'ARN messager provoque la dégradation de ce dernier.

Le miRNA est généré à partir d'un précurseur en forme d'épingle à cheveux par l'enzyme Dicer. Il est reconnu par un complexe qui ressemble au complexe RISC. Celui-ci provoque la liaison du miRNA au niveau des régions 3' non codantes d'un ARN messager pendant la régulation post-transcriptionnelle correspondant à l'épissage alternatif. La liaison imparfaite du miRNA au niveau du messenger provoque son inhibition post-transcriptionnelle et empêche la synthèse de la protéine correspondante. (Cf. Figure 17)

Finalement, l'appariement entre ARNm et siARN crée une région de l'ARNdb activant le système de défense naturel de la cellule contre les virus (présentant fréquemment des ARNdb). Cela peut donc présenter également un intérêt pour lutter contre les virus. L'endonucléase de RISC clive alors l'ARNm. L'ARNm étant détruit, la protéine normalement codée par cet ARN ne peut plus être synthétisée. Ainsi, la molécule hybride ARNm/miRNA associée au complexe RISC va engendrer l'inhibition de la traduction du gène. (Cf. Figure 18)

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

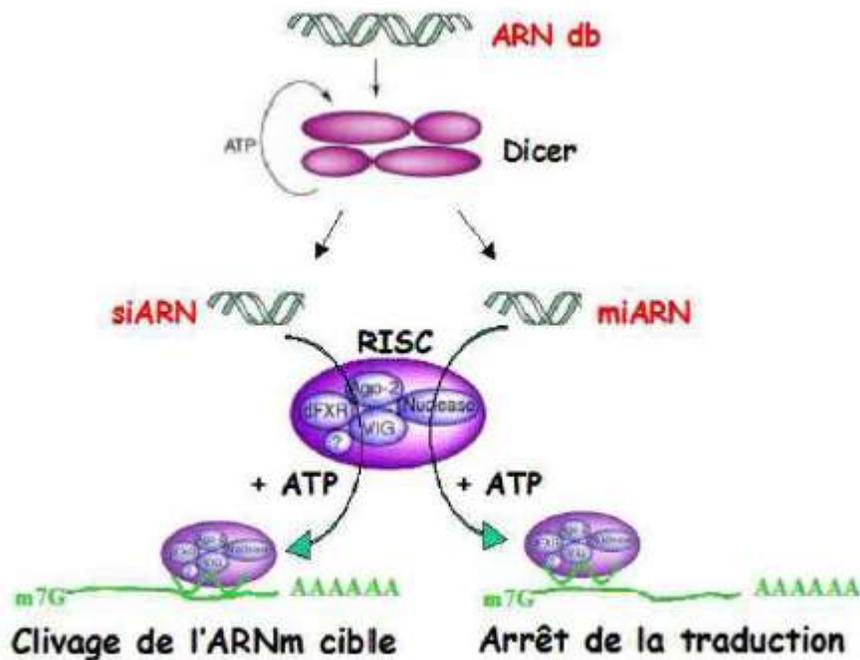


Figure 18 : Fonctionnement classique de la machinerie de l'ARN interférence. L'ARN double brin est reconnu et clivé par Dicer en siARN et miRNA. Ces petits ARN se lient ensuite à RISC formant ainsi un complexe, activé par de l'ATP, qui se lie à l'ARNm cible. <http://www.biotech-medecine.com/archives/review27/actu>

Il existe des similitudes importantes dans le mécanisme d'action des siARN et des miRNA. Ainsi, il est possible que l'ARNi soit la voie ancestrale visant à contrôler les pathogènes qui aurait évolué vers le mécanisme des miRNA pour contrôler les propres gènes de la cellule. Empêcher la traduction de l'ARNm plutôt que le détruire pourrait être un meilleur moyen d'en moduler l'expression. Ainsi la phase effectrice se termine. Quelque soit la méthode employée (siARN ou miRNA), le résultat final reste le même : l'expression d'une protéine est inhibée.

IV.3- Mise en situation du sujet de thèse

La gravité du cancer bronchique réside surtout dans sa très forte mortalité plus que dans le nombre de cas diagnostiqués annuellement. Il est l'un des rares cancers pour lequel la proportion de décès est pratiquement identique au nombre de cas diagnostiqués. En effet, il se caractérise par un temps de doublement particulièrement long pouvant atteindre plusieurs mois. Cette caractéristique fait qu'il est très réfractaire aux traitements actuels qui ciblent en priorité les cellules en croissance rapide. L'échec des thérapies, la grande toxicité et la chimiorésistance associée à la chimiothérapie actuelle, incitent les scientifiques à développer de nouvelles molécules, de nou-

Etude bibliographique : Les cibles potentielles impliquées dans le cancer broncho-pulmonaire

velles cibles moléculaires et donc de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ce type de cancers. Dans ce but, le laboratoire utilise un modèle cellulaire qui se rapproche le plus des caractéristiques des tumeurs primaires des patients par sa p53 mutée et son temps de doublement qui est lent.

Ainsi, l'équipe a voulu découvrir de nouvelles voies de régulations en utilisant le « differential Display ». par cette technique le laboratoire a découvert l'ARN B2 de 13 400 pb, ne codant pour aucune protéine, et sans cadre de lecture et dont aucune extrémité n'étaient définies (Jacquot and al. 2004).

De plus, cet ARN se situe dans la même région du chromosome 6 que le gène *HEF1* et présentent un pic de surexpression à 60 heures comme *HEF1* lorsque les cellules NSCLC-N6 sont traitées par une molécule cytostatique A190.

Face à ce contexte, il était nécessaire d'une part de déterminer la taille définitive de cet ARN B2. D'autre part, la bibliographie nous apporte beaucoup de renseignements sur le gène *HEF1* et notamment sur son expression qui varie selon les tissus. Etant donné que *B2* et *HEF1* sont surexprimés simultanément au bout de 60 heures de traitement par une molécule cytostatique (A190) dans le modèle expérimentale NSCLC-N6, il était important de vérifier si l'expression de *B2* suit l'expression de *HEF1* dans d'autres tissus.

Enfin face aux nombreuses caractéristiques intéressantes de cet ARN non codant de grande taille, *B2*, nous voulions démontrer à la fois sa relation avec le gène *HEF1* ainsi que d'évaluer son rôle de régulateur par l'induction éventuelle de miRNA.

Afin de démontrer ces nombreux points, nous avons utilisé de nombreuses techniques de biologie moléculaire comme la RT-PCR, la technique de la « marche sur le chromosome » afin de séquencer l'ARN B2, la Race PCR (Rapid Amplification of CDNA end) pour déterminer les extrémités d'un gène mais aussi la PCR en temps réelle pour quantifier l'expression des gènes dans des conditions données. De plus, au vu de la taille de l'ARN B2, nous avons envisagé qu'il serait coupé en miRNA pour réguler différents gènes. Dans ce but, nous avons utilisé des banques de données sur les miRNA disponibles sur le net.

Ainsi lors de ces 3 ans, nous avons étudié la relation entre les gènes *B2* et *HEF1* et tenté de démontrer par quel mécanisme l'ARN B2 pouvait moduler l'expression du gène *HEF1*.

Matériel et méthodes

Chapitre I. Approche méthodologique.

Lors de nos expérimentations, deux modèles cellulaires ont été employés. La lignée NSCLC-N6 qui a véritablement servi de base à nos études et une autre lignée de cancer pulmonaire, la lignée A549. Cette dernière a permis de confirmer les résultats obtenus sur la lignée NSCLC-N6 ou de valider les techniques utilisées.

I.1-Les Lignées cellulaires :

Deux lignées cellulaires ont été utilisées pour nos travaux, A549 provenant d'un adénocarcinome et NSCLC-N6 (L16) provenant d'un cancer du poumon épidermoïde. (Roussakis C. and al., 1991)

I.1.1-La lignée NSCLC-N6

La lignée NSCLC-N6 ou encore appelée L16 est issue d'une biopsie prélevée avant tout traitement sur un patient de 67 ans atteint d'un cancer broncho-pulmonaire de type épidermoïde classé T2N0M0. (Roussakis C. and al., 1991) Le fragment tumoral est mis en suspension dans un liquide physiologique supplémenté en antibiotiques et en sérum. Il est ensuite injecté en sous cutané chez des souris *nude* (dépourvue d'immunité). Ce processus permet de stabiliser les caractéristiques phénotypiques de la lignée avant la mise en culture *in vitro*. En effet sans cette étape, les cellules aboutiraient à une mort cellulaire massive par apoptose. La modification brutale de l'environnement cellulaire entrainerait leur mort immédiate. Pour éliminer l'éventuel mélange entre cellules humaines et cellules murines, un clonage a été effectué. C'est le clone 16 qui a été sélectionné.

Cette lignée a pour caractéristique d'être polyploïde possédant 62 chromosomes. Les analyses cytogénétiques ont confirmé que ces chromosomes étaient tous d'origine humaine. Le temps de doublement de la lignée est de 48 heures *in vitro* et 12 jours *in vivo* après xenogreffe chez la souris *nude*. (Roussakis C. and al., 1991) C'est une lignée moyennement différenciée, rarement kératinisée et hétérogène qui a permis l'isolement de 4 clones. Ces clones diffèrent par leur degré de différenciation, leur temps de doublement et leur chimio sensibilité. (Siavoshian

S.and al., 1998) De plus, il se rapproche fortement des cellules cancéreuses *in vivo* par le fait que sa p53 est muté comme dans la majorité des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (Roussakis C.and al., 1991) (Cf. Figure 19)

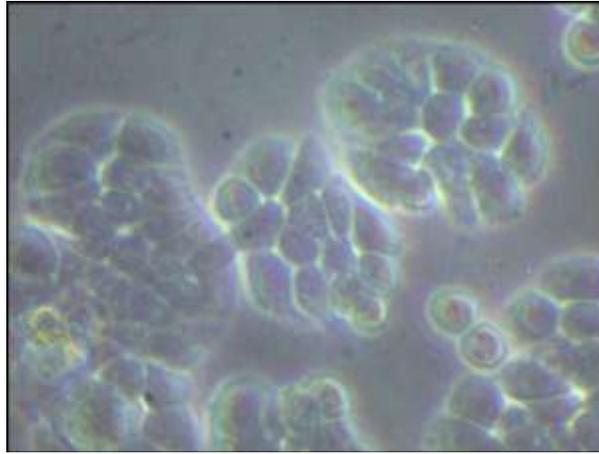


Figure 19 : A droite, observation microscopique (x200) de la lignée NSCLC-N6 en croissance dans le milieu RPMI supplémenté en sérum et antibiotique, fixée sur support solide.

I.1.2-La lignée A 549

Il s'agit d'une lignée déposée par le National Cancer Institute 185) (NCI), issue d'un adénocarcinome pulmonaire prélevé chez un patient de 58 ans. (Giard D.J.and al., 1973) Elle est hypotriploïde et possède 24% de cellules à 12 chromosomes, 22% à 64 chromosomes, les autres cellules étant diploïdes. Ces cellules présentent une morphologie épithéliale et se développent en monocouche. La lignée est tumorigène chez la souris *nude* et possède la particularité d'exprimer un gène p53 de type sauvage. (Hall A.R.and al., 1998) Cette lignée possède un temps de doublement *in vitro* plus faible que celui de NSCLC-N6 de 12 à 20 heures. Cette lignée est communément utilisée par les laboratoires de recherche étudiant le cancer du poumon non à petites cellules. (Cf. Figure 20)

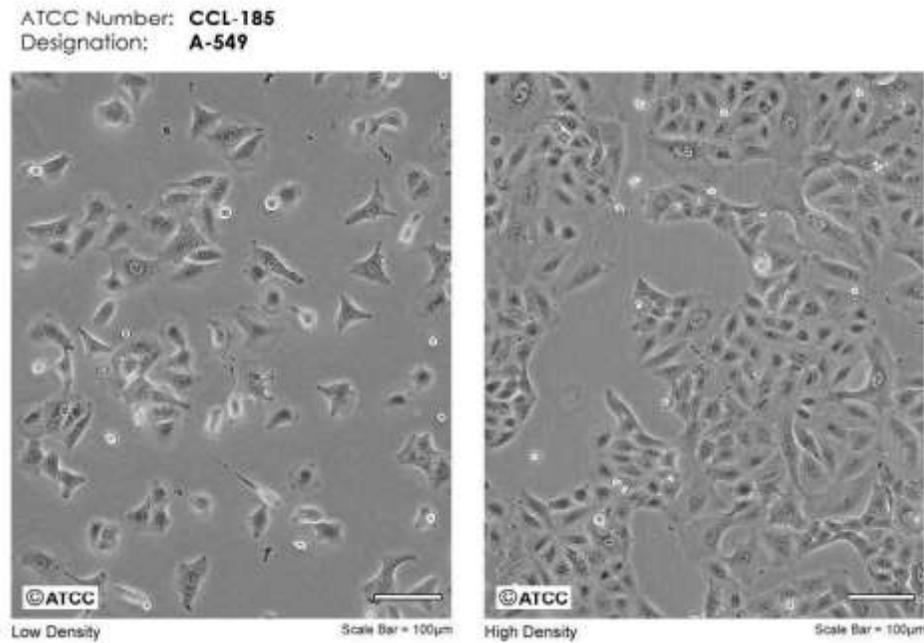


Figure 20 : Observation microscopique (x200) de la lignée A549 en croissance en milieu RPMI, fixée sur support solide. Extraite d'un site web : <http://www.atcc.org/Attachments/1753.jpg>.

I.1.3- L'entretien des lignées

Ces deux lignées sont cultivées en milieu Rosewel Park Memorial Institute (RPMI 1640) supplémenté par 100 U de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 2 mM de glutamine et 5% de sérum de veau fœtal confinées dans des flasques à bouchon filtrant. Les cellules en cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C avec une atmosphère contenant 5% de CO₂. Ces cellules sont adhérentes au support et doivent donc être décollées du support avant repiquage par la trypsine. Avant chaque repiquage (toutes les 72 heures environ), les cultures cellulaires sont rincées à l'aide de PBS (Eurobio) puis mises en contact avec 2 ml de trypsine pendant 5 min. L'action de la trypsine est stoppée par ajout de 5 ml de milieu de culture. Après un comptage des cellules, une flasque estensemencée avec la quantité désirée de cellules. Les amas cellulaires sont séparés à l'aide d'une seringue stérile par aspiration – rejet. Une partie de la suspension cellulaire est transférée dans une nouvelle flasque. Le milieu de culture est changé deux heures après chaque repiquage. Pour la lignée L16, afin de travailler sur un matériel cellulaire d'un phénotype équivalent au phénotype initial de la lignée primitive, toutes les expériences sont réalisées avec des cultures n'excèdent pas 40 passages.

I.1.4-La synchronisation des cellules NSCLC-N6

Nous avons fait le choix de travailler avec des cellules synchronisées, c'est-à-dire des cellules qui se trouvent pour une grande majorité dans une même phase du cycle. En effet, d'après la bibliographie nous savons que les gènes cibles étudiés sont exprimés à différents niveaux du cycle cellulaire. Par conséquent, si les cellules se trouvent dans différentes phases du cycle, il sera difficile de mettre en évidence l'expression génique de ces cibles. Les premiers essais d'étude des ARN messagers réalisés sur des cellules non synchronisées ont montré une variation importante des résultats.

Ainsi nous avons décidé de synchroniser systématiquement les cellules NSCLC-N6 pour étudier la quantification de l'expression des gènes cibles. Cette synchronisation s'effectue sans traitement chimique qui pourrait interférer avec les traitements réalisés. Nous savons que les cellules qui entrent en mitose, présentent les microtubules qui se dépolymérisent et libèrent des dimères de tubulines qui seront réutilisés pour la construction du fuseau mitotique. Les cellules qui entrent en mitose perdent alors leur cytosquelette et prennent une forme arrondie. Elles n'adhèrent alors plus que faiblement au fond de la boîte de culture pendant toute la durée de la mitose. Les cellules ayant achevé leur mitose reconstituent leur cytosquelette et adhèrent à nouveau au fond de la boîte lorsqu'elles rentrent en phase G1. Il est donc simple de récupérer et d'isoler les cellules en mitose, par simple agitation de la boîte de culture. Les cellules se décrochent et se trouvent en suspension dans le milieu. Ainsi elles peuvent être récupérées par centrifugation douce, avant d'être replacées en culture. Les cellules ainsi synchronisées sont conservées et utilisées sur 4 à 5 passages (trypsination) seulement. Au delà elles se désynchronisent.

Par ailleurs, il est important de préciser que seul le modèle expérimental NSCLC-N6 est synchronisable avec cette technique. La lignée A549 ne peut être synchronisable qu'avec des drogues antimitotiques.

I.2-La molécule cytostatique utilisée A190

A190 est une triazine de synthèse produite et fournie à notre laboratoire par l'équipe du Professeur E. Antoniadou-Vyza, du département de synthèse chimique de la Faculté de Pharmacie d'Athènes. Sa dénomination chimique est 4,6-diamino-1,2-dihydro-1-(4"-chlorophenyl)-2-(1-tricyclo [3.3.1.1^{3,4}] decyl-1,3,5-triazine dont la structure chimique est donnée figure 21. Elle

nous est fournie sous forme lyophilisée et peut être directement dissoute dans l'eau ou du milieu de culture des cellules.

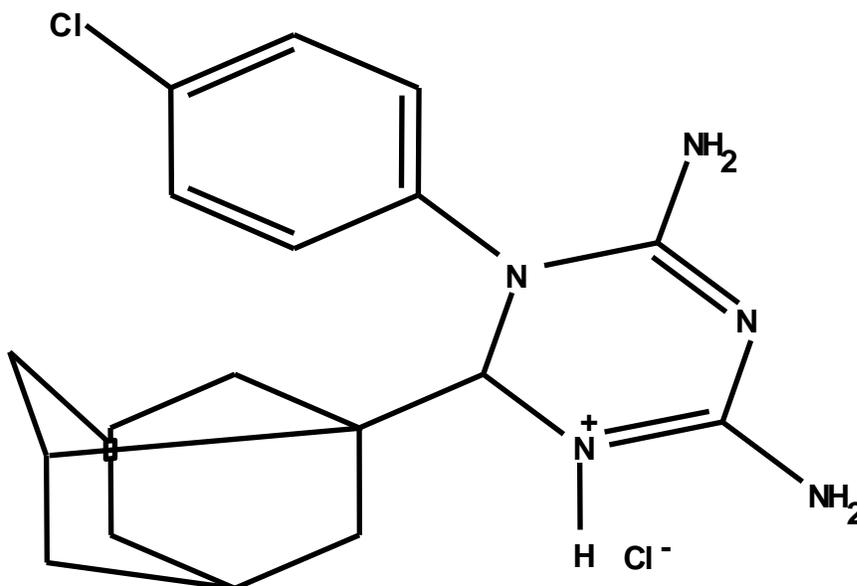


Figure 21 : Structure chimique de A190 (PM : 344,86)

Cette molécule brevetée par le laboratoire présente une activité cytostatique intéressante pour nos études sur les lignées NSCLC-N6 et A549 du cancer broncho-pulmonaires non à petites cellules. Les cinétiques réalisées par l'équipe ont montrées un net ralentissement de croissances des cellules traitées dès 24h de traitement et un plateau est atteint à 48 heures de traitement. Cette molécule présente donc une activité cytostatique avec un effet dose très net observée pour les deux lignées.

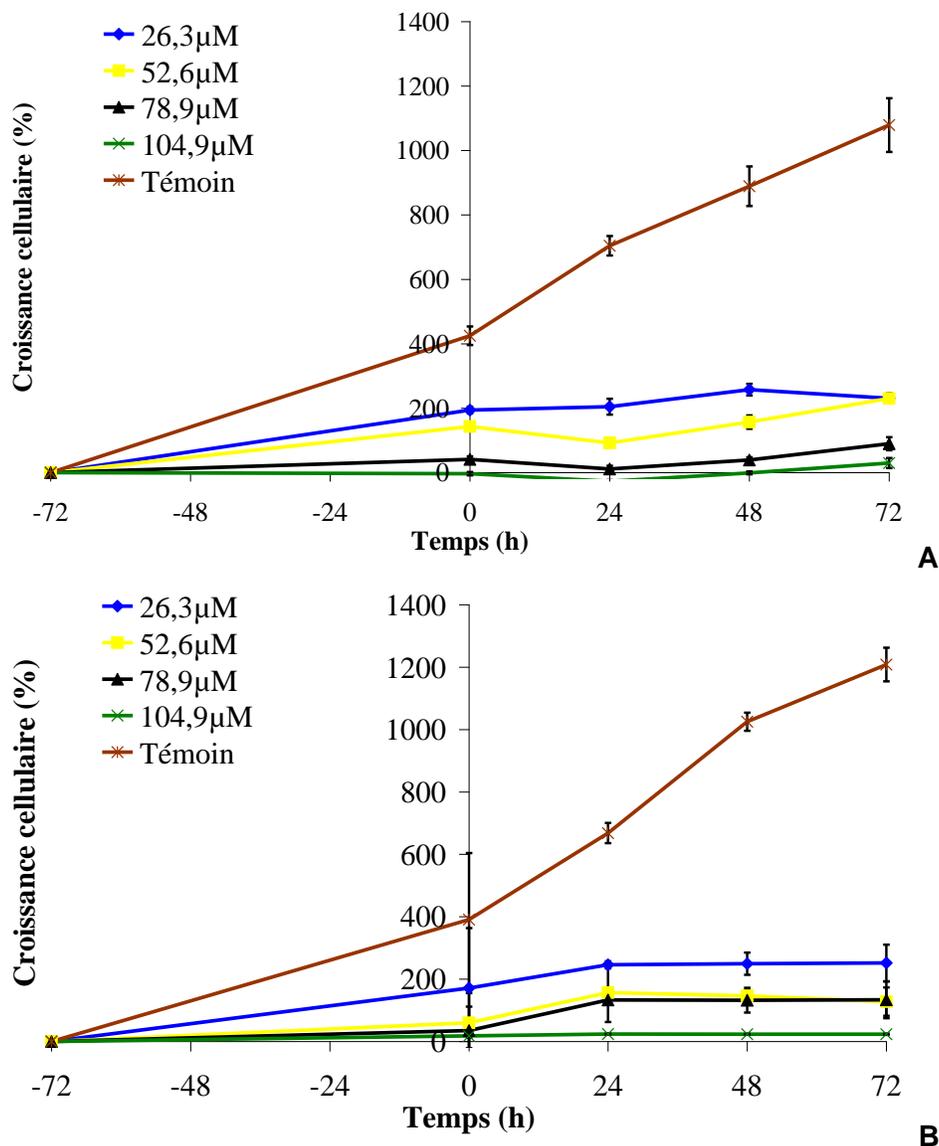


Figure 22 : Cinétiques de croissance discontinues sur cellules traitées par A190 à différentes concentrations réalisées sur les deux lignées de cancer bronchopulmonaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b)

Les cinétiques de croissance discontinues sur les cellules NSCLC-N6 et A549 avec la molécule A190 ont confirmé que l'activité cytostatique est irréversible. Ainsi une CI_{50} est associée à chacune des deux lignées testées. La lignée NSCLC-N6 présente une CI_{50} de 39,4 μM et la lignée A549 à une CI_{50} de 52,6 μM . Ainsi pour les prochaines études nécessitant le traitement par la molécule A190, les cellules seront mises en contact avec cette molécule soluble dans l'eau ou dans le milieu de culture à une concentration équivalente à la CI_{50} pendant 48 à 72 heures selon l'expérience. (Cf. Figure 22)

L'activité cytostatique irréversible de la molécule implique que les cellules traitées sont bloquées dans l'une des phases du cycle cellulaire de façon irréversible. L'analyse des cellules traitées et non traitées par cytométrie en flux (Cf. Figure 23) prouve que les cellules sont bloquées en G1 par le traitement des cellules avec A190.

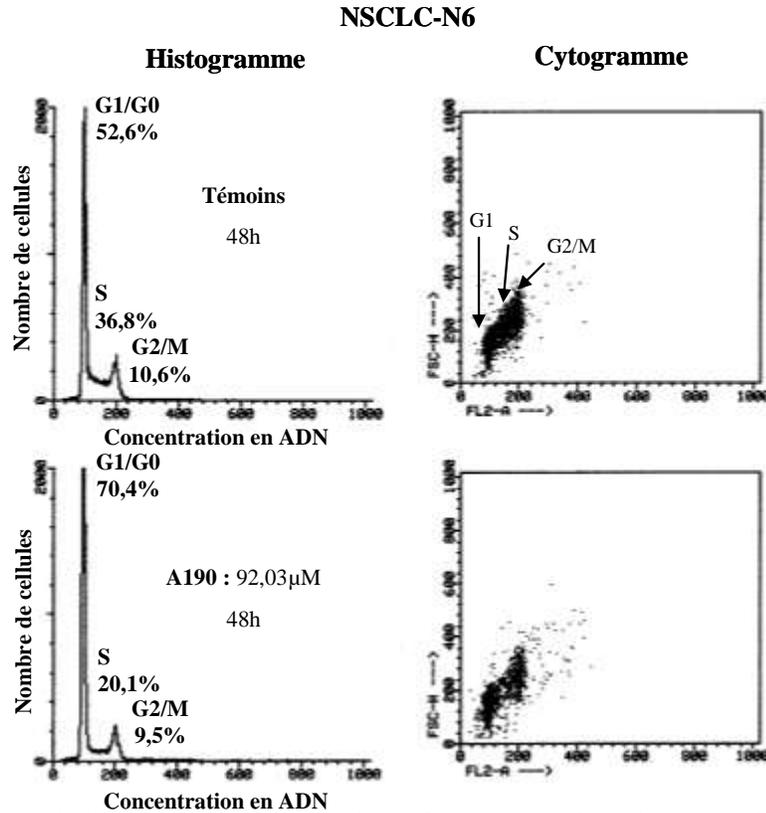


Figure 23 : Résultats de l'étude en cytofluorimétrie en flux. Comparaison des proportions de cellules NSCLC-N6 (non synchronisées) dans les différentes phases du cycle cellulaire, lors d'un traitement par A190 pendant 48h à 92,03 μM.

Ainsi le laboratoire possède une molécule cytostatique A190 intéressante pour le traitement du cancer broncho-pulmonaire à petites cellules qui va nous permettre d'étudier les relations entre les cibles moléculaires *HEF1* et *B2*.

Chapitre II – Etude des cibles moléculaires

II.1-Extraction d'ARN et séparation des ARN cytoplasmiques et nucléaires

Les ARN totaux sont extraits à partir des deux lignées utilisées au laboratoire : NSCLC-N6 (L16) et A549 par la technique classique qui utilise le Trizol® (Invitrogen, CA, USA) et du chloroforme selon les indications du fournisseur. La qualité et la quantité des ARN sont déterminées par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm. L'intégrité des ARN totaux est vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1 % contenant 0,01% de Bromure d'Ethidium (BEt) dans du tampon TAE (Tris 40 mM, Acetate de Sodium 20 mM et EDTA 1 mM) et la migration est réalisée dans le tampon TAE 0,5 X a 100 V pendant 10 minutes et visualisée sous lampe ultraviolette. Les ARN sont ensuite conservés à – 80°C.

Lorsque les ARN cytoplasmiques et nucléaires sont séparés, le même protocole d'extraction d'ARN est utilisé. Cependant des étapes préliminaires sont nécessaires. En effet, les cellules adhérentes au support sont lavées avec du PBS froid et décollées sans trypsine. Elles sont ensuite transférées dans des tubes coniques et centrifugées 5 minutes à 1000 rpm puis remise en suspension avec un tampon de lyse (Tris Hcl 50 mM pH 8.00, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM et 0.5 % nonidet P-40). Ce tampon permet de lyser la membrane cytoplasmique des cellules et uniquement celle-ci. Les cellules sont incubées quelques minutes sur glace. Les échantillons sont ensuite centrifugés 5 min à 13 000 g. Le surnageant contenant le matériel cytoplasmique libéré par le tampon de lyse est récupérés et transféré dans un nouveau tube.

Le culot contenant les débris cellulaires et le matériel nucléaire, est lavé (deux fois) avec du tampon PBS puis une solution de SDS 20% est ajoutée dans chaque fraction (surnageant et culot) et homogénéisé par retournement ou en vortexant. La protéinase K à 20 mg.ml finale est ajoutée dans chaque échantillon qui est incubé pendant 15 min à 37 °C. La protéinase K, qui permet de digérer des protéines et d'enlever des contaminants de préparation d'acides nucléiques. Elle inactive les ADNases et ARNases et son activité est stimulée par agents dénaturants comme le SDS.

II.2-Traitement DNase :

Étant donné que nous travaillons sur une matrice ARN, il est indispensable que celle-ci soit totalement dépourvue de contaminant ADN. En effet, L'ARN B2 possède une forte homologie à l'ADN du chromosome 6. Dans ce but, les échantillons ARN sont traités à la TURBO™ DNase (Ambion) avant d'effectuer la RT-PCR selon les indications du fournisseur. La DNase est ensuite inactivée par le tampon Inactivation pendant 2 min puis centrifugé à 10 000 g pendant 1 à 2 min. Un culot blanchâtre est alors observable, il contient l'enzyme mais aussi les débris d'ADN génomique. Le surnageant qui contient les ARN purs est alors soigneusement transféré dans un nouveau tube et conservé à -80°C. Une fois le traitement Dnase effectué l'étape de reverse transcription peut être commencée.

II.3- La reverse transcription

Les ADNc sont synthétisés à partir d'ARN totaux et d'amorces aléatoires. Le mélange contient des désoxyribonucleotides triphosphate (dNTP), ribonucléase inhibiteur recombinantes (RNAsin), tampon 5X (Promega) , Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase (Promega) et des amorces aléatoires (random primer).

Chaque reverse transcription est effectuée sur une quantité de 1 à 1,5 µg d'ARN dans un volume final de 10 µl d'eau de qualité « RNase free » contenant 0,125 µg/µl d'amorces aléatoires random primers (Promega). Les ARN sont linéarisés à 70°C pendant 10 min puis mis sur glace afin de conserver cette linéarisation. Après cette étape de linéarisation, un mélange de désoxyribonucléotides 8 mM, 1 X de M-MLV (Tris HCL 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 Mm et DTT 50 mM), 25 unités de RNAsin ribonucléase inhibiteur recombinante, et 200 U de M-MLV Reverse transcriptase sont ajoutées aux échantillons d'ARN linéarisés. Puis le mélange est complété à 10 µl avec de l'eau de qualité « RNase free ».

Des tubes contrôles sont préparés. En effet, les ADNc sont synthétisés en présence (+RT) et en absence (-RT) de transcriptase inverse, ceci permet de contrôler une éventuelle contamination des échantillons d'ARNs totaux par l'ADN génomique non éliminés par le traitement Dnase. Ce tube contrôle contenant exactement tous les réactifs et la matrice excepté la M-MLV est effectuée. Les échantillons sont incubés pendant 2 heures à 37°C. Les cDNA peuvent être testés par PCR ou conservés à -20°C.

II.4- La Polymérase Chain Reaction (PCR)

La technique de PCR mise au point par Mullis en 1985 permet d'amplifier des fragments d'ADN de taille spécifique. Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases à températures différentes :

->La dénaturation qui consiste en un chauffage à 95°C : les liaisons faibles qui assurent la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN ;

-> L'hybridation des amorces sur l'ADN simple brin par appariement des bases complémentaires à 40-65°C ;

-> L'élongation ou synthèse de l'ADN se fait à la température spécifique de l'amorce qui est de 72°C. Les amorces forment le point de départ de la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice. La polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléotides. Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice.

Ce cycle de températures est répété n fois et permet d'amplifier de façon exponentielle la séquence encadrée par les deux amorces.

Chaque amplification est réalisée sur 2 µl d'ADNc préparé précédemment en présence de 2,5 µl de tampon de réaction 10 X (Quiagen), 0,4 µl de dNTP (10 mM) (Promega), 2 µl de chaque amorce sens et antisens (10 mM) (Sigma Genosys) et 0,25 µl d'enzyme TAQ (Quiagen) dans un volume finale de 25 µl.

Les conditions d'amplification en thermocycleur (MJ Research) sont les suivantes : le premier cycle de PCR est à une température de 94 C pendant 3 min. Afin de déshybrider les ADNc, puis se succèdent 39 cycles composés d'une étape de déshybridation de l'ADNc à 94°C, d'une étape d'hybridation des amorces à la TM spécifique du couple pendant une minute et d'une étape d'élongation à 72 C pendant une minute.

Les produits de PCR sont évalués et quantifiés en déposant 7 µl sur un gel d'agarose à 1% dans lequel est incorporé par du bromure d'éthidium (BET). La migration se fait pendant 20 min à 65 V. Le gel est ensuite visualisé sous UV. La taille et la quantité des fragments amplifiés sont évaluées par un marqueur de taille semi-quantitatif (SMART Ladder. Eurogentec).

II.5-La RACE PCR

La technique Rapid Amplification of cDNA end (RACE PCR) consiste à ajouter sur l'extrémité 5' d'un ADNc obtenu par synthèse spécifique, un enchaînement de résidus cytidine (oligo dC). L'amplification du fragment inconnu est utilisée par PCR en utilisant un oligo dG comme amorce sens (du côté 5') et un oligo R2 en antisens (à l'extrémité 3') spécifique de l'ARNm. Cette amplification ne permet pas toujours de connaître la totalité de l'extrémité 5' de l'ARNm mais nous révèle néanmoins une fraction de séquence supplémentaire du message d'intérêt. Deux amorces spécifiques sont déterminées à partir de la zone connue du message : R1 permet la transcription inverse spécifique, R2 est utilisé lors des PCR ancrées ultérieures pour amplifier le fragment RACE dont voici les séquences d'amorces choisies pour R1 et R2 notés respectivement : B2 17 et B2 17 NR. (Cf. Figure 24 et Tableau 7)

Tableau 7 : Séquences des amorces antisens pour la technique de RACE PCR sur l'extrémité 5'.

Nom	Séquence de l'amorce	Tm
B2 17 NR	5'- TAAGATGGCAAAATGAAA-3'	60°C
B2 17 R	5'-AGACATGGCCTCTATCAGCTAGG-3'	60°C

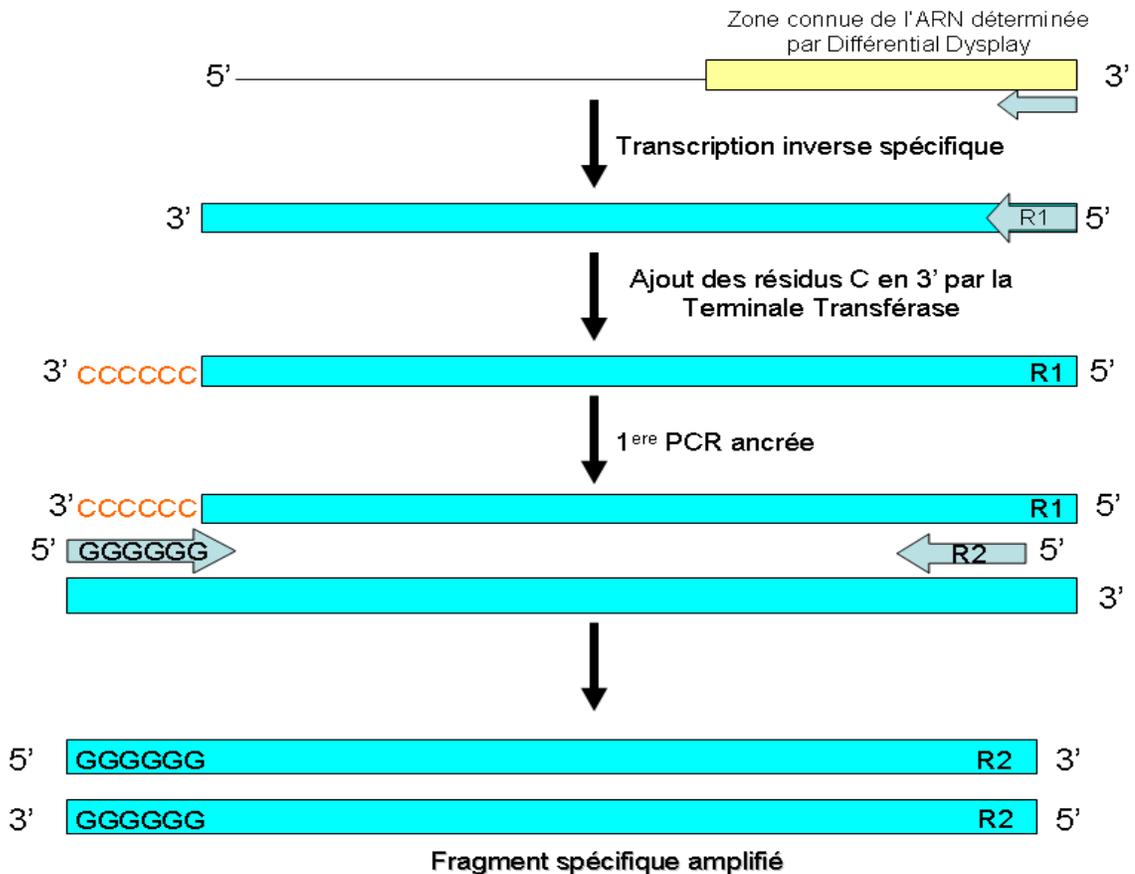


Figure 24 : Technique de race-PCR.

II.5.1-Une reverse transcription spécifique

Elle est réalisée à partir des ARN totaux (ARNt)issus de la lignée L16 et/ou A549. La réaction se fait dans un thermocycleur selon les conditions suivantes.

-1 μ g d'ARNt

-2,5 μ l de primer R1 (1 μ M)

Ce mélange est effectué dans un volume final de 8,5 μ l. il est dénaturé à 65°C pendant 10 minutes puis incubé à la température d'hybridation de l'amorce R1 (T_m = 60°C) pendant 10 min.

Il est ajouté :

- 4 μ l de tampon spécifique de la reverse transcriptase à 5x (Promega) (Tris HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 Mm et DTT 50 mM)

- 4 μ l de dNTPs (10 mM) (Promega)

- 20 U de Rnase inhibiteur (Promega)
- 2 µl de DDT (100 mM)
- 200 U de MMLV

La réaction s'effectue à 37°C pendant 50 minutes et se termine par une dénaturation des enzymes à 70°C pendant 15 minutes.

II.5.2-Ajout des résidus C en 3'

La réaction s'effectue en ajoutant :

- 6 µl de tampon de réaction 5X (500 mM cacodylate buffer pH 6,8, 5 mM CoCl₂, 0,5 mM DTT) (Promega)
- 3 µl de dCTP (2 mM)
- 1 µl de terminale transférase (10 U/ µl) (Promega)

Le mélange est effectué dans un volume final de 20 µl et est incubé pendant 15 minutes à 37 °C puis 10 minutes à 70 °C.

II.5.3-PCR ancrées

Deux PCR ancrées successivement sont nécessaires pour obtenir un rendement d'amplification suffisant. Elles sont réalisées dans un volume final de 50 µl comprenant :

- 6 µl d'ADNc purifiés
- 5 µl de tampon de réaction 10x (Promega)
- 2,5 µl dNTPs (10 mM)
- 2 µl d'amorce R2 (10 µM)
- 2 µl d'oligo dG(10 µM)
- 2,5 UI de Taq Polymérase (Promega)

Les cycles sont les mêmes que ceux d'une PCR classique

Les amplicons sont passés sur gel d'agarose 1%, purifiés (section 344) puis séquencés.

II.6-Purification du produit de PCR sur gel d'agarose

Les produits de PCR (50 µl) sont déposés sur un gel d'agarose 1 %. Après 1 heure de migration à 65 V un puits est découpé au scalpel dans le gel juste avant la bande purifiée (visualisée sous UV). Une partie du tampon de migration est enlevée de façon à ce qu'il en reste suffisamment pour permettre la migration tout en asséchant la surface du gel. Le nouveau puits est rincé puis rempli avec 150 à 200 µl de TAE 1X propre. Un voltage de 100 v est appliqué pendant 45 secondes à une minute, juste le temps que l'échantillon PCR migre jusqu'au puits. Le TAE contenant l'échantillon est alors récupéré et soumis à une précipitation par l'EtOH 100 %, NaOAc 3M et du glykogène. Le mélange est placé au moins 45 min à -80°C, puis centrifugé à 12 000 g pendant 30 min. Le culot est alors lavé deux fois à l'éthanol 70% froid et centrifugé 10 min à 10 000 g, puis séché et re-dissous dans 10 µl d'eau stérile ou du TE. La concentration de l'échantillon est appréciée par une nouvelle migration en gel d'agarose 1% et évalué par rapport à un marqueur de taille semi quantitatif (SMART Ladder. Eurogentec)

II.7-Séquençage des fragments réamplifiés après RACE PCR ou PCR .

Les fragments réamplifiés par PCR sont envoyés à séquencer sous forme de produit de PCR purifié ou cloné dans le vecteur pGEMT Easy (Promega) (Cf. Figure 25). Ce plasmide possède en effet de chaque côté de son site de clonage la séquence complémentaire d'une amorce universelle (T7 ou SP6). Ces deux séquences permettent en réalisant un séquençage double brins de reconstituer la séquence complète du fragment cloné.

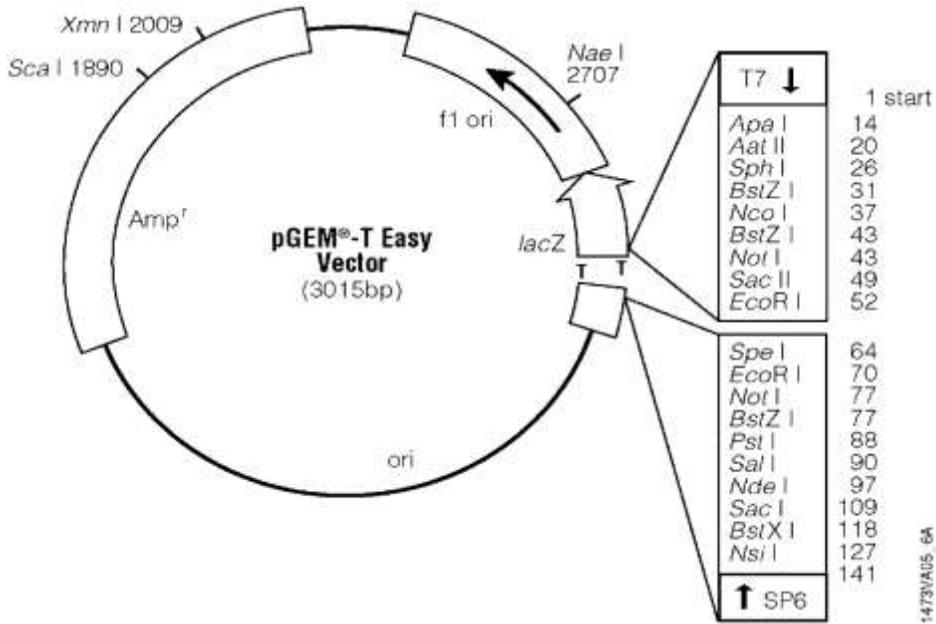


Figure 25 : Schéma du vecteur pGEMT Easy (Promega). Image extraite du site Promega sur le vecteur d'amplification pGEMT Easy vector.

II.7.1-Clonage dans le vecteur pGEMT Easy

Le vecteur pGEMT Easy est spécialement adapté au clonage des produits PCR. Pour l'étape de ligation de l'insert dans le vecteur et pour la transformation des bactéries compétentes JM109, le protocole préconisé par le fournisseur du vecteur (Promega) a été scrupuleusement suivi. Schématiquement il se déroule ainsi :

J0 : ligation de l'insert sur 12 heures en respectant un ratio de concentration insert/vecteur de 3/1

J1 : Transformation des bactéries JM109 par choc thermique à 42 °C et étalement sur boîte de Petri LB (Luria Broth) à laquelle est ajoutée l'ampicilline à 0.1 mM/ml ,de l'IPTG (0,5 M) (Eurobio) et du X-Gal (80 µg/ml) qui permettent la sélection des colonies ayant intégré le plasmide. Les colonies qui ont intégré le plasmide sont blanches alors que les autres sont bleues.

J2 : les colonies blanches contenant le vecteur et l'insert sont sélectionnées. Ces colonies apparaissent blanches car l'insert a décalé le cadre de lecture du gène lac Z. De ce fait, le gène codant pour la β-galactosidase n'est pas activée. L'activité β-gal n'est pas révélée en présence du substrat X-Gal. Ainsi le X- Gal n'est pas réduit en composé bleu.

II.7.2-Extraction d'ADN plasmidique et vérification de la ligation

Il existe deux techniques permettant de vérifier que le plasmide a bien intégré le vecteur voulu :

- Il est possible d'effectuer une PCR avec les amorces spécifiques de l'extrémité de l'insert dans les conditions classique de PCR déjà citées en II-4 puis analysés sur gel d'agarose 1% contenant du Bet.

- Mais il est possible de vérifier la bonne insertion de l'insert dans le plasmide en réalisant une extraction selon la technique de mini préparation en utilisant le kit mini-prep (Quiagen), après avoir mis en culture la veille, dans du LB+ 100 µg/ml d'ampicilline les colonies bactériennes. Afin de vérifier que la ligation de l'insert s'est correctement effectuée, un volume de produit cloné est digéré par une enzyme de restriction possédant un site de coupure de chaque côté du site de ligation.

Conditions de digestion :

- 1 µl de l'extrait plasmidique « mini- prep »
- 1 µl de tampon de reaction 10 X
- 10 U d'enzyme

Le mélange effectué dans un volume final de 10 µL est incubé une heure à 37 °C et la digestion est visualisée sur gel d'agarose 1% contenant 0,5 µg/ml de Bet.

II.7.3-Séquencage

Le séquençage est sous-traité à une société Millegen (Montpellier, France). Les séquences obtenues sont analysées par un Blast sur le NCBI. (Www. Ncbi.com)

II.8-Panel d'ARN

Nous avons utilisé un panel ARN commercial « firstchoice® human total RNA survey panel » (ambion) qui comprend 20 tissus de 10 µg final d'ARN totaux pour chaque tissu. Les ARNs utilisés sont issus de 3 donneurs humains dont la cause du décès est connue et n'altère absolument pas l'organe concerné. Les ARNs sont certifiés RNase free. Les 20 tissus sélectionnés sont :

- la vessie
- la thyroïde
- les testicules
- l'ovaire
- l'œsophage
- les muscles squelettiques
- le cerveau
- le cœur
- la trachée
- le col utérin
- le colon
- le poumon
- le placenta
- la rate
- le petit intestin
- le rein
- le thymus
- le tissu adipeux
- le foie
- la prostate

La technique de RT-PCR est utilisée pour l'étude de l'expression de *B2* dans les différents tissus de la collection « firstchoice® human total RNA survey panel » (Ambion). Les différents tissus sont testés avec des amorces spécifiques de *B2* et de *HEF1*. Au vu des résultats, les tissus du panel sont passés en PCR quantitative afin de quantifier l'expression de *B2* et *HEF1* pour chacun d'entre eux.

II.9- PCR Quantitative ou PCR en temps réel

La PCR quantitative ou PCR en temps réel (qPCR) est une application de la PCR reconnue comme la technique la plus sensible et la plus fréquemment utilisée pour la détection et la quantification de l'expression de l'ARNm. Elle permet de suivre en continu le processus d'amplification en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo formés. La qPCR

exploite une propriété inhérente à la PCR qui montre que le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence atteigne une valeur seuil est inversement corrélé au nombre de molécules cibles à l'origine. La qPCR permet d'observer une augmentation de fluorescence en fonction du temps. Elle comprend deux parties :

- La synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN par retro transcription (RT).
- L'amplification de l'ADNc spécifique par la réaction de qPCR.

Ainsi, il est observée sur la courbe exponentielle 3 phases :

- Une première étape dite de bruit de fond
- Une seconde étape de phase exponentielle de croissance
- Une dernière étape de phase de plateau

La phase de bruit de fond s'achève lorsque le nombre de produits PCR néo-formés dépasse la valeur seuil de la technique de détection utilisée. La phase exponentielle permet d'observer le doublement du nombre de produit PCR à chaque cycle. Les réactifs tels que la Taq sont alors limitants lorsque que le plateau est atteint.

La méthode de détection fait appel à une excitation par laser ou diode de tungstène et la mesure de la fluorescence réémise à des intervalles très rapprochés au cours de la réaction PCR. Pour nos études, nous utilisons la méthode de fluorescence en utilisant le SYBR Green (Applied Biosystem). Cette méthode requiert des ARNs de bonne qualités et traités DNase.

Les différents dosages d'ARN messenger par PCR quantitative sont réalisés avec du SYBR Green sur une plaque de 96 puits. Les plaques sont organisées en fonction des amplifications attendues. Chaque gène amplifié nécessite une gamme étalon, des contrôles afin de vérifier les risques de contaminations et d'amplifications aspécifiques (Figure xx).

Pour chaque gène, des amorces spécifiques sont sélectionnées à l'aide du logiciel primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). Les amorces devaient répondre aux exigences spécifiques de la PCR quantitative. Ainsi les amplicons font une taille comprise entre 50 et 150 pb, et la température d'hybridation des amorces se situe à 60°C. Etant donné que nous utilisons la technologie du Sybr® Green, il nous a fallu éviter les risques d'hybridation des amorces sous forme de dimères

Matériel et méthodes : Etude des cibles moléculaires

(appariement de deux amorces complémentaires). Cette détection de dimères d'amorces s'effectue en utilisant le logiciel oligo toolkit (<https://www.operon.com/oligos/toolkit.ph>)

Les séquences des amorces utilisées pour les gènes *HEF1* et *B2* et la β -actine sont répertoriées dans le tableau 8. Il y a donc un couple d'amorces par gène cible (*HEF1* et *B2*) et un couple pour le gène référence β -actine. Ce dernier est choisi comme le gène de référence car c'est un gène exprimé de façon constante dans tous les tissus. Pour le gène *HEF1* les deux amorces ont été choisies sur deux exons différents (exon 2 et 3) pour éviter tout risque d'interférence avec le gène *B2*.

Tableau 8 : Amorces utilisées par PCR quantitative pour les gènes *HEF1* et *B2*

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
B2	5'-attcccttgccttcttgat-3'	5'-cgtgaggctgcactacag-3'
HEF1	5'-ccgctgccgaaatgaagtat-3'	5'-ccctgtgtctgctctatgac-3'
β -actine	5'-ttgctgacaggatgcagaag-3'	5'-gtacttgcgctcaggaggag-3'

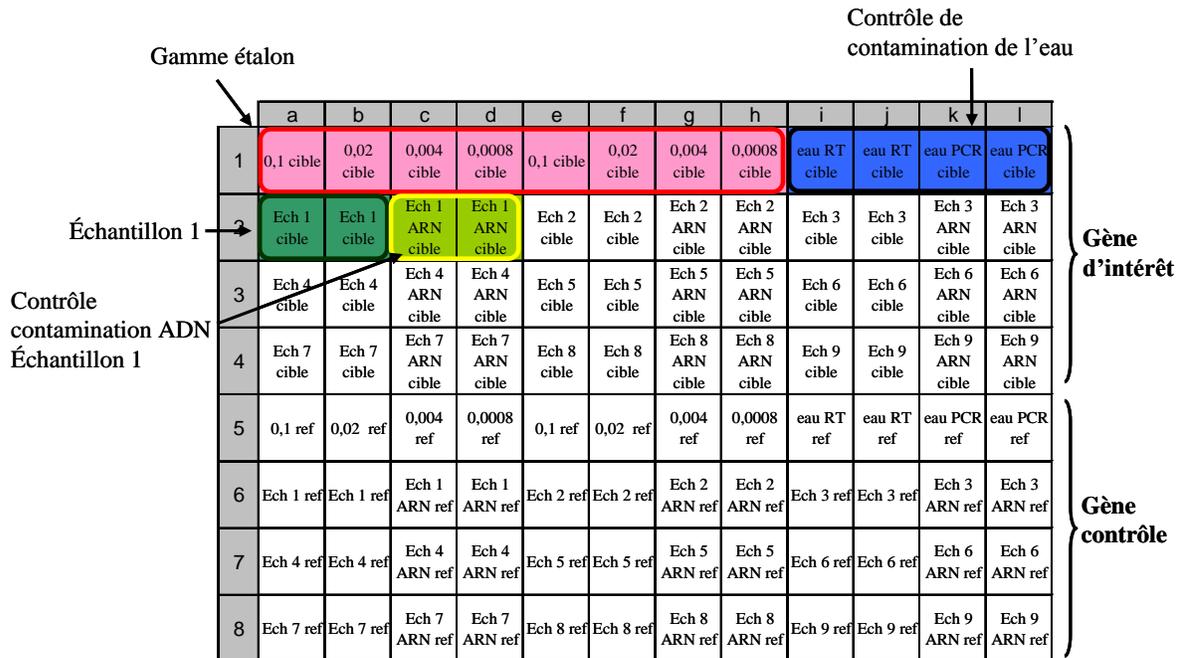


Figure 26: Représentation schématique de l'organisation d'une plaque pour un test de PCR quantitative (Ech : échantillon, Ech ARN : témoin contrôle de contamination ADN = échantillon sans réverse transcription, cible : gène d'intérêt, ref : gène contrôle). Les différents types de PCR réalisées sont mis en évidence : une gamme étalon en répliquât avec quatre dilutions des ADNc, des contrôles de contamination de l'eau utilisée pour la préparation des mix PCR, et les amplifications des gènes pour les différents échantillons accompagnés par des contrôles de contamination ADN des ARN utilisés pour la réverse transcription. La plaque est donc occupée pour moitié par le gène d'intérêt étudié et l'autre moitié par le gène contrôle afin de relativiser l'expression du gène cible en effectuant le rapport des deux lors de l'analyse. Il apparaît alors que seuls 9 échantillons peuvent être analysés sur une plaque 96 puits.

Matériel et méthodes : Etude des cibles moléculaires

La préparation des échantillons se fait en double. Les ADNc sont préalablement traités RNase free et dilués au 20^{ème}. 1 µl des ADNc dilué est déposé dans un mélange contenant 10 pmol d'amorces sens du gène d'intérêt, 10 pmol d'amorces antisens du gène d'intérêt et 1X de SYBR® Green PCR mix (Applied Biosystems) dans un volume final de 25 µl. En parallèle, ce même mélange est effectué avec le gène de référence (β -actine). (Cf. Figure 26)

Une fois, le processus de PCR quantitative terminé, les résultats sont analysés par le logiciel GeneAmp® 5700 SDS. (cf. Annexe 3) Ensuite le rapport gène cible sur gène d'intérêt est effectué afin de relativiser l'expression obtenue et pouvoir la comparer dans différentes conditions (différents tissus ou différents temps de traitement...)

II.10-qRT-PCR des miRNA

Afin de tester l'expression de miRNA par PCR quantitative, il est nécessaire de procéder à un traitement des cellules sur 60 H, pour cela 2×10^5 cellules NSCLC-N6/ml ou 4×10^4 cellules A549/ ml sont mises en culture dans une flasque de 5 ml ou dans une plaque 6 puits. La molécule A190 est ensuite ajoutée à une concentration correspondante à la CI_{50} soit à une concentration de 39,4 µM pour la lignée NSCLC-N6. Au bout de 60 heures de traitement, les ARNs totaux sont extraits puis traités par la DNase. L'étape de RT-PCR est cependant plus spécifique pour cette étude, c'est pourquoi nous avons utilisé un Kit Ncode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis and qRT-PCR kits. En effet, elle consiste à sélectionner davantage la reverse transcription des miRNA. Pour cela, la première étape de la reverse transcription consiste à établir une réaction de polyadénylation en 3' de tous les brins d'ARN. Puis de synthétiser les brins complémentaires. (Cf. Figure 27) Ce n'est pas la polyadénylation qui va donner la spécificité des miRNA mais cela permet d'avoir une amorce universelle en 3' et d'avoir un qPCR spécifique du miRNA en choisissant l'amorce en 5' de la taille du miRNA car ceux-ci sont de l'ordre de 25 nt.

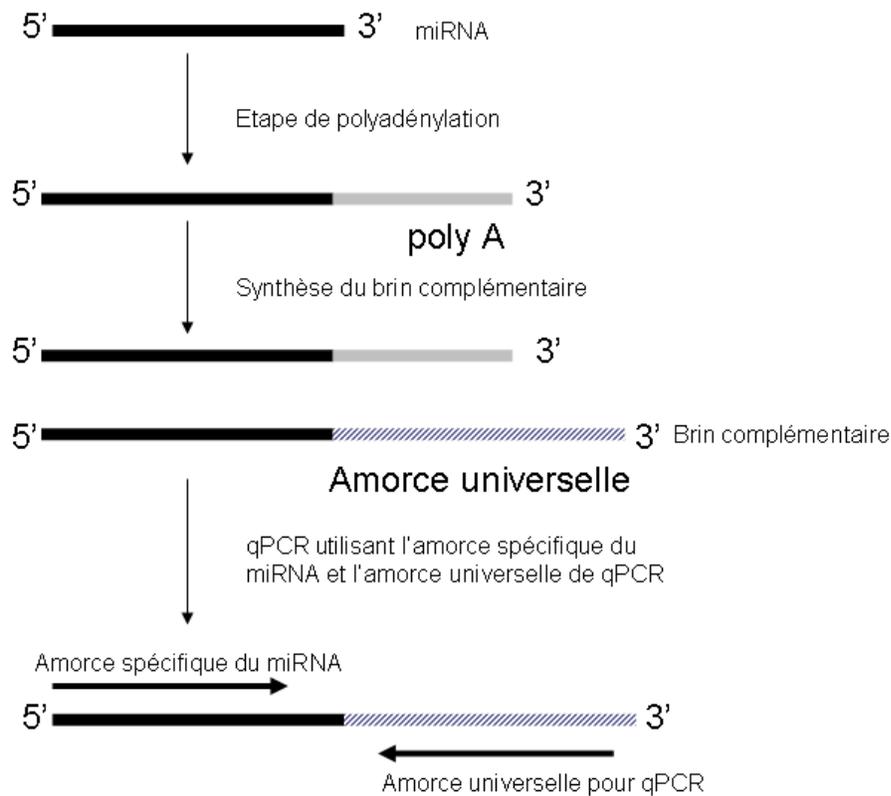


Figure 27 : Les différentes étapes d'une qRT-PCR spécifique des miRNA.

II.10.1- Etape de polyadénylation :

Cette étape s'effectue sur 3 µg d'ARN dosés avant traitement DNase auxquels nous rajouterons :

- 5 µl de tampon de réaction miRNA 5X
- 2,5 µl de MnCl₂ 25mM
- 1 µl d'ATP dilué
- 0,5 µl de poly A Polymérase
- qsp 25 µl d'H₂O DEPC

Le tube est doucement homogénéisé et centrifugé à la « centrifoule » puis incubé à 37°C pendant 15 minutes. Après incubation, toutes les extrémités 3' sont polyadénylées comme tous les ARN messagers. Ainsi le brin complémentaire peut être synthétisé à partir non pas d'amorces aléatoires mais d'une amorce « universelle » qui s'hybride en 3' sur le poly A.

II.10.2- Synthèse du brin complémentaire :

- 4 µl des ARN polyadénylés à l'étape précédente
- 1 µl de tampon d'élongation
- 3 µl d'amorces universelles (25 µM)

Le mélange est alors incubé à 65°C pendant 5 min. A la fin de l'incubation, le tube est alors mis dans la glace afin de stopper la réaction, et sont ajoutés dans le tube :

- 10 µl de tampon de synthèse du brin complémentaire 2X
- 2 µl d'enzyme SuperScript™ III RT/ RNaseOUT™

Le mélange est alors homogénéisé et vortexé et mis à incuber pendant 50 min à 50°C. Les échantillons sont ensuite incubés à 85°C afin de stopper la réaction pendant 5 min.

Les ADNc sont alors prêts à être analysés en PCR quantitative. En effet, l'étape de polyadénylation en 3' permet de rendre le miRNA avec une extrémité semblable aux ARNm. Ainsi le choix de l'amorce en 5' spécifique du miRNA étudié et l'utilisation en 3' de l'amorce universelle qui s'apparie sur le poly A va permettre d'analyser l'expression spécifique du miRNA. Les ADNc spécifiques peuvent aussi être congelés pour une utilisation ultérieure. Si les ADNc sont utilisés en PCR quantitative, la plaque de PCR quantitative est effectuée dans les mêmes conditions que celles énoncées dans le paragraphe précédent.

Chapitre III. Conclusion :

L'ensemble de ces techniques ont nécessité de nombreuses mises au point tout au long de leur utilisation.

✚ La synchronisation des cellules nécessite beaucoup de temps de préparation. En effet, l'obtention d'un million de cellules NSCLC-N6 synchronisées pour une extraction d'ARN nécessite une à deux semaines. Cela s'explique par le fait qu'il faut trouver le moment où un grand nombre de cellules sont en mitose afin de les récupérer par « tapotement ». Toutefois, le nombre de cellules décollées du support est faible. Cela ajouté au fait que les cellules ont un temps de doublement de 48h.

✚ Le séquençage du gène *B2* a nécessité des mises au point qui sont constantes. Les couples d'amorces choisis ne fonctionnait pas forcément en fonction de la séquence plus ou moins difficile à amplifier. Ainsi pour une région, il était nécessaire d'avancer non pas par des amplicons de 1000 pb mais de 150 à 700 pb. Ce problème d'amorces se retrouve aussi lors de la détermination du compartiment cellulaire de l'ARN *B2*. Pour cette expérimentation il est nécessaire d'avoir de bons contrôles pour les ARN nucléaires et cytoplasmiques.

✚ Le choix de miRNA parmi la banque de données fut difficile à effectuer ainsi que la mise en place de cette expérimentation. Il était nécessaire d'une part d'optimiser les conditions de formation de miRNA. D'autre part, les miRNA existant dans la banque de données qui sont choisis pour réguler le gène *HEF1* sont basés sur des prédictions. Le non résultat par PCR quantitative ne pouvait donc pas être pris en compte comme un non résultat.

Ainsi les nombreux aléas élucidés et les mises au point des techniques utilisées quasi permanentes nous ont permis d'avancer sur le gène *B2*.

Résultats

Chapitre I. Identification du gène B2

I.1- Caractérisation de la séquence de l'ARN B2

A mon arrivée, le séquençage de l'ARN B2 était déjà amorcé et comptait alors 13 kpb. (Jacquot C. and al., 2004) L'un de nos objectifs concernant B2 était de déterminer l'intégralité de sa séquence. La séquence de l'ARN B2 superpose une partie de la séquence d'ADN génomique du gène *HEF1* situé sur le chromosome 6 humain dans la région p24-25. Dans ce but, nous avons utilisé la « marche sur le chromosome ». Cette technique consiste à utiliser comme matrice la séquence génomique de l'ADN du gène *HEF1* pour le séquençage de l'ARN B2. Nous nous sommes donc appuyés sur la séquence du chromosome 6 (AL 136139 et AL 1139807.6) pour déterminer les couples d'amorces amplifiant l'ARN B2 tant dans les régions codantes que non codantes du gène *HEF1* en utilisant un logiciel en accès libre sur internet Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). La taille, la Tm, le pourcentage en GC et beaucoup d'autres paramètres vont pouvoir être définis dans le logiciel de sorte d'obtenir des amorces très spécifiques. L'ARN B2 a été découvert à partir d'une séquence initiale de 180 pb grâce à la technique de Differential Display. Cette séquence initiale se situe au niveau de l'intron 2 du gène *HEF1*. Puis, nous avons progressé sur le séquençage à la fois en 5' et 3'.

Afin de bien confirmer le séquençage de l'ARN B2, nous avons effectué chaque PCR sur deux lignées ; la lignée du modèle cellulaire NSCLC-N6 qui est la lignée qui se rapproche le plus des patients atteints du cancer et sur la lignée de référence A549 communément utilisée par les chercheurs qui travaillent sur le cancer du poumon. Ainsi pour chaque PCR, nous avons 6 échantillons.

Cependant, il existe d'autres conditions qui doivent être appliquées afin de s'assurer que nous sommes toujours sur la séquence et que nous n'appliquons pas de biais dans le séquençage. La condition principale est d'amplifier des fragments qui se chevauchent d'environ 100 à 150 pb. (Cf. Figure 28)

Résultats : Identification du gène B2

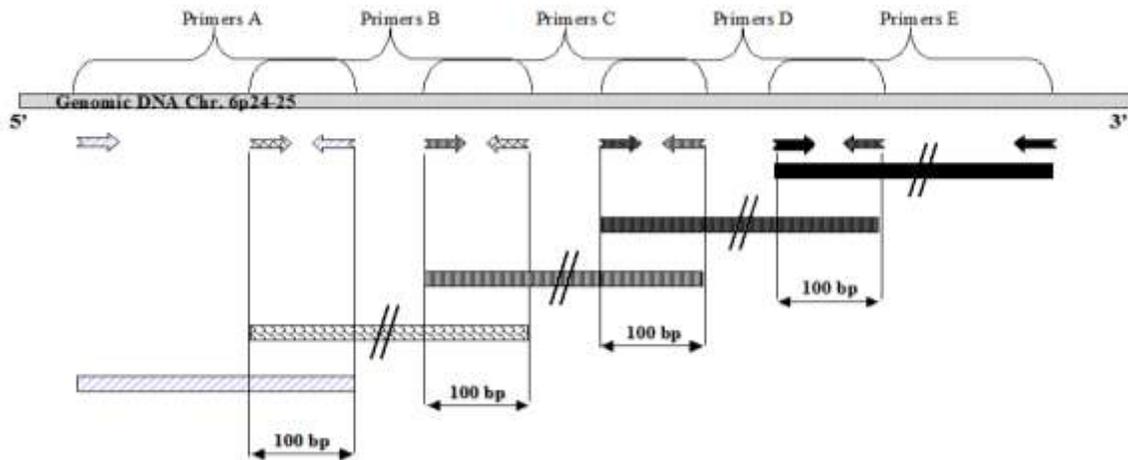


Figure 28: Schéma représentant la stratégie d'identification de la séquence de B2. La séquence d'ADN génomique du chromosome 6 est utilisée pour déterminer les amorces avec le logiciel en accès libre sur internet Primer 3. Chaque amplification est d'environ 1 kb et chevauchent le précédent d'environ 100 à 150 bp.

Le chevauchement des fragments permet de s'assurer que nous sommes toujours sur l'ARN B2 et d'autre part qu'il n'y a aucune rupture dans la séquence.

Dans un premier temps, cette « marche » sur le chromosome 6 a été poursuivie vers l'extrémité 5'. Ceci nous a conduits à 10 kb en amont de l'exon 1. En parallèle, nous utilisons cette technique de séquençage pour avancer au niveau de l'extrémité 3', ce qui nous a conduits jusqu'à l'exon 5 du gène *HEF1*. Nous sommes donc parvenus à un ARN B2 à hauteur de 54 kb (Cf. Figure 29).

Ainsi, plus de 117 RT-PCR ont été effectuées afin de caractériser la séquence entière de B2 (Cf. Figure 29) et ceci dans les conditions de la technique de « marche sur le chromosome ». Une autre condition importante de la technique concerne les ADNc qui sont synthétisés en présence (+RT) et en absence (-RT) de transcriptase inverse, ceci permet de contrôler une éventuelle contamination par l'ADN génomique non éliminés par le traitement Dnase.

Ainsi nous voulions évaluer rapidement la suite de la séquence de l'ARN B2 et déterminer non seulement sa taille mais aussi la présence éventuelle d'intron. En effet, pour chaque couple d'amorce, nous avons 6 échantillons : 2 échantillons par lignée cellulaire utilisée (NSCLC-N6 et A549) comprenant un échantillon où les ADNc sont synthétisés en présence de RT (+RT) et un échantillon synthétisé en absence de RT (-RT) puis un échantillon contrôle positif (T+) comprenant de l'ADN génomique et un contrôle négatif (T-) qui ne contient que les réactifs du mélange

Résultats : Identification du gène B2

de PCR. Lorsque que le couple d'amorces utilisé pour l'amplification présentait le fragment à la taille voulue sur l'ADN génomique et sur les échantillons notés (+RT) alors nous en concluons que ce fragment amplifié appartenait bien à l'ARN B2. Par contre si le fragment avait été amplifié sur l'ADN génomique mais pas sur les ADNc, cela aurait indiqué la présence d'un intron. Toutefois, aucune interruption n'a pu être mise en évidence. L'amplification de ces différents fragments chevauchant et leur alignement avec l'ADN génomique du gène *HEF1* de l'exon 5 à plus de 10 kb au dessus de l'exon 1 indique l'existence d'un ARN de près de 54 kb sans présence d'intron. (Cf. Figure 29)

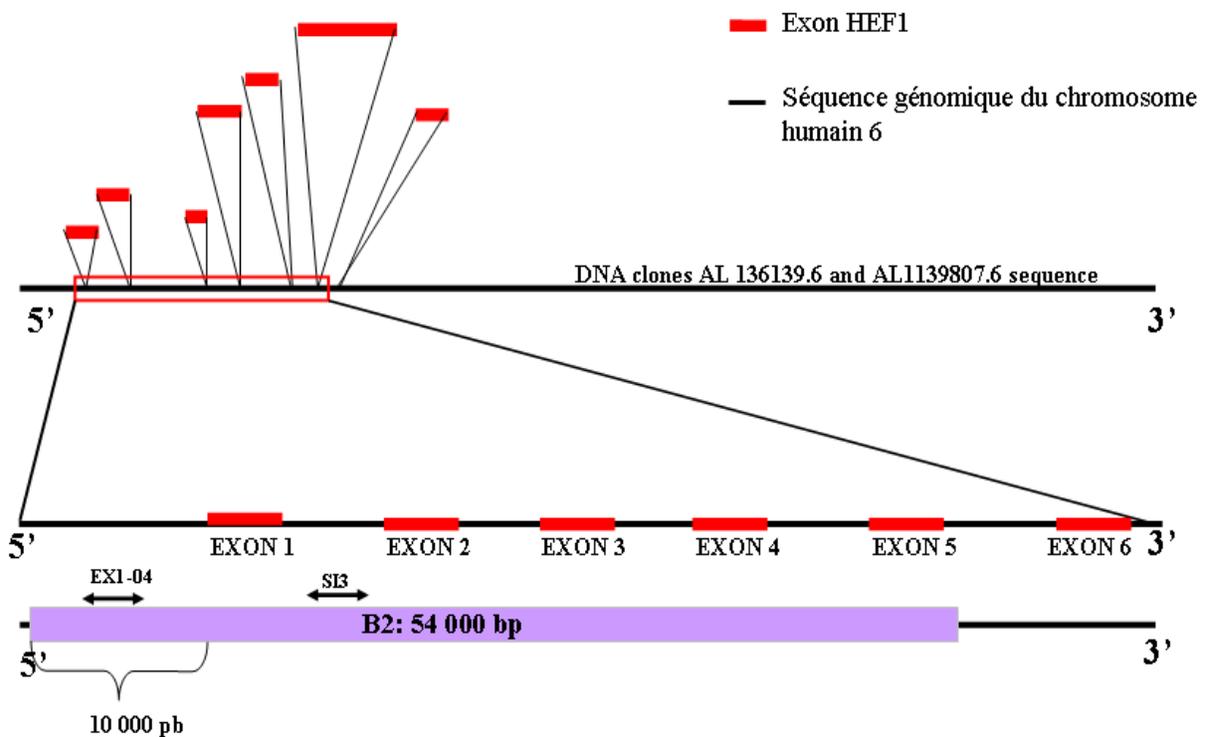


Figure 29 : Schéma de positionnement des différents exons sur le gène *HEF1* et positionnement de l'ARN B2.

I.2-Détermination de l'extrémité 5'

Lorsqu'aucune amplification n'était plus possible, nous avons alors estimé que nous étions proches de l'extrémité 5' de cet ARN. Ainsi nous avons voulu déterminer précisément celle-ci par la technique de RACE PCR. Nous sommes donc partis du dernier amplicon obtenu en 5' à partir duquel nous avons généré une RACE PCR. Celle-ci nous a permis de poursuivre le séquençage jusqu'au point initial de la séquence. (Cf. Figure 30 et 31)

Résultats : Identification du gène B2

5'AGCACAGCCTGATTGGAGTTGGCCTGAGTGATATGTATTCTTTTACCCACTTGGCATGACTCTTTGTAGAT
TCAATTGCTGAAACATGCATGCCTTTGCTCATGGGACACAGCCATGGATTCACTGGGAGTGTCTTGTAATATGTGG
TATATGCTCTAAATCTCTTTCTAAAATCTGAAATATTCTGAATTCCACAAGCTCATCTGGCCTCCAGGTTTTTGAACA
AGGAACTGTGAATCTGTTTTTAGGGTGAGGAAGGCCAGAACTTACTTGCAGAGAGCAGGGTGGGAAAGATTAGGG
GGCACATCAGAGAGGGGATGGTTAGGGAGCTGAGTCCAGAGTGGGCTTGAGAGGAGAGAAAAAATGCACAG
AGCTGTCTGGATAAAAAGGAAAGACAGTTTTTTTTTTTTTTCCTGGTGACCAGAAGTGCACAGGTGATGACTTTTGAA
AATGTAGAGTGATTTTAAGATGGCAAAATGAAAATGAGACATGGCCTCTATCAGCTAGGCGCCAGGAGGG
CACAGCCTTTCTTCTGTCACTACTCTCCACCCCTCCTAAGACCAGAAGCTCCAAAAGCAGGTTAGAGCATGAATCA
GGAGAACTGCATGCCCTGGGTTCAAGAACCCTTGCAACACTCCCTTGTCTACATCGTCAAGTCTGAAATCACAG
GGTGCCAGGCCTTCAGCAAGTTAAGAGAACTTATACTTAGTGCCTGTAAAGCTCAGGGGTACCAGTGAGCGAGACT
TCAAGTCTTGTGCATGCTCATTGCCAGACCCCTTTGGCTTTTTGTATAAAGAAGAGAGCTGCTCTTTATTTCGGG
CTCAGTGGGCAGAAAGGAATGCTCCGTCCATA-3'

Figure 30 : Dernier amplicon obtenu par la technique de marche sur le chromosome. La zone surlignée en turquoise correspond à l'amorce de type R1 antisens notée B2 17 R et la zone surlignée en jaune correspond à l'amorce antisens B2 17NR qui correspond à l'amorce de type R2.

Cette technique nécessite des amorces antisens choisies sur le logiciel Primer 3 qui va analyser la séquence à partir du dernier fragment amplifiée par PCR (figure X). C'est pour cela que nous avons utilisé 2 amorces antisens (Cf. Tableau 7 et Figure 30).

Après une synthèse spécifique sur les ARN totaux des cellules L16 et A549, un signal de 300 pb après PCR est obtenu sur gel d'agarose 1% avec du Bet. Ce fragment obtenu est alors sous cloné dans le vecteur pGEMT-Easy puis séquencé. Ainsi nous avons pu identifier l'extrémité 5' de B2. Il était alors intéressant d'une part de poursuivre le séquençage en 3' et d'autre part d'analyser la séquence au niveau de l'extrémité 5' grâce à des logiciels bio-informatiques pour identifier d'éventuels ORF.

Résultats : Identification du gène B2

Score = 1493 bits (808), Expect = 0.0
 Identities = 823/832 (98%), Gaps = 2/832 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 312  ATTGGAGTTGGCCTGAGTGATATGTATTCTTTTACCCACTTGGCATGACTCTTTGTAGAT 371
          |||
Sbjct 364  ATTGGAGTTGG-CNNANTGATATGTATTCTTTTACCCACTTGGCATGACTCTTTGTAGAT 422

Query 372  TCAATTGCTGAAACATGCATGCCTTTGCTCATGGGACACAGCCATGGATTTCACTGGGAG 431
          |||
Sbjct 423  TCAATTGNTGAAACATGCATGCCTTTGCTCATGGGACACAGCCATGGATTTCACTGGGAG 482

Query 432  TGTCTTGTAAATATGTGGTATATGCTCTAAATCTCTTTCTAAAATCTGAAATATTCTGAAT 491
          |||
Sbjct 483  TGTCTTGTAAATATGTGGTATATGCTCTAAATCTCTTTCTAAAATCTGAAATATTCTGAAT 542

Query 492  TCCACAAGCTCATCTGGCCTCCAGGTTTTTGAACAAGGAACTGTGAATCTGTTTTTAGGG 551
          |||
Sbjct 543  TCCACAAGCTCATCTGGCCTCCAGGTTTTTGAACAAGGAACTGTGGATCTGTTTTTAGGG 602

Query 552  TGAGGAAGGCCAGAACTTACTTGCAGAGAGCAGGGTGGGAAAGATTAGGGGGCACATCAG 611
          |||
Sbjct 603  TGAGGAAGGCCAGAACTTACTTGCAGAGAGCAGGGTGGGAAAGATTAGGGGGCACATCAG 662

Query 612  AGAGGGGATGGTTAGGGAGCTGAGTCCCAGAGTGGGCTTGAGAGGAGAGaaaaaaaaTGC 671
          |||
Sbjct 663  AGAGGGGATGGTTAGGGAGCTGAGTCCCAGAGTGGGCTTGAGAGGAGAGAAAAAAAAATGC 722

Query 672  ACAGAGCTGTCTGGATAAAAAGGAAAGACAGtttttttttttttGCCTGGTGACCAGAACT 731
          |||
Sbjct 723  ACAGAGCTGTCTGGATAAAAAGGAAAGACAG-TTTTTTTTTTTGCCTGGTGACCAGAACT 781

Query 732  GCACAGGTGATGACTTTTGAAAATGTAGAGTGATTTTAAGATGGCAAATGAAAACCTGGG 791
          |||
Sbjct 782  GCACAGGTGATGACTTTTGAAAATGTAGAGTGATTTTAAGATGGCAAATGAAAACCTGGG 841

Query 792  GGAAGACATGGCCTCTATCAGCTAGGGCCAGGAGGGCACAGCCTTTCTTCTTGTCCTACTAC 851
          |||
Sbjct 842  GGAAGACATGGCCTCTATCAGCTAGGGCCAGGAGGGCACAGCCTTTCTTCTTGTCCTACTAC 901

Query 852  TCTCCACCCCTCCTAAGACCAGAAGCTCCAAAAGCAGGTTAGAGCATGAATCAGGAGAAC 911
          |||
Sbjct 902  TCTCCACCCCTCCTAAGACCAGAAGCTCCAAAAGCAGGTTAGAGCATGAATCAGGAGAAC 961

Query 912  TGCATGCCCTGGGTTCAAGAACACCCTTGCAACACTCCCTTGCTTACATCGTCAAGTCTG 971
          |||
Sbjct 962  TGCATGCCCTGGGTTCAAGAACACCCTTGCAACACTCCCTTGCTTACATCGCCAAGTCTG 1021

Query 972  AAATCACAGGGTGCCAGGCCTTCAGCAAGTTAAGAGAACTTATACTTAGTGCCTGTAAAG 1031
          |||
Sbjct 1022  AAATCACAGGGTGCCAGGCCTTCAGCAAGTTAAGAGAACTTATACTTAGTGCCTGTAAAG 1081

Query 1032  CTCAGGGGTACCAGTGAGCGAGACTTCAAGTCTTGTGCATGCTCATTGCCAGACCCCTT 1091
          |||
Sbjct 1082  CTCAGGGGTACCAGTGAGCGAGACTTCAAGTCTTGTGCATGCTCATTGCCAGACCCCTT 1141

Query 1092  TGGCTTTTTGTATAAAGAAGAGAGCTGCTCTTTATTTCCGGGCTCAGTGGGC 1143
          |||
Sbjct 1142  TGGCTTTTTGTATAAAGAAGAGAGCTGCTCTTTATTTCCGGGCTCAGTGGGC 1193
  
```

Figure 31 : Blast entre la séquence issue de la RACE PCR avec la séquence de l'ADN génomique de HEF1. « query » est la séquence de l'ADN génomique de HEF1 et sbjct la séquence obtenue par la RACE PCR. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

I.3- Détermination de l'extrémité 3'

Avant mon arrivée au laboratoire, une étude avait été menée à la suite de la découverte de l'ARN B2 par Differential Display par une analyse Marathon en 3'. En parallèle, la comparaison de la séquence de l'ARN B2 avec la séquence génomique de *HEF1* avait révélé la présence d'un poly (A+) qui a laissé alors supposer l'équipe que l'extrémité 3' se situait à ce niveau. Le séquençage fut poursuivi. Toutefois, le séquençage a révélé que le poly (A+) ne marquait pas l'extrémité de l'ARN B2. Nous avons alors poursuivi la « marche sur le chromosome » en 3' de la séquence. Nous avons ainsi atteint l'exon 3 puis 4 et enfin l'exon 5 y compris les introns. Actuellement, les recherches en cours nous permettent toujours une amplification par la technique de la « marche sur le chromosome » et nous sommes arrivés dans le séquençage au delà de l'exon 5 du gène *HEF1*. Cependant, depuis que nous sommes au niveau de l'exon 5, nous sommes face à une zone dite fragile puisqu'il est même difficile d'amplifier l'ADN génomique correspondant à cette zone. Cette région nécessite donc des amplifications de fragments plus petits que 1000 pb. Cette zone est donc très difficile à amplifier du fait de sa composition en nucléotides, et nécessite de choisir donc des amorces qui amplifient des fragments de l'ordre de 100 à 200 pb. Ces zones nous obligent donc à tester une multitude de couples d'amorces, tout en préservant la caractéristique que les amplicons doivent toujours se chevaucher. Ce point rend le travail de séquençage plus fastidieux et long.

I.4- Détermination d'un cadre de lecture éventuel :

De nombreux logiciels en ligne sur le web permettent d'analyser les séquences de gènes et de définir l'existence de séquences homologues avec d'autres gènes déjà répertoriés mais aussi permettent de localiser des cadres de lecture ou ORF sur la séquence considérée. Nous avons choisi d'analyser la séquence de *B2* par ORF Finder disponible sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Après analyse cet exon ne présente aucun cadre de lecture significatif qui soit identifié.

Résultats : Identification du gène B2

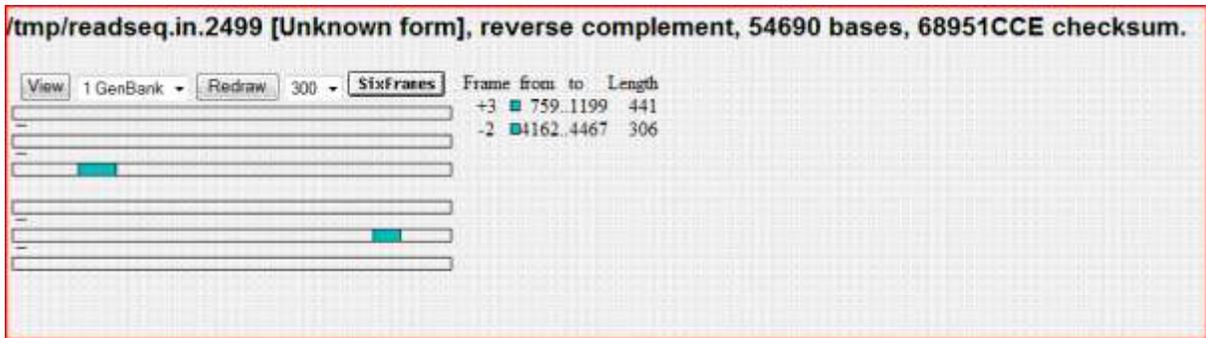


Figure 32 : Analyse bio-informatique de la séquence de *B2* pour la recherche de cadre de lecture. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>

Aucun cadre de lecture significatif n'apparaît lors de cette analyse bio informatique par ORF Finder dans les 54 000 bases analysées. (Cf. Figure 32) Au vu de sa taille et de l'absence de l'ORF, il apparaît clairement que c'est un ARN non codant. Les ARN non codants de cet ordre de grandeur sont généralement des ARN régulateurs qui se localisent au niveau du compartiment nucléaire. Il était donc important de déterminer le compartiment cellulaire dans lequel se trouvait l'ARN B2.

Chapitre II. Localisation du compartiment cellulaire de l'ARN B2

II.1-L'ARN B2 un ARN nucléaire

L'ARN B2 au vu de sa taille très importante est supposé appartenir au compartiment nucléaire. Dans le but de le démontrer, nous devons dans un premier temps faire une extraction différentielle des ARN cytoplasmiques et nucléaires à partir de la lignée cellulaire NSCLC-N6 (Cf. Figure 33).

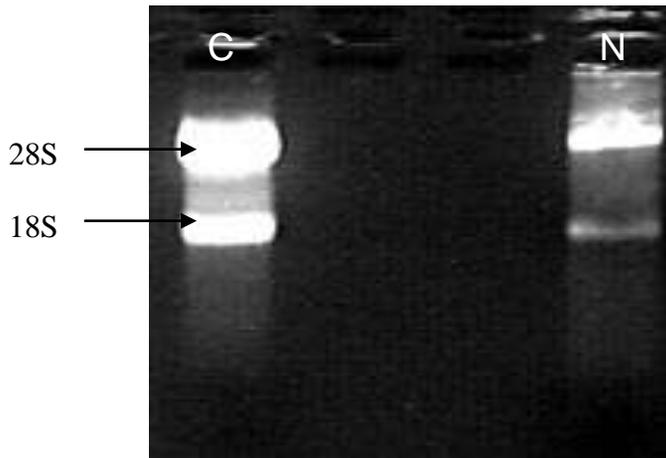


Figure 33 : Profil de migration des ARN nucléaires et cytoplasmiques. Extraction d'ARN en séparant les ARN cytoplasmiques (C) (2,730 μg) et les ARN nucléaires (N) (1,215 μg) sur gel d'agarose 1 % contenant du BET. Le gel contient du BET intercalant d'ARN permettant de visualiser les différentes populations d'ARN.

Les puits annotés C et N présentent deux bandes qui correspondent aux différentes populations d'ARN ribosomiques. En effet, la bande la plus haute correspond aux ARN ribosomiques nommés 28 S qui ont le plus haut poids moléculaires. Alors que la bande de plus faible poids moléculaire représente les ARN ribosomiques dits 18S. L'ensemble de ces ARN sont retrouvés dans la fraction d'ARN cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) en différentes proportions. Par ailleurs la fraction cytoplasmique présente une quantité plus importante d'ARN 28S et 18S que la fraction nucléaire. En effet, la transcription des ARN ribosomiques, la maturation et l'association avec les protéines importées du cytoplasme pour former la grande et la petite sous unités du ribosome est un phénomène nucléaire. Les différentes tailles sont issues d'excisions. Cependant, les sous unités ribosomales quittent le noyau et passent dans le cytoplasme ; ce qui explique que toutes les sous unités se retrouvent dans les deux compartiments.

Résultats : Localisation du compartiment cellulaire de l'ARN B2

Toutefois, il était important de vérifier la bonne séparation des ARN nucléaires et cytoplasmiques. Pour cela nous avons utilisé la technique de RT-PCR avec une stratégie de choix d'amorces bien spécifique.

Dans un premier temps, nous avons fait le choix d'utiliser comme référence un gène ubiquitaire : $\beta 2$ -microglobuline. Puis, nous avons choisi une stratégie d'amorces utilisées par RT-PCR. Nous savons que lors de la maturation des ARN, il y a une étape de polyadénylation, puis l'épissage des zones non codantes des ARNs. Ces étapes s'effectuent dans le compartiment nucléaire. Puis, les ARN matures sont transférés dans le cytoplasme. Ainsi, les ARNs matures (c'est-à-dire épissés) se trouvent à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme pour être traduits en protéines. Alors que les ARNs non matures sont uniquement présents dans le noyau de la cellule. Selon ce mécanisme nous avons choisi un couple d'amorces qui chevauche deux exons (Cf. Figure 34), témoin de la présence d'ARNs cytoplasmiques. Toujours selon ce mécanisme, nous devrions obtenir avec ces amorces une amplification au niveau cytoplasmique et nucléaire. En effet, nous amplifions des ARNs matures. Puis, nous avons choisi un couple d'amorces chevauchant intron/exon, ce couple d'amorces va permettre d'amplifier les ADNc issus des ARNs non matures donc nucléaires. (Cf. Figure 34)

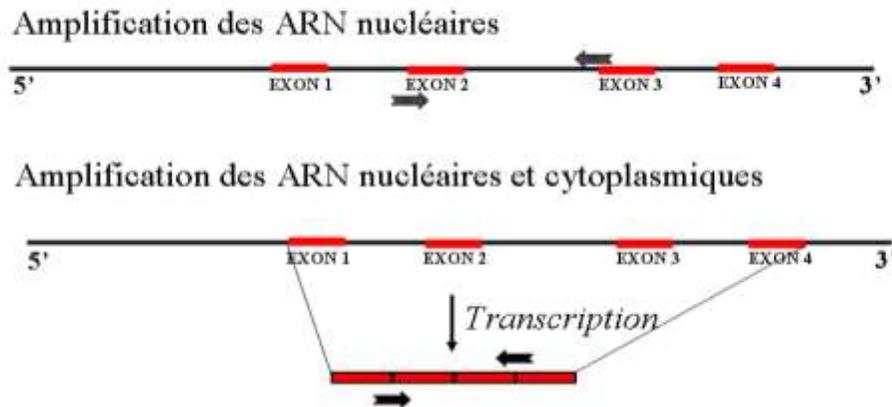


Figure 34 : Stratégie de choix des amorces permettant le contrôle de la bonne séparation des ARN nucléaires et cytoplasmiques.

Résultats : Localisation du compartiment cellulaire de l'ARN B2

Ainsi, $\beta 2\text{-M-INT}$ et $\beta 2\text{-M-EX}$ sont utilisés comme contrôle pour l'amplification de la $\beta 2$ -microglobuline. Ces couples sont définis ci-dessous. L'amorce antisens $\beta 2\text{-M-EX}$ amplifie au niveau de la jonction exon1-exon2 et l'amorce sens $\beta 2\text{-M-EX}$ se situe à la jonction entre l'exon3-exon4.

Puis $\beta 2\text{-M-INT}$ antisens se situe à la jonction entre l'intron1-exon2 du gène, et l'amorce sens $\beta 2\text{-M-INT}$ à la jonction entre l'intron2-exon3. Ils sont utilisés pour l'amplification spécifique de l'ARN nucléaire de la $\beta 2$ -microglobuline.

Ces couples permettent d'amplifier les ARN cytoplasmiques et nucléaires du gène de la $\beta 2$ -microglobuline. Les ARN des deux fractions sont donc soumis à une RT-PCR avec ces couples d'amorces puis analysés sur gel d'agarose 1% contenant du BET.

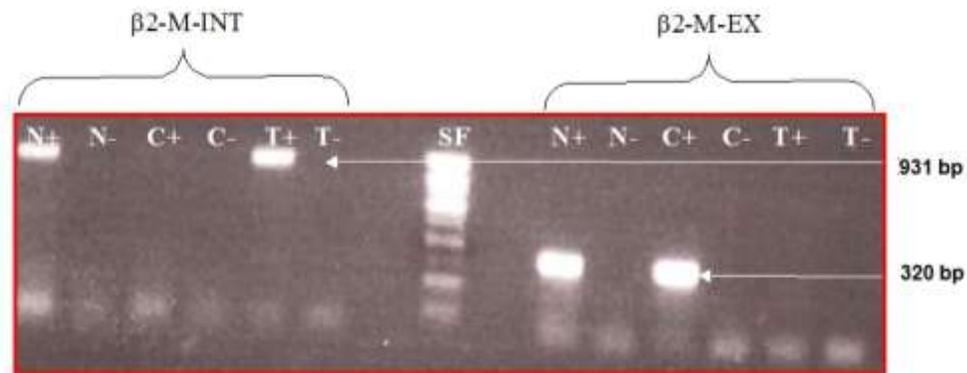


Figure 35: Profils électrophorétiques après amplification par PCR avec les couples d'amorces $\beta 2\text{-M-INT}$ et $\beta 2\text{-M-EX}$ Migration des échantillons de PCR sur gel d'agarose 1% contenant du Bet :SF : Marqueur de taille, N+ fractions nucléaires avec et N- fractions nucléaires sans reverse transcription, C+ fractions cytoplasmiques avec et C- fractions cytoplasmiques sans reverse transcription, T+ Témoin positif (ADN génomique), T- Témoin négatif.

Les analyses des RT-PCR avec les couples $\beta 2\text{-M-INT}$ et $\beta 2\text{-M-EX}$ effectuées sont présentées figure 35. Cette étape permet le contrôle à la fois des RT PCR et de la bonne séparation des ARN cytoplasmiques et nucléaires. Sur la première partie du profil où les ADNc sont amplifiés par $\beta 2\text{-M-INT}$, nous avons un signal d'amplification uniquement sur les ARNs nucléaires noté (N+) et l'ADN génomique qui correspond au témoin noté (T+). Le signal est observé à 931 pb. Cette amplification témoigne donc bien d'une bonne purification des ARNs nucléaires et prouve que la fraction nucléaire n'est pas contaminée par les ARN cytoplasmiques.

La deuxième partie du profil du gel présente les ADNc amplifiés par $\beta 2\text{-M-EX}$, nous avons un signal d'amplification dans les puits correspondant aux ARNs nucléaires (N+) et aux ARNs

Résultats : Localisation du compartiment cellulaire de l'ARN B2

cytoplasmiques (C+). Le signal observé présente un fragment d'amplification de 320 pb. Cette amplification montre que les ARNs matures sont à la fois dans la fraction nucléaire et cytoplasmique. Ce résultat est logique puisque la maturation des ARNs messagers s'effectue dans le compartiment nucléaire avant d'être exportés dans le cytoplasme pour être traduits.

Les échantillons déposés dans les puits N+ et C+ ont reçu la reverse transcriptase permettant la RT-PCR des ARN en ADN complémentaires. Les échantillons notés C- et N- ne présentent pas de bande. En effet, ces échantillons sont dépourvus de reverse transcriptase lors de la RT-PCR. Ainsi, ces échantillons sont restés sous forme d'ARN. Ces puits nous servent de témoins afin de nous affranchir de toute contamination par l'ADN génomique lors de l'extraction d'ARNs suivie d'un traitement DNase. En effet ce témoin est indispensable lors de notre expérience étant donnée l'homologie du gène *B2* avec l'ADN génomique du gène *HEF1*. Le témoin négatif (T-) ne présente aucune bande visible ce qui indique que les réactifs ne sont pas contaminés. Enfin le marqueur de taille (SF) permet par simple visualisation des bandes de migration d'estimer la taille de nos fragments. L'ensemble de ces témoins montrent l'absence de contamination de ces réactifs et certifient que les bandes résultent de l'expression de la séquence amplifiée par les amorces concernées.

Une fois cette vérification effectuée nous avons réalisé des RT-PCR avec des amorces spécifiques de l'ARN B2. Nous avons alors choisis deux couples d'amorces B2-Si3 et B2-EX1. Ces deux couples d'amorces vont permettre d'amplifier uniquement les ADNc issus des ARNs nucléaires. (Cf. Figure 36). Le couple B2-Si3 (Cf. Tableau 9) permet l'amplification au niveau de l'intron n°2 du gène *HEF1* (Cf. Figure 36) et B2-Ex1-4 correspond à un amplicon de 533 pb se situant à 4000 pb en amont de l'exon 1 du gène *HEF1*. Ce dernier permet d'éviter toute interférence entre l'amplification de *HEF1* et *B2*. Les différentes amorces sont répertoriées dans le tableau ci-dessous ainsi que la taille des amplicons correspondants.

Résultats : Localisation du compartiment cellulaire de l'ARN B2

Tableau 9 : Amorces utilisées pour la localisation cellulaire de B2 et leurs caractéristiques.

Noms des amorces	Séquence des amorces	Tm (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
B2-EX1-4 Sens	5'- AGGCCGCAAGACTCATCTTA-3'	60,5	533
B2-EX1-4 Antisens	5'- GGATGCACTCCAACCAGACT-3'	59,9	
B2- Si3 Sens	5'-CAACTTGGGGTGCATTCTTC-3'	60,5	1081
B2-Si3 Antisens	5'-CTGAGAACCAGCATGATGACA -3'	59,9	
β 2-microglobulin exon Sens	5'-CCGATATTCCTCAGGTACTCCA-3'	60,0	320
β 2-microglobulin exon Antisens	5'-ACATGTCTCGATCTATGAAAAAGA-3'	60,0	Contrôle ARN cytoplasmiques
β 2-microglobulin intron sens	5'-AGGCTATCCAGCGTACTCCA-3'	60,0	931
β 2-microglobulin intron antisens	5'-CCTCCATGATGCTGCTTACA-3'	60,0	
HEF1-Exon 5 sens	5'-AGCAGGGCTTAGGGAAAAAG-3'	60,0	1218
HEF1-Exon 5 antisens	5'-GCCAAGATATTCAGGGACCA-3'	60,0	

Les fractions ARN sont alors aussi testées par RT-PCR avec les couples d'amorces spécifiques de l'ARN B2 puis analysées sur gel agarose 1% contenant du BET.

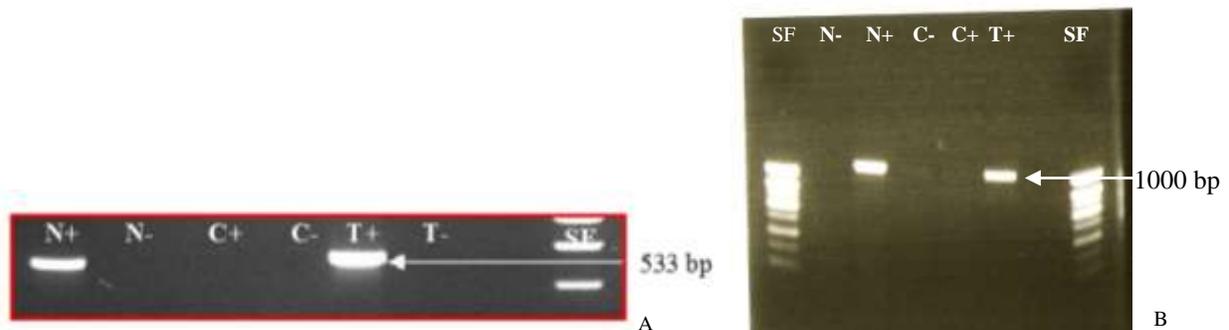


Figure 36 : Profils électrophorétiques après amplification par PCR avec les couples d'amorces B2-EX-1 (A), B2-Si3 (B). Migration des échantillons de PCR sur gel d'agarose 1% contenant du Bet :SF : Marqueur de taille, N+ fractions nucléaires avec et N- fractions nucléaires sans reverse transcription, C+ fractions cytoplasmiques avec et C- fractions cytoplasmiques sans reverse transcription, T+ Témoin positif, T- Témoin négatif.

Les analyses des RT-PCR avec les couples B2-EX1(A) et B2-SI3 (B) sont présentées figure 36. Nous allons analyser en parallèle les amplifications obtenues sur le profil électrophorétique afin de déterminer le compartiment cellulaire auquel appartient B2.

Le profil du gel révèle une bande de migration dans l'échantillon noté T+ issu d'ADN génomique qui correspond à un amplicon de 533 pb avec le couple B2-EX-1 (A) et de 1000 pb pour

Résultats : Localisation du compartiment cellulaire de l'ARN B2

l'amplicon amplifié avec le couple d'amorce B2-SI3 (B). Ce témoin nous indique que toutes les conditions pour une amplification spécifique des amorces B2-SI3 et / ou B2-EX-1 sont requises. Le puits annoté (N+) présente une bande à 1000 pb qui correspond à l'amplification avec le couple B2-SI3 (Cf. Figure 36 B) et une bande à 533 pb avec le couple B2-EX-1 (Cf. Figure 36 A) à partir des ADNc issus de la fraction d'ARN nucléaires. Aucune bande n'est visible dans les puits (N-), (C+), (C-) et (T-). En effet les puits notés (N-) et (C-) sont des témoins de la RT PCR. Le puits (T-) est le témoin négatif. Enfin, le puits (C+) présente l'échantillon contenant les ADN complémentaires issus de la fraction cytoplasmique. Par conséquent, seuls les ADN complémentaires issus de la fraction nucléaire ainsi que l'ADN génomique ont permis une amplification avec les amorces B2-SI3 ainsi que les amorces B2-EX-1 lors de la PCR. Ainsi nous avons pu déterminer que *B2* était bien un ARN nucléaire.

Chapitre III. La localisation tissulaire des gènes *HEF1* et *B2*

III.1-Localisation par RT-PCR

Nous avons vu auparavant que le gène *B2* était nucléaire et exprimé en même temps que le gène *HEF1* dans les cellules NSCLC-N6. Or *HEF1* est aussi exprimé dans d'autres tissus selon la littérature (Singh M.K. and al., 2008) . Au vu de toutes ces informations, nous avons voulu vérifier que l'expression du gène *B2* suivait celle du gène *HEF1*. C'est pourquoi dans un premier temps nous avons voulu amplifier par RT-PCR les gènes *B2* et *HEF1* dans les ARNs de différents tissus déjà utilisés par l'équipe de Singh. (Singh M.K. and al., 2008) Lors de son étude déterminant le caractère ubiquitaire de *HEF1*, soit le panel commercial « the Firstchoice Panel[®] » (Ambion).

Nous avons donc utilisé les couples d'amorces qui nous ont déjà permis de déterminer le caractère nucléaire de *B2* soit B2-Si3 et B2-EX1 auquel nous avons rajouté un couple d'amorces permettant de vérifier l'amplification du gène *HEF1*. Pour cela, nous avons décidé de choisir un couple qui amplifiait la séquence du gène *HEF1* au niveau d'un exon qui lors de cette étude ne faisait pas parti de la séquence de l'ARN *B2*. Au moment de cette analyse, notre ARN allait jusqu'à l'exon 4. Ainsi, nous avons choisi l'exon 5 du gène *HEF1* qui de plus est l'exon le plus grand du gène *HEF1*. Il permet donc d'effectuer des amplicons de tailles plus importantes et donc plus spécifiques. En effet, nous avons pu choisir des amorces permettant d'amplifier un fragment de 1218 pb noté HEF1 Exon5 (Cf. Tableau 9bis) .

Résultats : Localisation tissulaire des gènes HEF1 et B2

Tableau 9 bis: Amorces spécifiques de *B2* et *HEF1*

Noms des amorces	Séquence des amorces	Tm (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
B2-EX1-4 Sens	5'- AGGCCGCAAGACTCATCTTA-3'	60,5	533
B2-EX1-4 Antisens	5'- GGATGCACTCCAACCAGACT-3'	59,9	
B2- Si3 Sens	5'-CAACTTGGGGTGCATTCTTC-3'	60,5	1081
B2-Si3 Antisens	5'-CTGAGAACCAGCATGATGACA -3'	59,9	
β2-microglobulin exon Sens	5'-CCGATATTCCTCAGGTACTCCA-3'	60,0	320
β2-microglobulin exon Antisens	5'-ACATGTCTCGATCTATGAAAAAGA-3'	60,0	
β2-microglobulin intron sens	5'-AGGCTATCCAGCGTACTCCA-3'	60,0	931
β2-microglobulin intron antisens	5'-CCTCCATGATGCTGCTTACA-3'	60,0	
HEF1-Exon 5 sens	5'-AGCAGGGCTTAGGGAAAAAG-3'	60,0	
HEF1-Exon 5 antisens	5'-GCCAAGATATTCAGGGACCA-3'	60,0	1218

Comme le tableau 10 le montre, *B2* est bien exprimé dans l'ensemble des 20 tissus normaux du panel commercial tout comme *HEF1*.

Tableau 10 : Amplification des gènes *B2* et *HEF1* dans les ARNs de différents tissus

TISSUS (+)	Expression B2	Expression HEF1	TISSUS (X)
La vessie	+ X	+ X	Le muscle squelettique
Les testicules	+ X	+ X	Le cœur
L'œsophage	+ X	+ X	Le col utérin
Le cerveau	+ X	+ X	Le poumon
La trachée	+ X	+ X	La rate
Le colon	+ X	+ X	Le rein
Le placenta	+ X	+ X	Le petit intestin
Le thymus	+ X	+ X	Le foie
La thyroïde	+ X	+ X	Les tissus adipeux
L'ovaire	+ X	+ X	La prostate

Ainsi, nous avons pu observer une amplification des deux gènes sur l'ensemble des tissus testés. Cette amplification suit bien les résultats déjà publiés par l'équipe de Singh. (Singh M.K. and al., 2008) Face à ses résultats, nous avons donc décidé de quantifier leur expression en passant par la technique de PCR en temps réel avec les amorces définies dans matériel et méthodes (cf. II-8). Nous allons pouvoir vérifier si l'expression de notre ARN *B2* suit l'expression du gène *HEF1* ce qui confirmerait notre hypothèse où l'ARN *B2* pourrait réguler le gène *HEF1* au vu de ses caractéristiques déjà citées auparavant.

III.2-Localisation par PCR quantitative.

Les résultats de cette partie présentent l'expression des gènes *HEF1* et *B2*, rapportée à un gène de contrôle (la β -actine), sur l'ensemble des tissus sains du panel commercial ARN précédemment testés par RT-PCR sans traitement par une molécule cytostatique telle que A190.

L'étude de l'expression du gène *HEF1* et du gène *B2* par PCR quantitative nous permet d'observer que tous les tissus expriment plus ou moins les gènes *HEF1* et *B2*. De plus, de manière générale l'expression du gène *HEF1* et du gène *B2* sont quasi équivalentes dans de nombreux tissus comme par exemple dans le cœur, les testicules, la vessie, le colon... Toutefois, nous pouvons observer que le gène *HEF1* est d'avantage exprimé dans les tissus adipeux, le col utérin, le foie, la rate et le poumon. Quant au gène *B2*, il est surexprimé dans les tissus adipeux, le col utérin, le foie, la rate, le poumon et le thymus. La surexpression du gène *B2* suit donc pour une majorité des tissus l'expression du gène *HEF1* (Cf. Figure 37 encadrés en rouge). Par ailleurs, certains tissus présentent une expression très faible de ces deux gènes comme dans les tissus le colon, l'œsophage, le petit intestin, le cerveau et l'ovaire. L'ensemble de ces résultats sont donc en accord avec les études de Golemis and al pour le gène *HEF1*. Il est donc possible de conclure que les gènes *HEF1* et *B2* sont bien des gènes exprimés de façon ubiquitaires qui sont exprimés dans de nombreux tissus sains ou cancéreux. Cependant leur expression varie selon les tissus. Enfin, ces résultats semblent confirmer qu'il y a bien une relation entre ces deux gènes qui pourrait être une régulation de l'un sur l'autre par leur expression concomitante.

Résultats : Localisation tissulaire des gènes HEF1 et B2

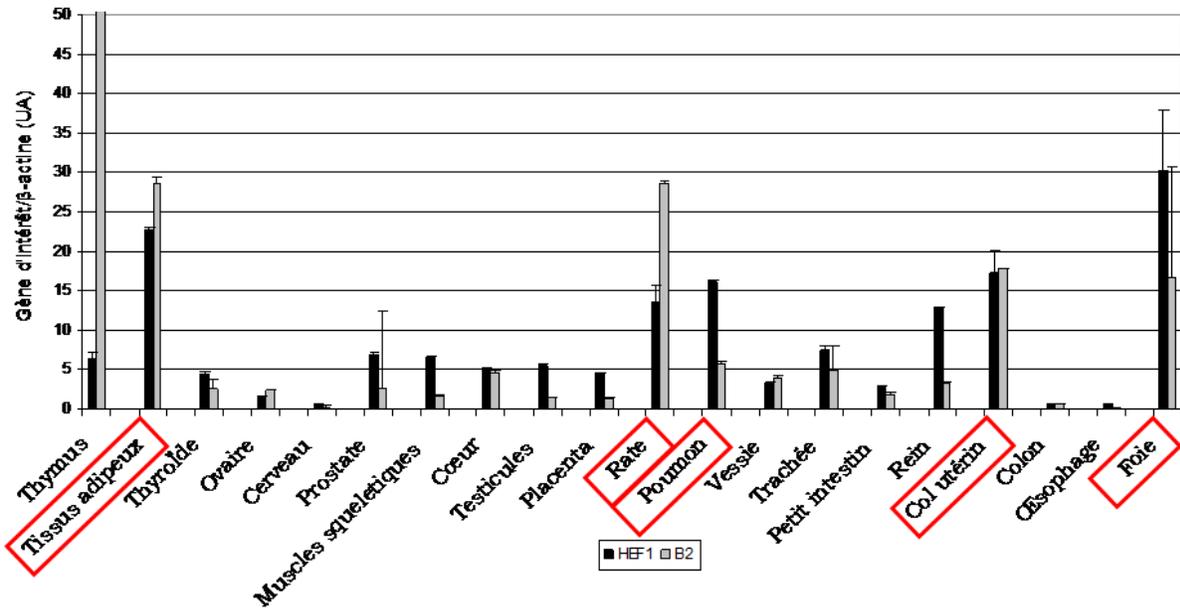


Figure 37 : Etude de l'expression du gène *B2* (gris) et *HEF1* (noir) sur les ARN issus des différents tissus du panel commercial «FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel » (Ambion) par PCR quantitative.

Chapitre IV. Les cibles moléculaires *B2* et *HEF1* au niveau cellulaire :

Avant mon arrivée, le laboratoire travaillait sur l'expression du gène *HEF1*. Il avait été montré par PCR quantitative que les deux gènes *HEF1* et *B2* étaient surexprimés lors d'un traitement des cellules cancéreuses NSCLC-N6 par la molécule A190. Cette surexpression a été étudiée entre 30 et 70 heures de traitement. Il apparaît alors que la modulation de l'expression de ces deux gènes n'est pas constante au cours du temps. Nous observons un pic de surexpression à 60 heures de traitement par la molécule A190 comme il avait été démontré précédemment pour la lignée NSCLC-N6 (Moreau D. and al., 2008) .

Cependant, il s'agissait d'étude préliminaire puisque les échantillons étaient prélevés toutes les 10 heures. Nous avons donc réduit les intervalles de prélèvement afin de préciser le pic de surexpression des deux gènes et ainsi déterminer si ce pic se situe exactement au même moment. C'est pourquoi nous avons décidé d'effectuer cette même analyse avec des intervalles de 5 heures entre 55 et 65 heures sur la lignée NSCLC-N6. En effet, nous avons observé le pic de surexpression des gènes *HEF1* et *B2* sur des cellules synchronisées non traitées et traitées par la molécule A190 à la CI_{50} . Le but de cette synchronisation est d'obtenir une réponse plus précise sur le pic de surexpression des gènes *HEF1* et *B2*. Lorsqu'une synchronisation des cellules est effectuée, la majorité des cellules sont dans la même phase du cycle cellulaire (mitose). Si les cellules ne sont pas synchronisées, seules les cellules en phase M du cycle cellulaire au moment du traitement par la molécule A190 se verront subir un effet de la molécule quasi immédiat. En effet, la molécule A190 bloque les cellules en phase G1. Ainsi l'action de la molécule sur l'ensemble des cellules traitées sera plus diffuse et donc l'effet sur l'expression des cibles sera plus long à observer.

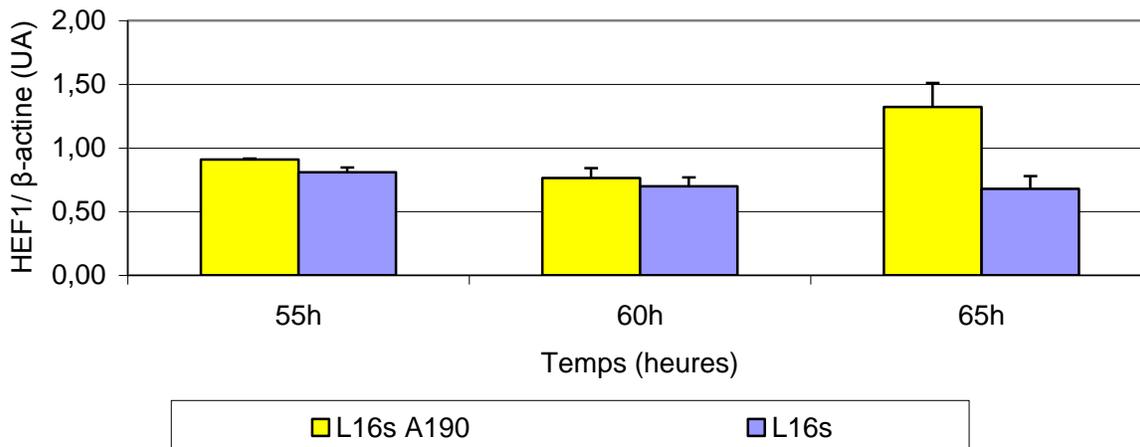


Figure 38 : Histogramme représentant l'évolution de l'expression des gènes *HEF1* dans les cellules NSCLC-N6 synchronisées de 55 à 65 heures avec traitement ou non par la molécule cytotatique A190 à 39,4 μ M pour NSCLC-N6.

La figure ci-dessus nous montre l'expression du gène *HEF1* dans les cellules NSCLC-N6 synchronisées avec traitement (L16s A190) ou non (L16s) par la molécule A190. (Cf. Figure 38) Les cellules non traitées et synchronisées L16s (en bleu clair figure 38) présentent une expression du gène *HEF1* qui est constante à 55 et 65 heures.

Lorsque les cellules synchronisées sont traitées par la molécule A190 à la CI_{50} (en Jaune figure 38), nous observons une d'expression plus importante du gène *HEF1* à 65 heures par rapport à l'expression du gène à 55H et 60H. Cette expression plus importante du gène *HEF1* à 65 H de traitement peut s'expliquer par le fait que la molécule A190 bloque les cellules en phase G1. Cet effet nécessite un traitement de 60 heures afin que les cellules passent de la phase de mitose à la phase G1. Ceci explique bien la surexpression du gène *HEF1* à 65 heures de traitement.

Résultats : Les cibles moléculaires B2 et HEF1 au niveau cellulaire

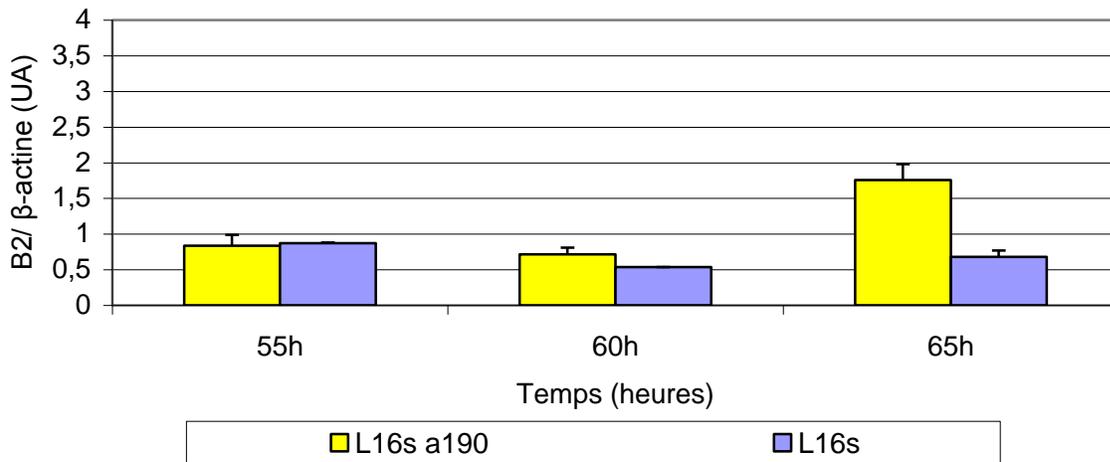


Figure 39 : Histogramme représentant l'évolution de l'expression de gène *B2* dans les cellules NSCLC-N6 de 55 à 65 heures avec traitement ou non par la molécule cytotatique A190 à 39,4 μ M.

La figure ci-dessus nous montre l'expression du gène *B2* dans les cellules NSCLC-N6 synchronisées avec traitement (L16s A190) ou non (L16s) par la molécule A190. (Cf. Figure 39) Les cellules non traitées et synchronisées L16s (en bleu clair figure 39) présentent une expression du gène *B2* qui est constante de 55 à 65 heures.

Par ailleurs, les cellules synchronisées et traitées par A190 à la CI_{50} (en jaune figure 39) présentent une expression plus importante à 65 heures par rapport à l'expression du gène à 55 H et 60 H de traitement.

Ainsi, les cellules synchronisées NSCLC-N6 présente une expression plus importante du gène *HEF1* et du gène *B2* à 65 heures de traitement par la molécule A190.

En conclusion, cette analyse nous a permis d'affiner plus précisément le nombre d'heures de traitement nécessaire pour obtenir une surexpression simultanée des deux gènes *HEF1* et *B2* qui se situe à 65 heures de traitement par la molécule A190 à la CI_{50} .

Chapitre V. L'expression des miRNA dans les cellules NSCLC-N6

Les ARNs non codants de grandes tailles sont souvent des ARNs régulateurs comme la littérature le montre avec les ARNs non codants Air, NTT ou encore H19. (Seidl C.I. and al., 2006) (Cai X. and al., 2007, Liu A.Y. and al., 1997) En analysant la bibliographie, nous nous sommes rendus compte que certains d'entre eux exercent leur fonction de régulation en se scindant en miRNA tels que H19. Ainsi, nous avons supposé que l'ARN B2 étant aussi un ARN de grande taille, il pourrait réguler le gène *HEF1* en passant par le mécanisme de miRNA tout comme H19. Afin de démontrer cette hypothèse, nous avons dans un premier temps vérifié que notre modèle cellulaire NSCLC-N6 exprimait bien des miRNA.

V.1 - Les différents miRNA retrouvés et isolés chez l'homme

Afin de démontrer la présence de miRNA dans le modèle cellulaire, nous devons favoriser l'induction de miRNA dans les cellules. Notre hypothèse de départ était que B2 était un précurseur de miRNA. Il nous apparut évident qu'il fallait favoriser l'expression de ce gène afin d'obtenir une quantité importante de miRNA. Pour cela, nous avons repris les résultats précédents qui montraient que nous avons une surexpression du gène *B2* lorsque les cellules étaient traitées pendant 60 heures avec la molécule A190. En parallèle, nous avons des cellules ayant subi les mêmes étapes sans avoir reçu le traitement de la molécule A190 afin de comparer avec des cellules témoins. Puis nous avons effectué une reverse transcription spécifique des miRNA. Ensuite nous avons choisi stratégiquement des miRNA qui seraient d'une part potentiellement exprimés dans notre modèle cellulaire NSCLC-N6 et d'autre part qui pourraient être issus de notre ARN B2. Puis, nous avons utilisé les reverse transcriptions spécifiques par PCR quantitative. Au vu des résultats précédents, nous avons effectué cette étude uniquement sur des cellules synchronisées NSCLC-N6.

Le choix stratégique des miRNA est effectué en utilisant des banques de données disponibles sur le web comme miRbase (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>) qui répertorie des miRNA déjà identifiés. Nous avons sélectionné des miRNA en fonction de leur origine à savoir que nous avons choisi uniquement des miRNA identifiés et isolés chez l'homme (noté hsa selon la nomenclature). Mais l'origine n'est pas la seule caractéristique. Nous les choisissons aussi en

Résultats : L'expression des miRNA dans les cellules NSCLC-N6

fonction de la séquence sur laquelle ils doivent s'hybrider. En effet, nous les choisissons de sorte qu'ils puissent provenir de la séquence de l'ARN B2 et qu'ils puissent s'hybrider sur l'un des exons du gène *HEF1*. Ainsi, nous avons sélectionné une dizaine de miRNA dont les caractéristiques et les séquences sont présentées dans le tableau 11.

Tableau 11: Les différents Hsa sélectionnés et testés par PCR quantitative. Séquence d'amorçage 5' des miRNA déjà référencés dans miRBase Sequence et qui peut s'hybrider sur les exons du gène *HEF1*. Ces miRNA ont la caractéristique hsa ce qui signifie qu'ils sont tous issus du génome humain.

Hsa	Séquence HSA	Exon HEF1	Exprimé
hsa-mir 422A	5'-GCCTTCTGACCCTAAGTCCAGT-3'	Exon 3 ^{HEF1}	NON
hsa-mir 1324	5'-GAAAGTGCATAGAATTCTGTCTGG-3'	Exon 3 ^{HEF1}	NON
hsa-mir 146B	5'-AGCCTATGGAATTCAGTTCTCA-3'	Exon 4 ^{HEF1}	OUI
hsa-mir-1305	5'-TCTCTCCCATTAGAGTTGAAAA-3'	Exon 4 ^{HEF1}	OUI
hsa-mir-671	5'-CTCCAGCCCCTCCAGGGCTTCCT-3'	Exon 5 ^{HEF1}	NON
hsa-mir-633	5'-TTTATTGTGGTAGATACTATTAG-3'	Exon 5 ^{HEF1}	OUI
hsa-mir-423	5'-AAAGTCTCGCTCTCTGCCCTCA-3'	Exon 6 ^{HEF1}	OUI
hsa-mir-578	5'-ACAATCCTAGAGCACAAGAAG-3'	Exon 6 ^{HEF1}	NON
hsa-mir-1306	5'-CACCACCAGAGCCAACGT-3'	Exon 7 ^{HEF1}	OUI
hsa-mir-548h-4	5'-GACAAAAACCGCGATTACTTTT-3'	Exon 7 ^{HEF1}	NON

L'expression des différents miRNA humains est ensuite vérifiée par PCR quantitative sur les RT-PCR spécifiques traitées ou non pendant 60 h avec la molécule A190. Cependant, afin de quantifier l'expression des miRNA, nous devons effectuer une gamme étalon qui permet d'obtenir une quantité que nous relativisons en effectuant le rapport avec celle de la β -actine. Pour les études précédentes, la gamme étalon était effectuée en diluant les échantillons au 20^{ème}. Cependant, dans ce cas, nous nous sommes posé la question de savoir si nous pouvions garder la β -actine comme gène de référence. Normalement les miRNA sont présents dans les cellules en faible quantité et sont aussi plus instables qu'un gène codant. Ce choix paraissait erroner nos résultats. Cependant, la littérature montre que certaines équipes choisissent des miRNA stables sur les lignées et d'autres continuent de choisir des gènes codants et ubiquitaires tel que la β -actine. Ainsi face à ces divergences, nous avons décidé de garder la β -actine comme gène de référence, puisque celui-ci harmonisera toutes nos données de la même manière. De plus, nous ne comparons pas nos résultats avec d'autres études et nos amorces habituelles de la β -actine fonctionnent

Résultats : L'expression des miRNA dans les cellules NSCLC-N6

très bien sur la reverse transcription spécifique des miRNA. Après plusieurs PCR quantitatives sur des ADNc issus de la reverse transcription spécifique des miRNA à partir d'ARN totaux des cellules NSCLC- N6 traitées et non traitées, les miRNA exprimés sont représentés sur la figure 40 et surlignés dans le tableau 11.

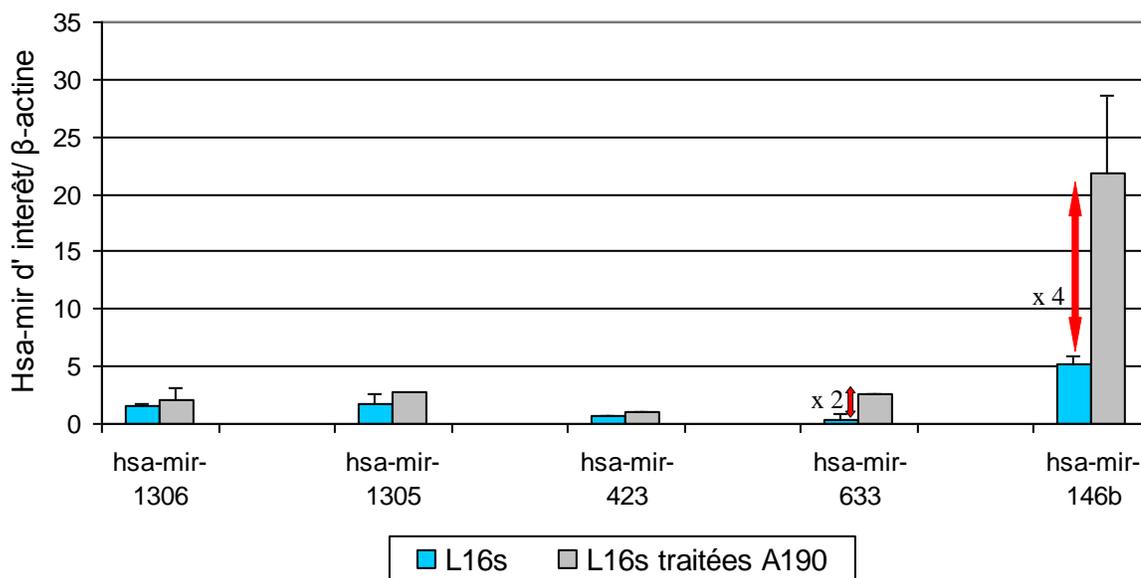


Figure 40 : Les différents miRNA sélectionnés à partir d'une banque de données sont testés par PCR quantitative sur des cellules issues du modèle NSCLC N-6 (L16) synchronisés et traitées (en noir) ou non traitées (en bleu) par la molécule témoin A190 à 39,4 μ M. Le rapport gène d'intérêt / beta actine est effectué.

Parmi ceux testés seuls 5 hsa sont exprimés.

L'expression des hsa 1306,1305 et 423 est relativement faible et constante qu'il y ait traitement ou non des cellules. Ils sont toutefois exprimés dans les cellules cancéreuses NSCLC-N6.

L'expression des hsa 633 est aussi relativement faible. Cependant, une surexpression lors du traitement des cellules NSCLC-N6 par la molécule A190 est observée. Le hsa-mir-633 est 2 fois plus exprimé lorsque les cellules sont traitées par la molécule A190.

L'expression du miRNA, hsa-mir-146b, est nettement plus importante dans les cellules. Il est surexprimé lorsque les cellules sont traitées pendant 60h avec la molécule A190. En effet, le hsa-mir-146b est 4 fois plus exprimé dans les cellules NSCLC-N6 traitées par la molécule A190.

Ces deux derniers hsa ont été sélectionnés pour leur complémentarité avec les exons 4 et 5 du gène *HEF1* et leur forte expression lors du traitement par la molécule A190. Ainsi, nous avons démontré que des miRNA sont bien exprimés dans notre modèle cellulaire. Nous sommes donc passés à la deuxième étape qui consiste à vérifier que *B2* est un précurseur de miRNA.

V.2 - Les différents miRNA pouvant réguler *HEF1*

A ce stade nous avons bien vérifié par PCR quantitative que le modèle cellulaire NSCLC-N6 exprimait des miRNA connus et référencés. A présent, nous devons donc démontrer que notre ARN B2 est bien un précurseur de miRNA. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons déterminé des séquences potentielles de miRNA qui présentent toutes les caractéristiques d'un miRNA. Ainsi, les séquences qui nous intéressent pour une régulation de *HEF1* par *B2* sont les zones superposant les exons de *HEF1*. Pour cette étude nous avons effectué une analyse bioinformatique de ces zones exoniques du gène *HEF1* par un logiciel en accès libre sur le Web (<http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx>). Ce dernier nous a permis de dessiner selon de nombreux critères des miRNA. En effet, il suffit de copier la séquence pour laquelle nous voulons trouver un miRNA potentiel, définir l'origine de la séquence du miRNA mature que nous voulons, le pourcentage en GC, si le miRNA requière un sens particulier auquel cas il nous faut ajouter des nucléotides (ceci est effectué par le logiciel). Cette analyse nous a conduits à obtenir les séquences répertoriées dans le tableau 12 ci-dessous qui correspondraient à des miRNA issus de *B2*.

Tableau 12 : Les miRNA potentiels issus de *B2* pouvant agir sur les exons du gène *HEF1*. Amont 1, 2, 3 sont des miRNA issus de la partie en amont de l'exon 1 de *HEF1*. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 correspondent à des miRNA qui pourraient agir sur l'exon de *HEF1* correspondant au numéro.

Nom de l'amorce	Séquence
Amont 1	5'-TTTCCCTCCACTAATATTT-3'
Amont 2	5'-TAGTTCTGCATCTATGAGC-3'
Amont 3	5'-TGTCTCTAGAAGTTTGCCG-3'
1A	5'-TTTCCTACACTAGTTAAG-3'
1B	5'-TTATACTTCATTTTCGCAGC-3'
2A	5'-TATACCTCTTGTCTTGGG-3'
3A	5'-TATCTGGATGGGTACTCGT-3'
4A	5'-TATCTCTCCCACTGGAAGT-3'
5A	5'-TCTCTCAATAGCTGTGTCT-3'
6A	5'-TTTCCAATAGCTCTTTCTG-3'
7A	5'-TTCTCCACGGGCTTTGTA-3'
7B	5'-TTTCTGTACAGTTTATGTC-3'

Lors du choix de ces miRNA potentiellement induits par le gène *B2*, nous avons fait le choix d'effectuer une analyse de chaque exon du gène *HEF1*. Nous avons donc choisi des miRNA potentiels se situant au même niveau que les exons du gène *HEF1* et superposant l'ARN B2

Résultats : L'expression des miRNA dans les cellules NSCLC-N6

(1A, 1B, 2A, 3A, 4A, 5A). Nous avons poussé cette analyse au-delà de l'exon 5 sur lequel nous sommes arrêtés lors du séquençage du gène *B2* puisque cette étude n'est toujours pas terminée. De plus, nous avons choisi des amorces de miRNA potentiels qui se situent au niveau des exons 6 et 7 de *HEF1* (6A, 7A, 7B).

L'ARN B2 étend sa séquence plus de 10kb en amont de l'exon 1 du gène *HEF1*, il nous paraissait donc important d'analyser cette séquence et de sélectionner quelques miRNA possibles dans cette région (amont 1, 2 et 3). Une fois l'expression de ces derniers vérifiée, nous pourrions confirmer que l'ARN B2 est bien un ARN précurseur de miRNA.

Ces séquences sont testées par PCR quantitative sur des ADNc obtenus des ARNs des cellules synchronisées NSCLC-N6 en présence de traitement par la molécule A190. Les ARNs subissent un traitement DNase et une reverse transcription spécifique des miRNA. Ceux-ci seront comparés avec des ADNc dont les cellules n'auront pas subi le traitement par la molécule A190. L'expression de ces miRNA est à nouveau normalisée en effectuant le rapport de celui-ci sur le gène de référence β -actine. Ces qPCR sont effectuées 3 fois afin de bien confirmer les résultats et seuls les miRNA présentant une expression intéressante sont présentés dans le graphique ci-dessous. (Cf. Figure 41)

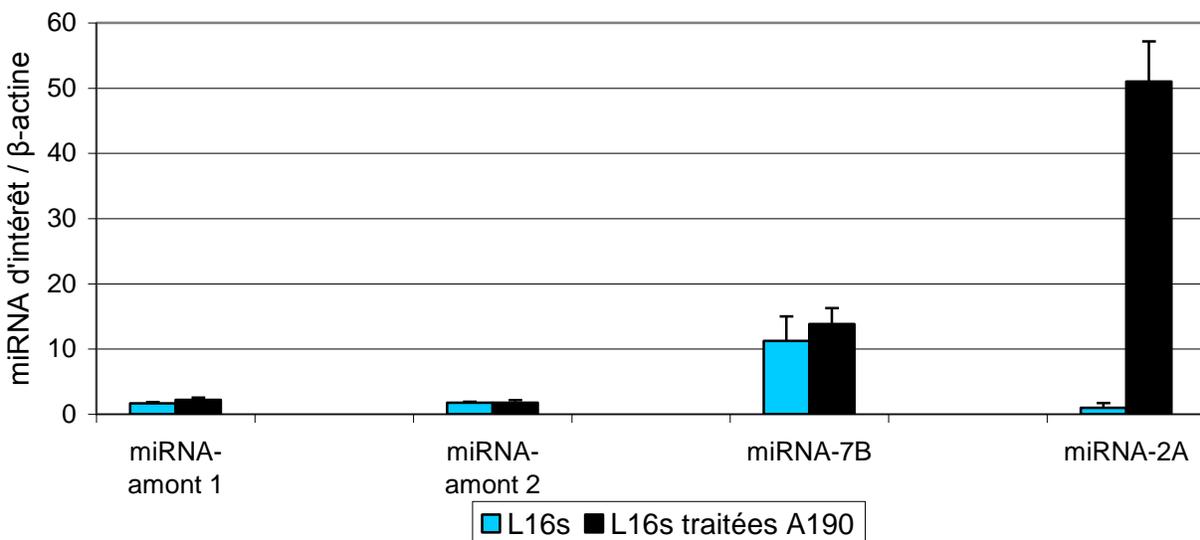


Figure 41 : Les différents miRNA potentiels dessinés à partir d'un logiciel en accès libre sur internet (<http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx>) sont testés par PCR quantitative sur des cellules issues du modèle NSCLC N-6 (L16) synchronisés et traités (en noir) ou non traités (en bleu) par la molécule témoin A190 à 39,4 μ M. Le rapport gène d'intérêt / beta actine est effectué.

Résultats : L'expression des miRNA dans les cellules NSCLC-N6

Nous avons alors testé ces 12 séquences par PCR quantitative en utilisant les conditions précédemment utilisées pour les hsa. Parmi elles, 4 sont exprimées : deux sont complémentaires à la séquence en amont du gène *HEF1*, le troisième est complémentaire à l'exon 7 du gène *HEF1* et le dernier à l'exon 2 du gène *HEF1*.

L'expression des 2 miRNA complémentaires à la zone en amont de l'exon 1 du gène *HEF1* est faible et constante avec ou sans traitement des cellules par la molécule A190.

Le miRNA nommé 7B complémentaire à l'exon 7 de *HEF1* est légèrement plus exprimé que les miRNA précédents mais son expression reste constante avec ou sans traitement des cellules NSCLC-N6.

Enfin le miRNA 2A complémentaire à l'exon 2 du gène *HEF1* est faiblement exprimé sur les cellules non traitées et très fortement surexprimé lors du traitement par la molécule A190 pendant 60H. Le traitement semble donc induire son expression.

Discussion

Les cancers broncho-pulmonaires « non à petites cellules » se caractérisent par un temps de doublement particulièrement long pouvant atteindre plusieurs mois. Cette caractéristique fait qu'ils sont très résistants aux traitements actuels qui ciblent en priorité les cellules en croissance rapide. Malgré les progrès de ces 15 dernières années, le traitement des cancers broncho-pulmonaires (NSCLC) par chirurgie, par radiothérapie ou par chimiothérapie, ou par une combinaison de ces modalités thérapeutiques en fonction du stade reste très décevant. Les taux de réponse sont faibles et les récurrences nombreuses. (Perol M. R.G., 2007) En effet les taux de survie sont médiocres puisqu'ils sont de l'ordre de 42 % de survie dans l'année qui suit le diagnostic et de l'ordre de 10 % sur une période de 5 ans en Europe. L'échec de ces thérapies, la grande toxicité et la chimiorésistance associée à la chimiothérapie actuelle, incitent aujourd'hui les chercheurs à orienter les recherches en cancérologie sur de nouvelles approches thérapeutiques avec de nouveaux gènes comme cibles moléculaires. L'action sur ces cibles moléculaires pourrait être influencée grâce au traitement des cellules cancéreuses par des molécules chimiques innovantes.

Aujourd'hui, les chimiothérapies utilisées agissent sur des cellules qui prolifèrent rapidement ; ce qui explique leur inefficacité sur le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules qui présente la particularité d'avoir des cellules qui se multiplient lentement. Il est donc important de découvrir de nouvelles cibles qui puissent agir sur ces cellules qui prolifèrent lentement. C'est pourquoi la mise en évidence de gènes impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires comme l'apoptose, la prolifération cellulaire, la motilité suscite l'intérêt des chercheurs. Ainsi notre équipe s'intéresse fortement à ce type de gènes et notamment au gène *HEF1*.

Ce gène, *HEF1*, est impliqué dans le contrôle de la croissance, dans la mort apoptotique, dans la motilité et dans la différenciation cellulaire, par l'intermédiaire d'interaction au niveau des sites d'adhésion cellulaire et du fuseau mitotique. Le gène *HEF1* est responsable de la production de 5 protéines différentes : p115^{HEF1}, p105^{HEF1}, p65^{HEF1}, p55^{HEF1} et p28^{HEF1}. L'induction des caspases conduit au clivage de la forme complète de la protéine (p105^{HEF1} et p115^{HEF1}) en p55^{HEF1}, impliquée dans la mitose et dégradée lors de l'apoptose par le protéasome et p65^{HEF1}, conservée lors de l'apoptose alors qu'elle est dégradée lors de la mitose. Cette dernière sera cli-

vée à nouveau pour donner alors p28^{HEF1} responsable de l'activité pro-apoptotique. Au vu de son implication dans toutes ces fonctions, nous pouvons vraisemblablement envisager que le traitement par une molécule cytostatique capable d'induire une surexpression du gène *HEF1* pourrait ainsi provoquer le déclenchement de l'apoptose des cellules cancéreuses.

Dans cette optique, des études de l'expression du gène *HEF1* dans différents tissus ont été effectuées par l'équipe de Golémis. (Singh M.K. and al., 2008) Les résultats publiés montrent que cette cible moléculaire est exprimée de façon variable dans l'ensemble des tissus sains du panel. Mais son équipe a surtout démontré une surexpression du gène *HEF1* dans le poumon (Singh M.K. and al., 2008) . Ainsi, nous pouvons supposer que le gène *HEF1* pourrait être une cible potentiellement très intéressante dans le traitement du cancer broncho-pulmonaire non à petite cellules. Etant donné que le gène *HEF1* peut induire les cellules en apoptose, il serait intéressant de pouvoir induire une régulation de ce gène par une autre cible moléculaire et maîtriser l'expression de cette cible en traitant simplement des cellules cancéreuses grâce à une molécule cytostatique.

L'étude du transcriptome est complexe, la découverte de cibles génomiques passe par des techniques d'isolation des ARN exprimés de façon différentielle. Ainsi, c'est lors d'une étude réalisée, par notre équipe, grâce à la technique de Differential Display, qu'une expression différentielle des gènes *HEF1* et *B2* a pu être mise en évidence. L'équipe s'est alors intéressée plus particulièrement au gène *B2*, alors inconnu et qui présentait une homologie particulièrement intéressante avec le gène *HEF1*.

Lors de mon arrivée, on connaissait 13 kb de sa séquence. Le gène *B2* (GenBank AY166681 et remise à jour GQ497714), a fait l'objet d'une étude longue et fastidieuse qui nous a permis d'obtenir un ARN de 54 kb. En effet, son séquençage a nécessité l'utilisation de 117 couples d'amorces, ce qui sous entend un travail très long entre le choix stratégique des amorces pour répondre à la technique de « marche sur le chromosome » que nous avons choisi, et par conséquent un nombre de RT-PCR bien supérieur à 117 RT-PCR. Une mise au point des PCR était nécessaire pour chaque couple d'amorces testé en fonction de la zone à séquencer, la taille de l'amplicon, et la Tm des amorces. Mais parfois, il nous fallait changer plusieurs fois de couples d'amorces, ou encore réduire les tailles des amplifications. L'ensemble de ces mises au point a

donc multiplié le nombre de PCR et de commandes de couples d'amorces. Toutefois, au terme de ces PCR nous avons démontré que B2 est un ARN non codant d'une taille de 54 kb dont l'extrémité 5' est définie (Section I-2 et Annexe 2). D'autre part, nous avons confirmé que cet ARN forme un seul exon et ne code pour aucune protéine. Cet ARN n'a pour le moment aucun cadre de lecture significatif défini. Il se situe dans la région 6p24-p25 et s'étend de 10 kb au-dessus de l'exon 1 à l'exon 5 du gène *HEF1*. Au vu de sa structure d'ARN non codant de grande taille et de son homologie avec le gène *HEF1*, nous avons pensé qu'il s'agissait d'un ARN ayant une fonction de régulateur comme H19 ou NTT. (Cai X.and al., 2007, Liu A.Y.and al., 1997)

Etant donné que l'activité de la molécule A190 brevetée par le laboratoire est maintenant décrite comme antiproliférative de type cytostatique, la suite de l'étude consiste donc à comprendre la relation entre les deux cibles moléculaires *HEF1* et *B2* et confirmer qu'il existait bien une relation de régulation de celles-ci lors d'un traitement par A190. L'étude de l'expression des gènes *HEF1* et *B2* a donc été réalisée par PCR quantitative. Elle nous permet de doser les quantités relatives d'ARN produits par les cellules en réponse au traitement. Les travaux effectués auparavant par le laboratoire en RT-PCR quantitative réalisés sur cellules NSCLC-N6 traitées par A190, ont très nettement démontrées une importante surexpression des deux gènes lors du traitement. (Moreau D.and al., 2008) L'étude menée sur des cellules synchronisées et traitées a de plus mis en évidence une variation du taux de l'expression des cibles au cours du temps. Cette variation nous permet d'observer un pic d'expression significatif à 60h pour les deux cibles. (Moreau D.and al., 2008) Nous avons alors supposé que cette surexpression intervenait dans une phase précise du cycle cellulaire. Au bout de 60h de traitement, les cellules sont à la phase G1 et ont toutes pu intégrer la molécule 190. Il est important de rappeler que les deux gènes étudiés ici sont différents : *HEF1* induit l'expression de protéines qui vont être clivées au cours du cycle cellulaire pour intervenir à différents niveaux, alors que *B2* correspond à un ARN non-codant de grande taille qui se localise au niveau nucléaire comme nous l'avons démontré (Cf. Chapitre II).

Lors de ces premiers résultats, les deux gènes semblaient surexprimés au même moment (60 heures). Cependant, les cellules synchronisées étaient traitées pendant 30 à 70 heures, et l'intervalle entre les échantillons analysés étaient de 10 heures. Cet écart de 10 heures est important, il était donc difficile d'affirmer que l'expression des deux gènes était bien simultanée. Nous avons donc décidé de réduire ces intervalles de traitement à 5 heures, ce qui nous a permis

d'affiner le pic de surexpression des deux cibles à 65 heures de traitement par la molécule A190 au lieu de 60 heures sur les cellules NSCLC-N6 synchronisées. Toutefois, l'expression de *B2* et *HEF1* semblent toujours simultanée. Il faudrait donc à nouveau réduire l'intervalle de temps de traitement et analyser à nouveau l'expression des cibles moléculaires par PCR quantitative.

Singh and al ont démontré que le gène *HEF1* était exprimé en quantité variable dans différents tissus (Singh M.K.and al., 2008) . Nous avons donc voulu vérifier qu'il y avait bien l'expression du gène *B2* dans ces différents tissus sains. En effet, si l'expression du gène *B2* suit celle du gène *HEF1*, cela nous permettait de confirmer un peu plus notre hypothèse sur une relation de régulation du gène *HEF1* par le gène *B2*. Ainsi, nous avons comparé l'expression tissulaire de *B2* et *HEF1* dans 20 ARNs de tissus sains et ceci sans aucun traitement. Nos résultats montrent que ces deux cibles moléculaires sont exprimées dans l'ensemble des tissus sains du panel. Toutefois, *HEF1* est surexprimé dans le tissu adipeux, la rate, le col utérin, le foie et le poumon. De plus, lorsque l'expression de *B2* est plus faible telle que c'est le cas dans le foie (Cf. Figure 37) il y a surexpression du gène *HEF1*. Les résultats concernant l'expression du gène *HEF1* confirment bien les résultats précédemment publiés par l'équipe de Golémis qui a montré une surexpression de *HEF1* dans le poumon. (Singh M.K.and al., 2008) *B2* est quant à lui surexprimé dans le tissu adipeux, la rate, le col utérin, le foie et le thymus principalement. (Cf. Figure 37). En effet, dans le thymus par exemple, *B2* est largement surexprimé par rapport à *HEF1*. Au vu de l'ensemble de ces résultats, il apparaît que la surexpression de *B2* conduit à la répression du gène *HEF1*, comme nous pouvons l'observer dans le thymus, les tissus adipeux et la rate. A l'inverse, quand *B2* est peu exprimé, *HEF1* est surexprimé comme observé dans le poumon et les reins. Ces résultats confirment le lien existant entre la surexpression du gène *B2* et la répression du gène *HEF1*. Nous supposons alors qu'il existe une régulation négative du gène *HEF1* lors de la surexpression de l'ARN non codant *B2*. (Cf. Figures 38 et 39) Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par l'analyse de l'expression des gènes *HEF1* et *B2* dans les cellules NSCLC-N6 avec traitement par la molécule A190. En effet, nous pouvons observer une surexpression plus importante du gène *B2* que du gène *HEF1* à 65 heures de traitement. Or ce temps de traitement correspond au pic de surexpression des deux cibles. A190 induit donc bien une surexpression de *B2* qui réprime alors le gène *HEF1*.

A ce stade, nous devons déterminer comment cet ARN non codant pouvait réguler le gène *HEF1*. La recherche bibliographique, nous a alors conduit à différents mécanismes plus ou moins identifiés dans la littérature qui pourraient permettre au gène *B2* de réguler le gène *HEF1*. Parmi les plus connus, nous pouvons citer l'interférence transcriptionnelle. Cette régulation agit par l'action d'un promoteur fort sur l'activité d'un promoteur plus faible situé en aval. Cette action a pour conséquence d'agir sur 2 gènes à proximité l'un de l'autre. (Pauler F.M. and al., 2007)

Un autre mécanisme évoqué pour la régulation de *B2* sur *HEF1* était d'envisager que *B2*, par sa localisation nucléaire et sa grande taille, induirait une boucle au niveau de la chromatine qui permettrait alors la répression du gène *HEF1*. Des boucles de la chromatine ont ainsi été envisagées pour expliquer comment un ARN non codant de grande taille pourrait intervenir dans le phénomène de « silencing » (Pauler F.M. and al., 2007) .

Nous aurions pu aussi envisager que la transcription d'un ARN d'une telle taille puisse simplement séquestrer l'ensemble des facteurs de transcription empêchant ainsi la transcription du gène *HEF1*. (Pauler F.M. and al., 2007) Mais d'autres hypothèses sont encore probables. En effet, *B2* est un ARN nucléaire non codant qui pourrait former une triple hélice ARN/ADN lors de la transcription de l'ARN du gène *HEF1* et ainsi la bloquer comme cela a déjà été montré (Pauler F.M. and al., 2007) . Les mécanismes évoqués étaient donc nombreux ; toutefois parmi tous les mécanismes de régulation possibles, l'un d'entre eux nous semble très fortement probable et intéressant. Celui-ci nous conduit alors à émettre l'hypothèse que l'ARN *B2* agirait comme un ARN précurseur de miRNA.

En effet, selon la bibliographie H19 est l'un des tous premiers ARN non codants identifiés, qui vient d'être qualifié récemment comme précurseur de miRNA. (Cai X. and al., 2007) Dans la mesure où l'ARN *B2* se superpose à plusieurs exons du gène *HEF1*, il est possible d'envisager que *B2* induise des miRNA dirigés contre l'ARNm *HEF1*.

C'est pourquoi dans un premier temps, nous avons voulu vérifier que notre modèle cellulaire permettait bien l'expression de miRNA. Nous avons choisi des miRNA issus du génome humain, connus et répertoriés, qui pouvaient provenir de l'ARN *B2* et aussi réguler le gène *HEF1*. (Cf. Figure 40). L'analyse de ces miRNA nous a permis de déterminer un miRNA issus du chromosome 9 ainsi que du chromosome 3 du génome humain. Il s'agit de mir-hsa-146b.

Nous l'avons sélectionné pour son homologie avec l'exon 4 du gène *HEF1* et par conséquent avec l'ARN B2. Lors de son étude en qRT-PCR spécifique des miRNA, il présente une forte expression sur des cellules synchronisées et traitées par la molécule A190 pendant 60 heures. C'est pourquoi ce miRNA par son importante homologie avec l'ARN B2 pourrait être issu du chromosome 6 et plus précisément de l'ARN B2.

A ce jour l'analyse bibliographique, nous a permis à nouveau de constater que les miRNA ont une implication importante voir grandissante dans des traitements éventuels contre le cancer. En effet, selon la littérature l'expression des miRNA est dérégulée dans de nombreux types de cancers. Cette dérégulation permet alors de leur donner une fonction pour certains miRNA non plus de régulateur de gènes impliqués dans le cancer mais une fonction de facteurs pronostique du cancer comme les miRNA-155, 203, 210, 222 dans le cancer pancréatique (Greither T. and al.). Alors que certain miRNA comme let-7, miRNA identifié dans le cancer du poumon localisé sur le chromosome 22 est récemment identifié comme un miRNA dont l'expression n'est pas corrélée à la survie des patients atteints du cancer broncho-pulmonaire. Par contre sa surexpression peut inhiber la croissance des cellules cancéreuses dans le cancer broncho-pulmonaire dans les conditions *in vitro* ce qui indique qu'il possède un rôle important dans la tumorigénèse du cancer pulmonaire (Takamizawa J. and al., 2004) .

Ainsi, nous avons effectué une analyse bibliographique sur mir-146b. Ce miRNA est exprimé dans le cancer de la thyroïde aux cotés de miR-221 et 222. Ces miRNA serait des facteurs de détection du cancer de la thyroïde (Nikiforova M.N. and al., 2008) Cependant le miRNA-146b serait non seulement un facteur de détection du cancer de la thyroïde, mais il apparaîtrait aussi comme un inhibiteur de la migration cellulaire dans le gliome (Xia H. and al., 2009) . Leurs fonctions sont donc diverses et multiples tout comme leurs origines. Il serait donc très intéressant de poursuivre son analyse et de l'isoler pour pouvoir le séquencer. Son séquençage permettrait de définir si celui-ci provient bien de l'ARN B2 ou non. Des premières tentatives pour l'isoler et le purifier ont été menées mais le séquençage de ces échantillons a échoué. Il est dit que la durée de vie des miRNA est courte et que ce sont des structures fragiles ; nous pensons qu'il ne supporte pas la purification.

Enfin, nous avons effectué une analyse préliminaire de la séquence *B2* et notamment des zones qui sont homologues avec les parties exoniques de *HEF1* puisqu'il existe beaucoup d'autres séquences qui pourraient aussi provenir de l'ARN *B2*. L'objectif de cette expérience est d'obtenir des séquences de miRNA potentiellement issues de *B2*. Ces séquences de miRNA potentiels comme miRNA amont 1 et 2 ne sont à ce jour pas répertoriées dans les banques de miRNA telle que mirbase. Ainsi, l'analyse de ces séquences par PCR quantitative sur des qRT-PCR spécifiques des miRNA, nous a permis de sortir 4 séquences fortement intéressantes. Deux d'entre elles se situent sur l'ARN *B2* dans la région en amont de l'exon 1 du gène *HEF1*, ces miRNA potentiels semblent exprimés mais leurs expressions semblent ne pas varier selon que les cellules aient subi un traitement ou non par la molécule A190. Ce qui nous permet de confirmer que *B2* serait bien scindé en miRNA puisque ces séquences ne font pas parties du gène *HEF1*. Toutefois, le fait que leur expression est faible et identique avec ou sans traitement préalables des cellules, nous amène à penser qu'ils n'ont pas d'impact avec notre molécule A190 et qu'ils n'interviennent pas dans la régulation de *HEF1*. Ces résultats sont tout à fait rassurants du fait qu'ils se trouvent bien en amont du 1^{er} exon du gène *HEF1*.

Le miRNA 7B fait partie de la sélection pour son effet possible au niveau de l'exon 7 du gène *HEF1*. Ce potentiel miRNA 7B présente une expression plus faible que les deux précédents. De plus, la différence d'expression entre les cellules traitées et non traitées n'est pas forcément significative. Nous supposons alors qu'il n'a pas forcément un impact sur la régulation de *HEF1* mais sur d'autres gènes. Ce nouveau résultat est encore plus rassurant puisque la séquence de l'ARN *B2* s'arrête actuellement à l'exon 5, ce qui nous permet de supposer que la séquence de l'ARN *B2* ne s'étend peut être pas jusqu'à l'exon 7 du gène *HEF1*. Par conséquent l'extrémité 3' se situerait donc entre l'exon 5 et l'exon 7. Ainsi, ce miRNA serait impliqué dans la régulation d'un autre gène.

Le miRNA 2A potentiel devrait agir sur l'exon 2 du gène *HEF1* par son homologie. Il présente une très forte expression lors du traitement des cellules par la molécule A190. Nous pouvons donc envisager que ce miRNA potentiel serait produit par *B2* et qu'il aurait une implication dans la répression du gène *HEF1*. En effet, il se fixerait sur l'exon 2 du gène *HEF1* et ainsi il bloquerait la traduction de l'ARNm. Il serait donc très intéressant de poursuivre les études sur celui-ci en vérifiant bien son existence. Toutefois, il serait aussi intéressant de tester d'autres sé-

Discussion

quences potentielles de miRNA issus de *B2* et déterminer leur séquence de pré-miRNA. En effet, cet ARN de 54 kb offre une multitude de miRNA potentiels qui pourrait intervenir dans la régulation du gène *HEF1* mais aussi d'autres gènes proches de ce dernier.

Ainsi il apparaît clairement que les miRNA étudiés dans le cadre de la médecine et de l'aspect thérapeutique de maladies diverses : infections virales, cancers, maladies neurodégénératives, facteurs de pronostique... sont toutes des pathologies qui restent aujourd'hui sans traitements efficaces et qui ont souvent une origine inconnue. Les miRNA sont au stade expérimental du point de vue thérapeutique et constitue un véritable espoir dans le cadre des thérapies de ces pathologies. Nous pouvons aujourd'hui penser que les miRNA induits par l'ARN B2 permettraient d'induire les cellules cancéreuses en apoptose par la répression du gène *HEF1*. L'ensemble de ces résultats rend nos cibles *HEF1* et B2 prometteuses et intéressantes pour le traitement des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules grâce au traitement par la molécule cytostatique brevetée par le laboratoire A190.

Conclusions et perspectives

Depuis de nombreuses années maintenant, les biologistes et les cliniciens essaient de mieux comprendre et mieux définir les systèmes particulièrement complexes qui gèrent la vie d'une cellule. Ils cherchent surtout à mieux caractériser les altérations de ces mécanismes pour élucider les procédés par lesquels une cellule saine dérive et devient cancéreuse. Il est donc important de mieux comprendre ce phénomène, ce qui permettra de traiter plus efficacement et plus spécifiquement les cancers. La caractérisation de l'activité de cette molécule cytostatique, A190, a permis au laboratoire de mettre en évidence son potentiel d'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. En effet, cette molécule est capable d'induire un arrêt de la prolifération des cellules en phase G1/G0, qui se poursuit par une mort de type apoptotique. Cet effet cytostatique est fortement intéressant du fait de sa spécificité et de sa non toxicité. Elle fait donc parti des critères pour la découverte de nouveaux traitements anticancéreux.

Depuis plusieurs années, l'amélioration de la connaissance de la biologie du cancer, a permis de mettre en évidence un certain nombre de cibles moléculaires pouvant être visées par les nouveaux traitements. Cette molécule cytostatique, A190, semble parfaitement entrer dans les nouveaux critères de sélection des futurs médicaments anticancéreux puisqu'elle induit la surexpression de deux nouvelles cibles moléculaires, que sont l'ARN non codant de grande taille *B2* et le gène *HEF1* largement impliqué dans différentes fonctions du cycle cellulaire. En effet, l'ARN *B2* régulerait le gène *HEF1*. Cette régulation négative serait induite par des miRNA induits par le gène *B2*. Mais, même si les premiers résultats sur l'induction des miRNA potentiellement issus de *B2* sont encourageants, il serait important de poursuivre ces études afin de déterminer précisément les miRNA induits par *B2* qui permettent la régulation du gène *HEF1*. Pour cela, l'équipe devra poursuivre de nouveaux travaux à plusieurs niveaux :

✚ **Au niveau de la régulation des ARN messager des gènes *HEF1* et *B2* :**

Il sera important dans un premier temps d'affiner la visualisation de la cinétique d'expression de ces gènes, en réalisant des dosages d'ARN à des intervalles de temps encore plus courts, pour déterminer précisément si les deux gènes sont exprimés au même moment ou légèrement décalés. Car les miRNA ont une durée de vie courte et donc ce temps permettrait encore d'affirmer notre hypothèse.

✚ **Caractérisation de l'extrémité 3' du gène *B2* :**

il serait intéressant de définir précisément l'extrémité 3' de ce gène. Ceci permettrait de déterminer précisément la taille de l'ARN *B2* et par la suite de bien définir les zones potentiellement propices à la formation de miRNA. Pour cela, il serait nécessaire de poursuivre la « marche sur le chromosome » en amplifiant de tous petits fragments se chevauchant par RT-PCR. Puis, lorsqu'aucune amplification ne sera plus possible, il faudra envisager une RACE-PCR adaptée à l'extrémité 3'.

✚ **Au niveau de l'induction de miRNA par l'ARN *B2* :**

il faudrait poursuivre l'analyse d'expression de miRNA et donc chercher d'autres séquences éventuelles de miRNA homologues au gène *B2* qui pourraient réprimer le gène *HEF1* et qui de plus seraient fortement exprimées lors du traitement par la molécule A190. Enfin, il serait important de réussir à isoler ces miRNA pour les séquencer et ainsi prouver qu'ils sont bien issus du gène *B2*. De plus, une fois les miRNA exprimés et isolés comme par exemple mir-146b et d'observer son effet sur l'expression de *HEF1 in vitro* dans les cellules NSCLC-N6. Enfin nous envisageons la création d'une banque de miRNA sur les cellules NSCLC-N6 traitées par la molécule A190.

✚ **Au niveau de l'activité antitumorale.** Une fois, un miRNA issu de *B2* isolé et séquencé, il serait intéressant d'étudier son expression. En comparant son expression *in vivo* et *in vitro*, nous pourrions définir si ce mécanisme est réellement prometteur pour une éventuelle thérapie génique contre le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules. Pour cela, il sera nécessaire de traiter les souris par la molécule A190 jusqu'à son pic d'expression (soit à ce jour 65 heures) et comparer l'expression du gène *HEF1* et du miRNA. Puis dans un deuxième temps de greffer les souris avec des cellules synchronisées, et d'observer l'effet d'un traitement puis d'étudier l'induction du miRNA par *B2* sur le gène *HEF1 in vivo*.

Ce travail aura donc permis d'ouvrir de nouvelles voies moléculaires pour de nouveaux traitements dans le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules qui consisteraient à jouer sur la modulation des gènes *HEF1* et *B2*. Ainsi, nous pouvons envisager la mise en évidence de nouveaux miRNA issus de *B2* impliqués dans la régulation de gènes intervenant dans le cancer et ceux-ci seraient induits par une molécule comme A190 qui présente une faible toxicité. La réalisation d'un travail en commun de l'équipe permettra d'accélérer l'isolation et l'identification des nouveaux miRNA potentiellement actifs. La poursuite du développement du projet d'étude de la régulation du gène *HEF1* par les miRNA issus de l'ARN *B2* et modulés par la molécule A190 devra impliquer la mise en place d'un partenariat avec le monde de l'industrie pharmaceutique, afin d'envisager l'atteinte des prochaines étapes que sont les tests cliniques.

Références

A

Agarwal S, Mathur M, Shukla NK and Ralhan R: Expression of cyclin dependent kinase inhibitor p21waf1/cip1 in premalignant and malignant oral lesions: relationship with p53 status. *Oral Oncol* 34: 353-360, 1998.

Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, Fullwood P, Chauhan A, Walker R, Shaw JA, Hosoe S, Lerman MI, Minna JD, Maher ER and Latif F: Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene* 20: 1509-1518, 2001.

Agathangelou A, Bieche I, Ahmed-Choudhury J, Nicke B, Dammann R, Baksh S, Gao B, Minna JD, Downward J, Maher ER and Latif F: Identification of novel gene expression targets for the Ras association domain family 1 (RASSF1A) tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer and neuroblastoma. *Cancer Res* 63: 5344-5351, 2003.

Agathangelou A, Cooper WN and Latif F: Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 65: 3497-3508, 2005.

Alberg AJ and Samet JM: Epidemiology of lung cancer. *Chest* 123: 21S-49S, 2003.

Alexandropoulos K and Baltimore D: Coordinate activation of c-Src by SH3- and SH2-binding sites on a novel p130Cas-related protein, Sin. *Genes Dev* 10: 1341-1355, 1996.

Alvarez MG and Besa PC: Molecular basis of cancer and clinical applications. *Surg Clin North Am* 80: 443-457, 2000.

Astier A, Avraham H, Manie SN, Groopman J, Canty T, Avraham S and Freedman AS: The related adhesion focal tyrosine kinase is tyrosine-phosphorylated after beta1-integrin stimulation in B cells and binds to p130cas. *J Biol Chem* 272: 228-232, 1997.

Augello C, Gregorio V, Bazan V, Cammareri P, Agnese V, Cascio S, Corsale S, Calo V, Gullo A, Passantino R, Gargano G, Bruno L, Rinaldi G, Morello V, Gerbino A, Tomasino RM, Macaluso M, Surmacz E and Russo A: TP53 and p16INK4A, but not H-KI-Ras, are involved in tumorigenesis and progression of pleomorphic adenomas. *J Cell Physiol* 207: 654-659, 2006.

B

Banerjee D and Slack F: Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. *Bioessays* 24: 119-129, 2002.

Bannerman DD, Fitzpatrick MJ, Anderson DY, Bhattacharjee AK, Novitsky TJ, Hasday JD, Cross AS and Goldblum SE: Endotoxin-neutralizing protein protects against endotoxin-induced endothelial barrier dysfunction. *Infect Immun* 66: 1400-1407, 1998.

Baysson H, Tirmarche M, Tymen G, Gouva S, Caillaud D, Artus JC, Vergnenegre A, Ducloy F and Laurier D: [Indoor radon exposure and lung cancer risk. Results of an epidemiological study carried out in France]. *Rev Mal Respir* 22: 587-594, 2005.

Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, Baylin SB and Herman JG: Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11891-11896, 1998.

Bergeron M. DJC: Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples. *Société de la revue médecine/sciences* 19: 743-742, 2003.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM and Hannon GJ: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366, 2001.

Blaszczyk J, Tropea JE, Bubunenko M, Routzahn KM, Waugh DS, Court DL and Ji X: Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure* 9: 1225-1236, 2001.

Blaukat A, Ivankovic-Dikic I, Gronroos E, Dolfi F, Tokiwa G, Vuori K and Dikic I: Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 274: 14893-14901, 1999.

Brannan CI, Dees EC, Ingram RS and Tilghman SM: The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol* 10: 28-36, 1990.

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB and Cohen SM: bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113: 25-36, 2003.

Brown SD: XIST and the mapping of the X chromosome inactivation centre. *Bioessays* 13: 607-612, 1991.

Brunet A: [Signal transduction from the membrane to the nucleus: variations on common themes]. *Bull Cancer* 85: 527-537, 1998.

Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G and Turner C: Focal adhesions: trans-membrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 4: 487-525, 1988.

C

Cai X and Cullen BR: The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *Rna* 13: 313-316, 2007.

Calvino Fernández M PCT: H. pylori and mitochondrial changes in epithelial cells. The role of oxidative stress. *Rev Esp Enferm Dig* 102(1): 41-50, 2010.

Caputi M, Russo G, Esposito V, Mancini A and Giordano A: Role of cell-cycle regulators in lung cancer. *J Cell Physiol* 205: 319-327, 2005.

Carbonnelle D, Jacquot C, Lanco X, Le Dez G, Tomasoni C, Briand G, Tsotinis A, Calogeropoulou T and Roussakis C: Up-regulation of a novel mRNA (NY-CO-1) involved in the methyl 4- methoxy-3-(3-methyl-2-butenoyl) benzoate (VT1)-induced proliferation arrest of a non-small-cell lung carcinoma cell line (NSCLC-N6). *Int J Cancer* 92: 388-397., 2001.

Cary LA, Han DC, Polte TR, Hanks SK and Guan JL: Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol* 140: 211-221, 1998.

Cavaille J: [MicroRNA are everywhere]. *Med Sci (Paris)* 20: 399-401, 2004.

Cespedes RD, Caballero RL, Peretsman SJ and Thompson IM, Jr.: Cryptic presentations of germ cell tumors. *J Am Coll Surg* 178: 261-265, 1994.

Chen CZ, Li L, Lodish HF and Bartel DP: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303: 83-86, 2004.

Cheresh DA, Leng J and Klemke RL: Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J Cell Biol* 146: 1107-1116, 1999.

Christiani DC: Smoking and the molecular epidemiology of lung cancer. *Clin Chest Med* 21: 87-93, viii, 2000.

Cooper MS and Schliwa M: Motility of cultured fish epidermal cells in the presence and absence of direct current electric fields. *J Cell Biol* 102: 1384-1399, 1986.

Costa FF: Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. *Gene* 357: 83-94, 2005.

Crompton M: Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 12: 414-419, 2000a.

Crompton M: Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol* 529 Pt 1: 11-21, 2000b.

Crouch, Fincham VJ and Frame MC: Targeted proteolysis of the focal adhesion kinase pp125 FAK during c-MYC-induced apoptosis is suppressed by integrin signalling. *Oncogene* 12: 2689-2696, 1996.

D

Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S and Baulcombe DC: An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101: 543-553, 2000.

DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnica-Worms H, Huang CM and Livingston DM: The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 58: 1085-1095, 1989.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS and Reed JC: IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* 17: 2215-2223, 1998.

Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS and Reed JC: X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388: 300-304, 1997.

Dolfi F, Garcia-Guzman M, Ojaniemi M, Nakamura H, Matsuda M and Vuori K: The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15394-15399, 1998.

Doll R and Hill AB: A study of the aetiology of carcinoma of the lung. *Br Med J* 2: 1271-1286, 1952.

E

Eddy SR: Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet* 2: 919-929, 2001.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498, 2001.

Elmore S: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516, 2007.

F

Fashena SJ, Einarson MB, O'Neill GM, Patriotis C and Golemis EA: Dissection of HEF1-dependent functions in motility and transcriptional regulation. *J Cell Sci* 115: 99-111, 2002.

Fincham VJ, James M, Frame MC and Winder SJ: Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *Embo J* 19: 2911-2923, 2000.

Fong KM, Sekido Y and Minna JD: Molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 118: 1136-1152, 1999.

Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E and Chan-Hui PY: Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 134: 793-799, 1996.

G

Garcia M and Samarut J: v-jun cooperates with v-erbB to transform the thrombocytic/megakaryocytic lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8837-8841, 1993.

Giancotti FG and Ruoslahti E: Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032, 1999.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H and Parks WP: *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1417-1423, 1973.

Girard L, Zochbauer-Muller S, Virmani AK, Gazdar AF and Minna JD: Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res* 60: 4894-4906, 2000.

Glading A, Chang P, Lauffenburger DA and Wells A: Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 275: 2390-2398, 2000.

Green DR and Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312, 1998.

Green DR: Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94: 695-698, 1998.

Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschlager C, Wurl P and Taubert H: Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 126: 73-80.

H

Hall AR, Dix BR, O'Carroll SJ and Braithwaite AW: p53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nat Med* 4: 1068-1072, 1998.

Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD and Kaye FJ: Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 241: 353-357, 1988.

Harte MT, Hildebrand JD, Burnham MR, Bouton AH and Parsons JT: p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 271: 13649-13655, 1996.

Harty LC, Guinee DG, Jr., Travis WD, Bennett WP, Jett J, Colby TV, Tazelaar H, Trastek V, Pairolero P, Liotta LA, Harris CC and Caporaso NE: p53 mutations and occupational exposures in a surgical series of lung cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 997-1003, 1996.

Hecht SS: DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res* 424: 127-142, 1999.

Hensel CH, Hsieh CL, Gazdar AF, Johnson BE, Sakaguchi AY, Naylor SL, Lee WH and Lee EY: Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in small cell lung cancer. *Cancer Res* 50: 3067-3072, 1990.

Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Kasugai T, Ishiguro S, Takami K, Nakayama T and Nishisho I: MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *Br J Cancer* 75: 1302-1308, 1997.

Hill C and Doyon F: [The frequency of cancer in France in year 2002, and trends since 1968]. *Bull Cancer* 93: 7-11, 2006.

Hollander MC, Philburn RT, Patterson AD, Velasco-Miguel S, Friedberg EC, Linnola RI and Fornace AJ, Jr.: Deletion of XPC leads to lung tumors in mice and is associated with early events in human lung carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13200-13205, 2005.

Hu Z, Wang Y, Wang X, Liang G, Miao X, Xu Y, Tan W, Wei Q, Lin D and Shen H: DNA repair gene XPC genotypes/haplotypes and risk of lung cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 115: 478-483, 2005.

Hungerford JE, Compton MT, Matter ML, Hoffstrom BG and Otey CA: Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis. *J Cell Biol* 135: 1383-1390, 1996.

Hunter CA, Ellis-Neyer L, Gabriel KE, Kennedy MK, Grabstein KH, Linsley PS and Remington JS: The role of the CD28/B7 interaction in the regulation of NK cell responses during infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 158: 2285-2293, 1997.

I

Ilic D, Furuta Y, Suda T, Atsumi T, Fujimoto J, Ikawa Y, Yamamoto T and Aizawa S: Focal adhesion kinase is not essential for *in vitro* and *in vivo* differentiation of ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 300-309, 1995.

Ishida S, Huang E, Zuzan H, Spang R, Leone G, West M and Nevins JR: Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* 21: 4684-4699, 2001.

Ishino M, Ohba T, Sasaki H and Sasaki T: Molecular cloning of a cDNA encoding a phosphoprotein, Efs, which contains a Src homology 3 domain and associates with Fyn. *Oncogene* 11: 2331-2338, 1995.

J

Jacquot C, Carbonnelle D, Tomasoni C, Papaconstadinou A, Roussis V and Rousakis C: Identification of a novel putative non-coding RNA involved in proliferation arrest of a non-small cell lung carcinoma cell line treated with an original chemical substance, methyl-4-methoxy-3-(3-methyl-2-butanoyl) benzoate. *Int J Oncol* 25: 519-527, 2004.

Jaronczyk K, Carmichael JB and Hobman TC: Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others? *Biochem J* 387: 561-571, 2005.

Jeremias I, Reinhardt D and Debatin KM: [Impaired apoptosis regulation as cause for illness]. *Hno* 49: 673-682; quiz 683, 685, 2001.

Ji P, Diederichs S, Wang W, Boing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H and Muller-Tidow C: MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 22: 8031-8041, 2003.

Jiang F, Ye X, Liu X, Fincher L, McKearin D and Liu Q: Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*. *Genes Dev* 19: 1674-1679, 2005.

Jostes RF: Genetic, cytogenetic, and carcinogenic effects of radon: a review. *Mutat Res* 340: 125-139, 1996.

Juin P and Evan G: Caspase 8: the killer you can't live without. *Nat Med* 6: 498-500, 2000.

K

Kalma Y, Marash L, Lamed Y and Ginsberg D: Expression analysis using DNA microarrays demonstrates that E2F-1 up-regulates expression of DNA replication genes including replication protein A2. *Oncogene* 20: 1379-1387, 2001.

Kennerdell JR and Carthew RW: Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95: 1017-1026, 1998.

Références

Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972.

Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ and Plasterk RH: Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15: 2654-2659, 2001.

Kim R, Emi M and Tanabe K: The role of apoptosis in cancer cell survival and therapeutic outcome. *Cancer Biol Ther* 5: 1429-1442, 2006.

King KL and Cidlowski JA: Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem* 58: 175-180, 1995.

Klemke RL, Leng J, Molander R, Brooks PC, Vuori K and Cheresch DA: CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol* 140: 961-972, 1998.

Kohtz JD and Fishell G: Developmental regulation of EVF-1, a novel non-coding RNA transcribed upstream of the mouse *Dlx6* gene. *Gene Expr Patterns* 4: 407-412, 2004.

Kopper L and Timar J: Genomics of lung cancer may change diagnosis, prognosis and therapy. *Pathol Oncol Res* 11: 5-10, 2005.

Kratzke RA, Shimizu E and Kaye FJ: Oncogenes in human lung cancer. *Cancer Treat Res* 63: 61-85, 1992.

Kreuzer M, Boffetta P, Whitley E, Ahrens W, Gaborieau V, Heinrich J, Jockel KH, Kreienbrock L, Mallone S, Merletti F, Roesch F, Zambon P and Simonato L: Gender differences in lung cancer risk by smoking: a multicentre case-control study in Germany and Italy. *Br J Cancer* 82: 227-233, 2000.

L

Larsen CJ: [Update on molecular mechanisms of carcinogenesis]. *Bull Cancer* 85: 9-19, 1998.

Lassus J and Ranki A: Simultaneously detected aberrant p53 tumor suppressor protein and HPV-DNA localize mostly in separate keratinocytes in anogenital and common warts. *Exp Dermatol* 5: 72-78, 1996.

Lassus P, Ferlin M, Piette J and Hibner U: Anti-apoptotic activity of low levels of wild-type p53. *Embo J* 15: 4566-4573, 1996.

Références

Law SF, Zhang YZ, Klein-Szanto AJ and Golemis EA: Cell cycle-regulated processing of HEF1 to multiple protein forms differentially targeted to multiple subcellular compartments. *Mol Cell Biol* 18: 3540-3551., 1998.

Law SF, Estojak J, Wang B, Mysliwiec T, Kruh G and Golemis EA: Human enhancer of filamentation 1, a novel p130cas-like docking protein, associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 3327-3337, 1996.

Law SF, O'Neill GM, Fashena SJ, Einarson MB and Golemis EA: The docking protein HEF1 is an apoptotic mediator at focal adhesion sites. *Mol Cell Biol* 20: 5184-5195., 2000.

Lee GY, Jang JS, Lee SY, Jeon HS, Kim KM, Choi JE, Park JM, Chae MH, Lee WK, Kam S, Kim IS, Lee JT, Jung TH and Park JY: XPC polymorphisms and lung cancer risk. *Int J Cancer* 115: 807-813, 2005.

Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ and Carthew RW: Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117: 69-81, 2004.

Leighton PA, Saam JR, Ingram RS, Stewart CL and Tilghman SM: An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression. *Genes Dev* 9: 2079-2089, 1995.

Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R and Raines EW: Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 187: 579-586, 1998.

Li L, Yan L, Liu Z, Wang Z, Wen T, Chen X and Huang G: [Cellular apoptosis, proliferation and bcl-2 Bax expression in colorectal carcinoma and their association with tumor prognosis]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 36: 614-616, 120, 1998.

Liu AY, Torchia BS, Migeon BR and Siliciano RF: The human NTT gene: identification of a novel 17-kb noncoding nuclear RNA expressed in activated CD4+ T cells. *Genomics* 39: 171-184, 1997.

M

Ma ZL, Yang HY and Tien P: [Progress of miRNA and its functions in eukaryotes]. *Yi Chuan Xue Bao* 30: 693-696, 2003.

Mabry M, Nelkin BD, Falco JP, Barr LF and Baylin SB: Transitions between lung cancer phenotypes--implications for tumor progression. *Cancer Cells* 3: 53-58, 1991.

Références

Manie SN, Beck AR, Astier A, Law SF, Canty T, Hirai H, Druker BJ, Avraham H, Haghayeghi N, Sattler M, Salgia R, Griffin JD, Golemis EA and Freedman AS: Involvement of p130(Cas) and p105(HEF1), a novel Cas-like docking protein, in a cytoskeleton-dependent signaling pathway initiated by ligation of integrin or antigen receptor on human B cells. *J Biol Chem* 272: 4230-4236, 1997.

Marin MS, Lopez-Cima MF, Garcia-Castro L, Pascual T, Marron MG and Tardon A: Poly (AT) polymorphism in intron 11 of the XPC DNA repair gene enhances the risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 1788-1793, 2004.

Marsit CJ, Hasegawa M, Hirao T, Kim DH, Aldape K, Hinds PW, Wiencke JK, Nelson HH and Kelsey KT: Loss of heterozygosity of chromosome 3p21 is associated with mutant TP53 and better patient survival in non-small-cell lung cancer. *Cancer Res* 64: 8702-8707, 2004.

Martens JA, Laprade L and Winston F: Intergenic transcription is required to repress the *Saccharomyces cerevisiae* SER3 gene. *Nature* 429: 571-574, 2004.

Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, Chow N and Akoulitchev A: Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* 445: 666-670, 2007.

Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP and Zamore PD: Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123: 607-620, 2005.

May GH, Funk M, Black EJ, Clark W, Hussain S, Woodgett JR and Gillespie DA: An oncogenic mutation uncouples the v-Jun oncoprotein from positive regulation by the SAPK/JNK pathway *in vivo*. *Curr Biol* 8: 117-120, 1998.

McCawley LJ, O'Brien P and Hudson LG: Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)- mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. *J Cell Physiol* 176: 255-265, 1998.

McManus MT, Haines BB, Dillon CP, Whitehurst CE, van Parijs L, Chen J and Sharp PA: Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *J Immunol* 169: 5754-5760, 2002.

Minegishi M, Tachibana K, Sato T, Iwata S, Nojima Y and Morimoto C: Structure and function of Cas-L, a 105-kD Crk-associated substrate-related protein that is involved in beta 1 integrin-mediated signaling in lymphocytes. *J Exp Med* 184: 1365-1375, 1996.

Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M and Takahashi T: Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 6: 4055-4063, 2000.

Miyakis S, Liloglou T, Kearney S, Xinarianos G, Spandidos DA and Field JK: Absence of mutations in the VHL gene but frequent loss of heterozygosity at 3p25-26 in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 39: 273-277, 2003.

Monia BP, Holmlund J and Dorr FA: Antisense approaches for the treatment of cancer. *Cancer Invest* 18: 635-650, 2000.

Moreau D, Jacquot C, Tsita P, Chinou I, Tomasoni C, Juge M, Antoniadou-Vyza E, Martignat L, Pineau A and Roussakis C: Original triazine inductor of new specific molecular targets, with antitumor activity against nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 123: 2676-2683, 2008.

Morrison DK and Cutler RE: The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 174-179, 1997.

Mountain CF: The international system for staging lung cancer. *Semin Surg Oncol* 18: 106-115, 2000.

Muller H and Guadagni S: Regional plus systemic chemotherapy: an effective treatment in recurrent non-small cell lung cancer. *Eur J Surg Oncol* 27: 190-195, 2001.

N

Newton TR, Patel NM, Bhat-Nakshatri P, Stauss CR, Goulet RJ, Jr. and Nakshatri H: Negative regulation of transactivation function but not DNA binding of NF-kappaB and AP-1 by IkappaBbeta1 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 274: 18827-18835, 1999.

Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D and Nikiforov YE: MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1600-1608, 2008.

Nojima Y, Morino N, Mimura T, Hamasaki K, Furuya H, Sakai R, Sato T, Tachibana K, Morimoto C, Yazaki Y and al.: Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130Cas, a Src homology 3-containing molecule having multiple Src homology 2-binding motifs. *J Biol Chem* 270: 15398-15402, 1995.

O

O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Gallagher M, Cassella A, Vasilevskaya I, Monia BP, Holmlund J, Dorr FA and Yao KS: c-raf-1 depletion and tumor responses in patients treated with the c-raf-1 antisense oligodeoxynucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A). *Clin Cancer Res* 5: 3977-3982, 1999.

O'Neill GM, Seo S, Serebriiskii IG, Lessin SR and Golemis EA: A new central scaffold for metastasis: parsing HEF1/Cas-L/NEDD9. *Cancer Res* 67: 8975-8979, 2007.

O'Neill GM and Golemis EA: Proteolysis of the docking protein HEF1 and implications for focal adhesion dynamics. *Mol Cell Biol* 21: 5094-5108, 2001.

Ohashi Y, Iwata S, Kamiguchi K and Morimoto C: Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate lymphocyte-type is a critical element in TCR- and beta 1 integrin-induced T lymphocyte migration. *J Immunol* 163: 3727-3734, 1999.

Ohba T, Ishino M, Aoto H and Sasaki T: Interaction of two proline-rich sequences of cell adhesion kinase beta with SH3 domains of p130Cas-related proteins and a GTPase-activating protein, *Graf. Biochem J* 330 (Pt 3): 1249-1254, 1998.

Oktay M, Wary KK, Dans M, Birge RB and Giancotti FG: Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Cell Biol* 145: 1461-1469, 1999.

Osada H and Takahashi T: Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* 21: 7421-7434, 2002.

Osada H, Tatematsu Y, Masuda A, Saito T, Sugiyama M, Yanagisawa K and Takahashi T: Heterogeneous transforming growth factor (TGF)-beta unresponsiveness and loss of TGF-beta receptor type II expression caused by histone deacetylation in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 61: 8331-8339, 2001.

P

Références

Pachnis V, Brannan CI and Tilghman SM: The structure and expression of a novel gene activated in early mouse embryogenesis. *Embo J* 7: 673-681, 1988.

Pahl HL: Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866, 1999.

Parker JS, Roe SM and Barford D: Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *Embo J* 23: 4727-4737, 2004.

Parker JS, Roe SM and Barford D: Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434: 663-666, 2005.

Pauler FM, Koerner MV and Barlow DP: Silencing by imprinted noncoding RNAs: is transcription the answer? *Trends Genet* 23: 284-292, 2007.

Perol M. RG. Cancéroguide Pourmon (CBNPC) (Paris, 2007).

Petersen S, Wolf G, Bockmuhl U, Gellert K, Dietel M and Petersen I: Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumour progression and metastatic phenotype. *Br J Cancer* 77: 270-276, 1998.

Polte TR and Hanks SK: Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10678-10682, 1995.

Prescott E, Osler M, Hein HO, Borch-Johnsen K, Lange P, Schnohr P and Vestbo J: Gender and smoking-related risk of lung cancer. The Copenhagen Center for Prospective Population Studies. *Epidemiology* 9: 79-83, 1998.

R

Rastan S: X chromosome inactivation and the Xist gene. *Curr Opin Genet Dev* 4: 292-297, 1994.

Rayet B and Gelinas C: Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18: 6938-6947, 1999.

Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, Figlin RA, Holmes EC, Piantadosi S, Cordon-Cardo C and Slamon DJ: Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group. *Oncogene* 8: 1913-1919, 1993.

Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA and Dynlacht BD: E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* 16: 245-256, 2002.

Rodenhuis S: Oncogenes and human lung cancer. *Cancer Treat Res* 45: 89-106, 1989.

Roussakis C, Gratas C, Audouin AF, Le Boterff J, Dabouis C, Andre MJ, Moyon E, Vo NH, Pradal G and Verbist JF: Study of *in vitro* drug sensitivity on a newly established cell line from a primary bronchial epidermoid carcinoma of human origin (NSCLCN6). *Anticancer Res* 11: 2239-2244., 1991.

S

Sabichi AL and Birrer MJ: Regulation of nuclear oncogenes expressed in lung cancer cell lines. *J Cell Biochem Suppl* 24: 218-227, 1996.

Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, Ogawa S, Tanaka T, Mano H, Yazaki Y and Hirai H: A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes *in vivo* with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *Embo J* 13: 3748-3756, 1994.

Sakai R, Nakamoto T, Ozawa K, Aizawa S and Hirai H: Characterization of the kinase activity essential for tyrosine phosphorylation of p130Cas in fibroblasts. *Oncogene* 14: 1419-1426, 1997.

Sakakibara A and Hattori S: Chat, a Cas/HEF1-associated adaptor protein that integrates multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 275: 6404-6410, 2000.

Salgia R, Hedges TR, Rizk M, Reimer RH and Skarin AT: Cancer-associated retinopathy in a patient with non-small-cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 22: 149-152, 1998.

Sanz-Ortega J, Saez MC, Sierra E, Torres A, Balibrea JL, Hernando F, Sanz-Esponera J and Merino MJ: 3p21, 5q21, and 9p21 allelic deletions are frequently found in normal bronchial cells adjacent to non-small-cell lung cancer, while they are unusual in patients with no evidence of malignancy. *J Pathol* 195: 429-434, 2001.

Scadden AD: The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol* 12: 489-496, 2005.

Schlaepfer DD and Hunter T: Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol* 8: 151-157, 1998.

Références

Schoenwaelder SM and Burridge K: Evidence for a calpeptin-sensitive protein-tyrosine phosphatase upstream of the small GTPase Rho. A novel role for the calpain inhibitor calpeptin in the inhibition of protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* 274: 14359-14367, 1999a.

Schoenwaelder SM and Burridge K: Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 11: 274-286, 1999b.

Schulze A, Lehmann K, Jefferies HB, McMahon M and Downward J: Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev* 15: 981-994, 2001.

Seidl CI, Stricker SH and Barlow DP: The imprinted Air ncRNA is an atypical RNAPII transcript that evades splicing and escapes nuclear export. *Embo J* 25: 3565-3575, 2006.

Sherr CJ and Weber JD: The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10: 94-99, 2000.

Shimizu E, Coxon A, Otterson GA, Steinberg SM, Kratzke RA, Kim YW, Fedorko J, Oie H, Johnson BE, Mulshine JL and al.: RB protein status and clinical correlation from 171 cell lines representing lung cancer, extrapulmonary small cell carcinoma, and mesothelioma. *Oncogene* 9: 2441-2448, 1994.

Siavoshian S, Boesch S, Pondaven P, More MT, Riou D, Dabouis G, Andre MJ and Roussakis C: Cloning of a human cancer cell line (NSCLC-N6) and comparative study of the clones *in vitro*. *Anticancer Res* 18: 193-200, 1998.

Singh MK, Dadke D, Nicolas E, Serebriiskii IG, Apostolou S, Canutescu A, Eggleston BL and Golemis EA: A Novel Cas Family Member, HEPL, Regulates FAK and Cell Spreading. *Mol Biol Cell* 19: 1627-1636, 2008.

Slatter JG, Su P, Sams JP, Schaaf LJ and Wienkers LC: Bioactivation of the anti-cancer agent CPT-11 to SN-38 by human hepatic microsomal carboxylesterases and the *in vitro* assessment of potential drug interactions. *Drug Metab Dispos* 25: 1157-1164, 1997.

Sleutels F, Zwart R and Barlow DP: The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 415: 810-813, 2002.

T

Tachibana K, Urano T, Fujita H, Ohashi Y, Kamiguchi K, Iwata S, Hirai H and Morimoto C: Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion

kinase. A putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates. *J Biol Chem* 272: 29083-29090, 1997.

Tahbaz N, Kolb FA, Zhang H, Jaronczyk K, Filipowicz W and Hobman TC: Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep* 5: 189-194, 2004.

Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF and Minna JD: p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 246: 491-494, 1989.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T and Takahashi T: Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 64: 3753-3756, 2004.

Tam IY, Chung LP, Suen WS, Wang E, Wong MC, Ho KK, Lam WK, Chiu SW, Girard L, Minna JD, Gazdar AF and Wong MP: Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 12: 1647-1653, 2006.

Tamura S, Nakamori S, Kuroki T, Sasaki Y, Furukawa H, Ishikawa O, Imaoka S and Nakamura Y: Association of cumulative allelic losses with tumor aggressiveness in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 27: 669-676, 1997.

Tredaniel J, Savinelli F, Vignot S, Bousquet G, Le Maignan C and Misset JL: [The consequences of passive smoking in adults]. *Rev Mal Respir* 23 Suppl 2: 4S67-64S73, 2006.

Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP and Sharp PA: Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev* 13: 3191-3197, 1999.

Tyczynski JE, Bray F and Parkin DM: Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *Lancet Oncol* 4: 45-55, 2003.

V

van Seventer GA, Salmen HJ, Law SF, O'Neill GM, Mullen MM, Franz AM, Kanter SB, Golemis EA and van Seventer JM: Focal adhesion kinase regulates beta1 integrin-dependent T cell migration through an HEF1 effector pathway. *Eur J Immunol* 31: 1417-1427, 2001.

Vaux DL: Caspases and apoptosis - biology and terminology. *Cell Death Differ* 6: 493-494, 1999.

Vineis P, Airoidi L, Veglia F, Olgiati L, Pastorelli R, Autrup H, Dunning A, Garte S, Gormally E, Hainaut P, Malaveille C, Matullo G, Peluso M, Overvad K, Tjonneland A, Clavel-Chapelon F, Boeing H, Krogh V, Palli D, Panico S, Tumino R, Bueno-De-Mesquita B, Peeters P, Berglund G, Hallmans G, Saracci R and Riboli E: Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *Bmj* 330: 277, 2005.

Vu TH and Werb Z: Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14: 2123-2133, 2000.

Vuori K and Ruoslahti E: Tyrosine phosphorylation of p130Cas and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix. *J Biol Chem* 270: 22259-22262, 1995.

W

Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ and Bar-Sagi D: Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1: 20-26, 1999.

Wen LP, Fahrni JA, Troie S, Guan JL, Orth K and Rosen GD: Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem* 272: 26056-26061, 1997.

Weng LP, Wang X and Yu Q: Transmembrane tyrosine phosphatase LAR induces apoptosis by dephosphorylating and destabilizing p130Cas. *Genes Cells* 4: 185-196, 1999.

White E: Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 10: 1-15, 1996.

Wynder EL and Graham EA: Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *J Am Med Assoc* 143: 329-336, 1950.

X

Xia H, Qi Y, Ng SS, Chen X, Li D, Chen S, Ge R, Jiang S, Li G, Chen Y, He ML, Kung HF, Lai L and Lin MC: microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs. *Brain Res* 1269: 158-165, 2009.

Xu HJ, Hu SX, Cagle PT, Moore GE and Benedict WF: Absence of retinoblastoma protein expression in primary non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 51: 2735-2739, 1991.

Xu LH, Owens LV, Sturge GC, Yang X, Liu ET, Craven RJ and Cance WG: Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth Differ* 7: 413-418, 1996.

Y

Yamaguchi T, Matsuda K, Sagiya Y, Iwadate M, Fujino MA, Nakamura Y and Arakawa H: p53R2-dependent pathway for DNA synthesis in a p53-regulated cell cycle checkpoint. *Cancer Res* 61: 8256-8262, 2001.

Yamakita N, Ikeda T, Murai T, Komaki T, Hirata T and Miura K: Thyrotropin-producing pituitary adenoma discovered as a pituitary incidentaloma. *Intern Med* 34: 1055-1060, 1995.

Yokota J, Mori N, Akiyama T, Shimosato Y, Sugimura T and Terada M: Multiple genetic alterations in small-cell lung carcinoma. *Princess Takamatsu Symp* 20: 43-48, 1989.

Yokota S, Kayano T, Ohta T, Kurimoto M, Yanagi H, Yura T and Kubota H: Proteasome-dependent degradation of cytosolic chaperonin CCT. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 712-717, 2000.

Yu Y, Xu F, Peng H, Fang X, Zhao S, Li Y, Cuevas B, Kuo WL, Gray JW, Siciliano M, Mills GB and Bast RC, Jr.: NOEY2 (ARHI), an imprinted putative tumor suppressor gene in ovarian and breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 214-219, 1999.

Z

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA and Bartel DP: RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33, 2000.

Zeigler ME, Chi Y, Schmidt T and Varani J: Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol* 180: 271-284, 1999.

Références

Zeng Y and Cullen BR: Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem* 280: 27595-27603, 2005.

Zhong WZ, Williams MG and Branstetter DG: Toxicokinetics in drug development: an overview of toxicokinetic application in the development of PNU-101017, an anxiolytic drug candidate. *Curr Drug Metab* 1: 243-254, 2000.

Annexe 1

Séquence de l'ARN messager du gène HEF1 et mise en évidence de l'alternance des différents exons.
Référence GenBank : L43821, Homo sapiens enhancer of filamentation (HEF1) mRNA.

1 tgaattcgtg agagacttga gggaggcgct gcgactgaca agcggctctg cccgggacct
61 tctcgccttc atctagcgct gcaactcaatg gaggggcggg caccgcagtg cttaatgctg
121 tcttaactag tgtaggaaaa cggctcaacc caccgctgcc gaaatgaagt ataagaatct
181 tatggcaagg gccttatatg acaatgtccc agagtgtgcc gaggaactgg cttttcgcaa
241 gggagacatc ctgaccgtca tagagcagaa cacaggggga ctggaaggat gttggctgtg
301 ctcgttacac ggtcggcaag gcattgtccc aggcaaccgg gtgaagcttc tgattggtcc
361 catgcaggag actgcctcca gtcacgagca gcctgcctct ggactgatgc agcagacctt
421 tggccaacag aagctctatc aagtgcmeta cccacaggct gctccccgag acaccatcta
481 ccaagtgcc a cttcctacc aaaatcaggg aatttacc aa gtccccactg gccacggcac
541 ccaagaacaa gaggtatata aggtgccacc atcagtgagc agaagcattg ggggaaccag
601 tgggccccac gtgggtaaaa aggtgataac ccccgtaggg acaggccatg gctacgtata
661 cgagtaccca tccagatacc aaaaggatgt ctatgatata cctccttctc ataccactca
721 aggggtatac gacatccctc cctcatcagc aaaaggccct gtgttttcag ttccagtggg
781 agagataaaa cctcaagggg tgtatgacat cccgcctaca aaaggggat atgccattcc
841 gccctctgct tgccgggatg aagcagggct tagggaaaaa gactatgact tccccctcc
901 catgagacaa gctggaaggc cggacctcag accggagggg gtttatgaca ttctccaac
961 ctgcaccaag ccagcagggg aggaccttca tgtaaaatac aactgtgaca ttccaggagc
1021 tgcagaaccg gtggetcgaa ggcaccagag cctgtccccg aatcaccac ccccgcaact
1081 cggacagtca gtgggctctc agaacgacgc atatgatgtc cccgagggcg ttcagtttct
1141 tgagccacca gcagaaacca gtgagaaagc aaacccccag gaaagggatg gtgtttatga
1201 tgtccctctg cataacccgc cagatgctaa aggctctcgg gacttggtgg atgggatcaa
1261 ccgattgtct ttctccagta caggcagcac ccggagtaac atgtccacgt cttccacctc

Annexes

1321 ctccaaggag tctcactgt cagcctcccc agctcaggac aaaaggctct tcttggatcc
1381 agacacagct attgagagac ttcagcggct ccagcaggcc cttgagatgg gtgtctccag
1441 cctaattggca ctggtcacta ccgactggcg gtgttacgga tatatggaaa gacacatcaa
1501 tgaataacgc acagcagtgg acaagggtgga gctgttcctg aaggagtacc tccactttgt
1561 caagggagct gttgcaaagt ctgcctgcct cccggaactc atcctccaca acaagatgaa
1621 gcgggagctg caacgagtcg aagactccca ccagatcctg agtcaaacca gccatgactt
1681 aatgagtgc agctggtccc tgaatatctt ggccatcaac aagccccaga acaagtgtga
1741 cgatctggac cggtttgtga tgggtggcaaa gacggtgccc gatgacgcca agcagctcac
1801 cacaaccatc aacaccaacg cagaggcct cttcagacc gccctggca gcttgcactc
1861 gaagaatggg ccggagagca tcatgaactc aacggagtac ccacacggtg gctcccaggg
1921 acagctgctg catcctggtg accacaaggc ccaggcccac aacaaggcac tgccccagg
1981 cctgagcaag gagcaggccc ctgactgtag cagcagtgat ggttctgaga ggagctggat
2041 ggatgactac gattacgtcc acctacaggg taaggaggag tttgagaggc aacagaaaga
2101 gctattggaa aaagagaata tcatgaaaca gaacaagatg cagctggaac atcatcagct
2161 gagccagttc cagctggttg aacaagagat taaaaagccc gtggagaatg acatctcgaa
2221 gtggaagccc tctcagagcc taccaccac aaacagtggc gtgagtgctc aggatcggca
2281 gttgctgtgc ttctactatg accaatgtga gaccatttc atttcccttc tcaacgcat
2341 tgacgcactc ttcagttgtg tcagctcagc ccagccccg cgaatcttcg tggcacacag
2401 caagtttgtc atcctcagtg cacacaaact ggtgttcatt ggagacacgc tgacacggca
2461 ggtgactgcc caggacattc gcaacaaagt catgaactcc agcaaccagc tctgagagca
2521 getcaagact atagtcatgg caaccaagat ggccgcctc cattaccca gccaccggc
2581 cctgcaggaa atggtgcacc aagtgcaga ctttctaga aatgccagc tgttcaagcg
2641 ctctttgctg gagatggcaa cgttctgaga agaaaaaaaa gaggaagggg actgcgttaa
2701 cggttactaa ggaaaactgg aaatactgtc tggttttgt aatgttatc tatttttga
2761 gataatttta tataaaaatg aaatatttta acattttatg ggtcagacaa ctttcagaaa
2821 ttcagggagc tggagagggg aatctttttt tccccctga gtgttcttat gtatacacag

Annexes

2881 aagtatctga gacataaact gtacagaaaa cttgtccacg tccttttgta tgcccatgta
2941 ttcattgtttt tgttttaga tgtttgtctg atgcatttca ttaaaaaaaaa aaccatgaat
3001 tacgaagcac cttagtaagc accttctaata gctgcatttt ttttgttggt gttaaaaaca
3061 tccagctggt tataatattg ttctccacgt cttgtgatg attctgagcc tggcactggg
3121 aatctgggaa gcatagtta tttgcaagtg ttcaccttcc aatcatgag gcatagcatg
3181 acttattctt gttttgaaaa ctcttttcaa aactgacat cttaaacaca tgatggccaa
3241 gtgccacaaa gccctcttgc ggagacattt acgaatata atgtggatcc aagtctcgat
3301 agttaggcgt tggaggaag agagaccaga gaggtttagag gccaggacca cagttaggat
3361 tgggttggtt caatactgag agacagctac aataaaagga gagcaattgc ctccctgggg
3421 ctgttcaatc ttctgcattt gtgagtgggt cagtcagatg gttttccaaa agatgttttt
3481 agagttgtaa aaaccatatt tgcagcaaag atttacaaag gcgtatcaga ctatgattgt
3541 tcacaaaaat aggggaatgg tttgatccgc cagttgcaag tagaggcctt tetgactctt
3601 aatattcact ttggtgctac tacccttatt acctgaggaa ctggccaggt cttgatcat
3661 ggaactatag agctaccaga catatcctgc tctctaaggg aatttattgc tatcttgac
3721 cttctttaa actcaaaaaa catatgcaga cctgacactc aagagtggct agctacacag
3781 agtccatcta atttttgcaa cttccccccc cgaattc

Annexe 2

LOCUS GQ497714 54690 bp RNA linear PRI 10-SEP-2009
 DEFINITION Homo sapiens large regulator RNA B2 gene, complete sequence.
 ACCESSION GQ497714
 VERSION GQ497714.1 GI:257196321
 KEYWORDS .
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM [Homo sapiens](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
 Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 54690)
 AUTHORS Jacquot,C., Carbonnelle,D., Tomasoni,C., Papaconstadinou,A.,
 Roussis,V. and Roussakis,C.
 TITLE Identification of a novel putative non-coding RNA involved in
 proliferation arrest of a non-small cell lung carcinoma cell line
 treated with an original chemical substance,
 methyl-4-methoxy-3-(3-methyl-2-butanoyl) benzoate
 JOURNAL Int. J. Oncol. 25 (2), 519-527 (2004)
 PUBMED [15254752](#)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 54690)
 AUTHORS Malleter,M., Jacquot,C., Moreau,D., Tomasoni,C., Tsvetanova,M.,
 Chinou,I., Juge,M., Pineau,A., Le Pape,P. and Roussakis,C.
 TITLE A novel large regulator RNA B2 partially overlapping the
 hef1/nedd9/cas-1 gene
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 3 (bases 1 to 54690)
 AUTHORS Malleter,M., Jacquot,C., Tomasoni,C. and Roussakis,C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (20-AUG-2009) Iicimed ERATU Cancer Pulmonaire et Cibles
 Moleculaire, Universite de Nantes, Ufr des Sciences
 Pharmaceutiques, 1 rue Gaston Veil, Nantes 44 035, France
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..54690
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="genomic RNA"
 /db_xref="taxon:[9606](#)"
 /chromosome="6"
 /map="6p25-p24"
[ncRNA](#) 1..54690
 /ncRNA_class="other"
 /product="large regulator RNA B2"
 /note="regulator RNA"
 ORIGIN
 1 attggagttg gcttgagtga tatgtattct tttaccact tggcatgact cttttagat
 61 tcaattgctg aaacatgcat gcctttgctc atgggacaca gccatggatt tcaactggag
 121 tgtcttgtaa tatgtggtat atgctctaaa tctctttcta aaatctgaaa tattctgaat
 181 tccacaagct catctggcct ccagggtttt gaacaaggaa ctgtgaatct gtttttaggg
 241 tgaggaagcg cagaacttac ttgcagagag cagggtggga aagattaggg ggcacatcag
 301 agaggggatg gttaggagagc tgagtcccag agtgggcttg agaggagaga aaaaaaatgc
 361 acagagctgt ctggataaaa aggaagaca gttttttttt tttgcctggt gaccagaact
 421 gcacaggtga tgacttttga aaatgtagag tgattttaag atggcaaaaat gaaaactggg
 481 ggaagacatg gcctctatca gctagggcca ggagggcaca gcctttcttc ttgtcactac
 541 tctccacccc tcttaagacc agaagctcca aaagcaggtt agagcatgaa tcaggagaac
 601 tgcagccctc gggttcaaga acacccttgc aacactccct tgtctacatc gtcaagtctg
 661 aaatcacagc gtgccaggcc ttcagcaagt taagagaact tatacttagt gcctgtaaag
 721 ctccagggta ccagtgagcg agacttcaag tcttgtgcat gctcattgcc agacccctt
 781 tggctttttg tataaagaag agagctgctc tttatttccg ggctcagtg gcaaaaagga
 841 atgctccgct catactccgt tcggcaagtc aagggtggac actggtgtct ttatcaccac
 901 ccagtctctg gccacactg gcaaggcatt cctctagcag acaaaaataa agattgtga
 961 tagctggagc actttgtttg cttttctaaa cgagtcaaac ttttcaaaa cttggcttga
 1021 accgtgcagg gtgtgctgtg ttcccgcac attcctctca cccgcctctc caccaggcct
 1081 tgtattatcc ggattccttt catgctgctc cgagcgccag ctggcggttg cttgggctgg
 1141 cgggacagcg cagagctctc gggcccgggg cctgctggac atggccggcg ctcagctgat
 1201 gagggcagcg gggcagggga gggaggcctt cttggagggc tgggtcagct gggctcttt
 1261 aaggcacaag ggggagaaaa tgcatctcca acccctgaag aaatgaggtg cctgggcat
 1321 tactagtggc catttgggtt taaaacact cccttctccc ccatttggta ctgtccctac
 1381 ctccgccccg gagctatgc tggatggctg gtgtggaaga tggcttcccg aggcagctgt
 1441 gcgctggaga atggcaagc tcggaagtag attggaaca gaaaatccag ccatctagg
 1501 aagctagggc acacaatcca taagcctttt ctgcttagtc caactagaca atagcaagac
 1561 gtggagaggg gaagagggct acaaaagtcg atcatatcac atgatgtcat gccatggcaa
 1621 gtgggaaaga tcatgtctta taccacatga catcacatga aaagtgtatg ccagagaagt
 1681 caggaagact tttcaaatgt aagaacatag agaggaagca caaaggttag caagaagaag
 1741 acctgatgac tttgctcccc ttcatttaat aggtagtagt caccaagatg attgtgtttg

Annexes

1801 ggcagtgcc cccgaaagag gagacggcca ctctcatttc agccatgaga gtccattcct
 1861 gtttatttga tgttggcaga tcaactcaac ctttgtaaaa atccacagtg tgaagtttct
 1921 atcagcagaa aagatttcca tgacagtttc atataacaag ttgtttattt ggacaaacta
 1981 aagcatgtaa taacagaaca cctcacggct agagaaaaa gtagagagag gctttgccag
 2041 gcagcctgca caattttact attaactcc ttttgttcca ctgaaactta tgcctttacc
 2101 tagctgggga cacataaata gtagaaatgt gaaccttgca caattatgga gataagccta
 2161 aatctttatg catttctaatt ttttcttata acttcaacct taagtttaatt catccaagtc
 2221 tttcatgtaa agaaaaatgc aaaaatggagc gtcacaattg cttgtcacat ttoactagag
 2281 tgcagtgaaat ttatttaaca cctaatttaa tctgtcaacg tttttcaatt ctttgaagaa
 2341 aaaaaggtag taattaagta ttccaaagtt ataataacac taaacatcaa aacttcacaa
 2401 tccgacagtt ttttaaacat caagttaaga tattagccat agtcaactcca ctttaaggtg
 2461 tctggctagg tttttagtag cacggtagtg acacggtttt acgtgttcta tttcatggtt
 2521 tatcaagaac taagaggggc ctaagacatc ccatttttagc gcttcaccct tgggataatt
 2581 aaaagcccac tcaaaagatg ggaaggaagc aggaagaggg ctcagtagga tgggtgggtg
 2641 taaggggctg tacagtgaca gcctgctcaa gctcagctaa gtggtaagag gcaccaggtc
 2701 ctctgcaagt cttcacagtg tggagaccca ccgctgctg gtaacctaga agatctagag
 2761 aaactgcttc catttctctgc tgcctagcgc cccaccacc ccaggcagct tgtccttgag
 2821 agcgaatga gttaggaggg aaccaaatga gaagaaatc agggatcacg agtcaaggag
 2881 cttttttaga agacactacc ctccacctcc atctgcagaa acaaaattct tttttttttt
 2941 tttttttttt gagatgaagt ctctgctctgt cccagggctg gagtgcagtg gctcagatct
 3001 ggctcactga aatctccgcc tcccgggttc aagcgattct cctgtctcat cgtcccaagt
 3061 agctaggact acaggtgtgc accaccatgc ccagctaat tttgtatttt tagtagagat
 3121 ggggtttcac catgttggcc aggatggctc caatctcctt acctcatgat ccacctgct
 3181 cagcctccca aagtgtctgg attacaggtg tgagccaccg tgcctggcct atttttttt
 3241 ttaatacgaa cttaacaagt ctttcagaaa atagaatgta ttccataggac actgttgcta
 3301 acgaggtag tcgggtaag gtcgggtagc cttcatgagg tctctgtgac caaaaatatta
 3361 gtggagggaa agtgaatgaa agccctattt cacagtatat aaagaatcaa gcattaaaac
 3421 tcttttgggc ttttctctaa taatagactt tcattcattc caagagcttg accagttcaa
 3481 cagataaaaag aggtttattg ccttgaagtg agagggagctc attcccttgcc cttctgagaa
 3541 gtggcttatt tgtcccctg ttgaattcag tgaaggcagt gtgcacagac aagacacagg
 3601 ctttgagagg acaaaagatg gggttcagtc acctacataa gtgcacaaat ggctacaaca
 3661 aaagaaaaga cagaaccctc tctataaat tgctcaaaat ctcaattgcyg aaaagaaact
 3721 ctcacaaaag aaaccatgta agggaatacc aagcactaaa tgggtgtgta tatacataaa
 3781 actgactaga gagcatatgc agattttttt tatttttatt ttttttagaga cagggtctca
 3841 ctctgtctcc caggctgca tgcagtgcca caaacatggc acactgcagc gttgacctcc
 3901 tgggctcaag tgatcctccc ccctcagcct cctaagtaac tgagactata ggcatgcacc
 3961 accacacctg gtttaattttt ttttaattttt atttctgtag agtgggagtc ttgctatatt
 4021 gccaggtctg gtctcaaaact cctgggctca agcaatctc ctgcttggc caaccaagt
 4081 gctaggatta caagtgtgag ctaccgcaca cagccatgaa gatcacttta aacgggtaga
 4141 ttccatagcc tcatactaag cctactgcyg ctcatactta aaggagagag gcctaagcat
 4201 tttcaattgt ttcttaagg aaattggatt tgggaagcat agacttaggc cacaggtgac
 4261 gggagctccag agatacagag gaagattgga gggaggagag caacaatgga gagatttttc
 4321 taggaaaggt tttataaaga agatggggtg caagcgggag gcacgatagg atgtaggtaa
 4381 gcagagccac aaggtgggyc agagtgatga aagaagaact acatacgcac aggtcccaac
 4441 gtgcacgtga gtaaggggtg tgtgcatttg tatttacacg gctgcatcag ccctcctcac
 4501 aactcaagaa caataacctgt ttctcagttg agcttagtcc cacgggggtg gagactcgac
 4561 cttattgagc ggcaaacat gtgctcagat aacgaagtgc attaattcat tcattcatat
 4621 gaagagaatg gcagcaatat agctccatgg tcaggggccac acagactcag aaaccagaaa
 4681 gcctgggttc ataaacaaaa tgggcatca ccctgtaagt tgggcgatgc tgtagaactt
 4741 ctctcagttg ggtttgtgta agtgtaaagt aagaacaata caagctacct cacagggctg
 4801 ttacgtgaga tgaatattaa atggactcct gcttgtaaac atctggcaca gggcctggca
 4861 cctcggaggg tttcggtgaa ggctgaatga accaagagtc agttagtattg aaggagaaaa
 4921 ctctcaatgg ctgtcttttg aggaggtttc tggagacttg taaaagactg gaaaagttgc
 4981 tgcctccaat tatttttgaa ataagcttgg tatatgtaga ttgtttttaa aaactaatgt
 5041 caaactagaa atgataaaac atggccctag aatggttcct ttttaggact gggctgtgtc
 5101 cctcgtgcta gcaactcact agcttccaga ttgttcccct gtatagtgtyg aaagatctat
 5161 actttattct gaactcagcc atagatgtac cttgcactaa tctagagttg gggctggcaa
 5221 acttctagag acaaccaaat aatacttttt cttctctggc tttgggggct tggccatctc
 5281 tgtggcatgt gctcagatc tgccattaca gctcaaaaga catccctaca tgaataggga
 5341 tggctgtggt ccaataaaat tttatttata gacatogaaa tttgaatttc acatcatttt
 5401 catgtctcat ctttggtttt tttcccaacc acttaaaaat gtaaaagcta tttctggctc
 5461 atagatgcag aactagcaac aggccttgag ttggttctga aaaggtgcat cctaacacca
 5521 ttttaataaa atggaaaaact cactgctaaa ctcaaacaca cgggggaata tgtcttccct
 5581 gttcccttcc tgggcaccaa acagaacctc atgataaaca tacgttcttt gaagttaocat
 5641 ttatcttctt actcattgat gctgcaagca tttatgcacc tctaaggatg acaacaggac
 5701 aggggacaca gatgaacaag ataccacctc gttccccaag aacacacatc ggagctgggg
 5761 aaacagacat caacaatatc ttatgagaca acgtggaag ccttataat agggcgtgtg
 5821 tccagtaaca tgggggcata gtgaaggag ggaggaatta gttctgaaag ggcgaggtg
 5881 gcaggggtgg ggtttagtag aaggatacac aaaaggttga gtgttgaggc caaacttgac
 5941 agcagaagag tgaagggggg tcaattctcag caaaggggccc tgcctgacta agtcaggaag
 6001 gtgcaagtcc gtcttggaa cagtaagttc ccggcaacc cacactcca agtatggcta
 6061 gagggtggga tgggggtcgg cggtagaggg agaagaaag ggtgggttca gatggtggtc
 6121 catgccaagg tgcocagatt ttgcttgtaa agccattgaa gtgtcactag aggtttttaa
 6181 acacggtagt aatgtgatgc actctgtatt ccaggaatta aacacgtagt gagcaactg
 6241 gaagatagat gacagcagtg agagagttag gcaagaaac taaaaagaaa tcattagaat
 6301 agaccagacc aagagattca ggggcctgac ctaccacca attgctgta taactcaaac
 6361 tgggtggggc ctgtgtgagg cactcaatct ctctgagcga cagacagctc tgcctctct
 6421 atgagtggtg ggattaggtg atttccaaag tcatttctct ccctcacatg ctctcactc
 6481 tttgcccctc actcttagag agcagtcacg tgggttctat ccaagttgtc aacagaagta
 6541 tttctctctt ctagcctcct cttgattttt tgctgtattt atgccagtcg ccagttgacg
 6601 ctggaaaatc attagaatgg catccggtgc catttccctc actcctgcct gcacaagcat
 6661 ctggaaggaa gagtgtcttg ttgaagagca ggcaggcggc aaggatgaca ggggggatg

Annexes

6721 cccaccggag tgctggcaag tgcaggaagt ggaaccggag gccacaggtt ctagecaatt
6781 tcaggagggg ctctatggga atcctagggc tgctgcataa atcaattaca tagcccagtt
6841 taaacatcat ttttgcctct gatagtaata aatgaggaag ggaattgttt ctgtattcac
6901 tgagacaatt tgtgtttccc tgaagagttt taagggcaac atactaaatg acactaataa
6961 agtaacaact atctgcatta ttaagctgc attaagacca gagctcaata ttttaactag
7021 tagcctgctg tccttgatg tttacaacac cggagagaaa cagattactc cctgggtcaa
7081 acactgcaga ggcttcatgt cacactcagg aaaaaaatcc aagctcccta ccacctacct
7141 ctctgagctc atcctctcca tccagccctg tgtaccccac gctaagcaca ctgacagctc
7201 tgctgcgctt agacacacta agctcgtgcc tactgctggc ccttcccctg ggtcacttct
7261 gtcocggaatg ctcatcccct agatctctga gtggctggat ccctgaaact attcagattt
7321 ctgcttaaat atcatctcct cagaggagct tccctgacca ctttatctaa aataatcac
7381 ctctgtctcc accctggctt gtttctctcc agcaattttc cctgcttaat ttttctcat
7441 agcattttatc actgcacaatc atattataca ttcatttaat tattttcctc aactctcact
7501 agactgtaag ctccatgaag atgggaactt tgcctgggct actgctgtat cctcccctcc
7561 tagaaaggta cctggccatc gctaggtgct ctagtataa cagttcagtg agaaagctgc
7621 cttatgaaag aatggccacac agagaagggg ttctccaac ttcttctgaa tgccctaccac
7681 acttatacaac agtagtctaa tattaact agttataatt aatacaataa ttaataata
7741 atctatagaa tatagcaata atgtcataaa atattaacaa aatatacata atctgatatt
7801 aattaaaaata ataactaata acaacagtaa taagaacaag caaccattta aggtcttaca
7861 atgtaacaat tactatataa ttctatccac attatcttat ttaactctca ttataggctc
7921 agcaggtatt attattttct ctatttcata ctgaaggaca tcaaaattaa gaagttcaac
7981 tggccaggga cagtggccca cgctgtaat cccagcactt tgggagactg aagcaggtag
8041 atcacctgag gtcaggagtt cgagaccagc ctggccaatc tgggtgaaac cctgctctac
8101 taaaaatata aaaaattagc caggtatggt ggcagacaca tghtaatcca gctactcggg
8161 aggtgaggg aattgcttga accagagatg cggggattgc agtgagccga tattgcacca
8221 ctgcactcca gctcgggcaa caagaatgaa actttgtctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
8281 ttaaaaatgt tttgaggttc cagcacaggt ttactctgatt ccaacacctc tgtgctttcc
8341 tttaggcagc taactatata ctgacccaag ccttctttaa atgaacttcg ggtagattac
8401 atgtgtctta cttactctac aggacagaaa caggaaagca ggagggccac tagctagaga
8461 atgaaattac aaaaaaaccc cagcacaac ttaggaaac tgtttgaaaa cattaaata
8521 ggtggggaca gcaactcact actcaatgat atctatcaaa caaaacagaa aaaggattca
8581 gcttgaccac aagtcatgta tttagaagcc aaaggaatgt tatctagatc tcttgaggcc
8641 atcttacaga tgggaagggc ttggaatcat tgcctcctt tatccaggta gacccaaaa
8701 acaatttctc gcaactaac gactctcgg tcagtctgca ggattcttaa ggagatcgtt
8761 acaatgcaat atgtcgcgt cttaatttgt gttcagaaag gcctgcaca atcactcagg
8821 cttatttttg ctctaaggac aatgagggag aagcaaggcc taatacaggc tggaaacagg
8881 atgtcaacct cattagtagt gcctgggggg tcatgtccct ggaatcagtg ccactcaga
8941 ctgcaaacac acctgccaac cctgtatctg gaaaccactt ttgtaggaca gctgttctct
9001 cattcctttt gcttagatca taaaagtaga gtttctatcc attgggaatt tgtgtgttag
9061 acgcaagggg aatcagattc tgatccaact tggtcaggaa aaaaaaaaaa aagggtctgat
9121 ttttccatcc aagtcatgta gtctgggtgg agtgcactcc actcagggac agctattgtc
9181 tggattcacc gactctcagt cttgcccggg aaaaaggaat ttttccctc actgctctgt
9241 ccgtgagaag agttgcagaa ggtgaccatt tctgttttct ggggtattct ctttctctat
9301 agaaatccta aaaaagaaac tttatagaaa ttatgttctg tgcttcgctg gagagagact
9361 ggtcttttta accaggtcca tcaaacagtg ggcattttcg ttctcctgga taataaggtg
9421 tgggtgggta atgggtcact ctacggacag aggtcagaag gaaaaaacct gcagtgttca
9481 aagctggagc tagaaatgcc agccgtcaaa gaacacagaa ctcagttgag ggtgatgatg
9541 tatagggcgt gcaactggca accccatccg agaggtcaca tctaactctt atcctcagca
9601 aagcactgca aggtcgtcca atatgtgtga cccgcaactc tgaggccctg gtgagaagct
9661 gtcaggaaaa acgtgggtgc gtgtgctaga gggttccttt tcaactaagg agaattgtct
9721 tccagctcct tcagactga catcgcaaa gactttgaa gttgaaagaa caaaaaaaag
9781 caaacagta cacacacaca aaaagtaggc gggaggagg ggaagaaaa agggacagag
9841 agagagagag gttatcagcg ggggtggtag taaaaagggg cccggagaca gaaaacctt
9901 tgttcccggg gttcgtttca ttagagatt gtgaggtgaa tggctttgaa acgaaatggg
9961 tttatgaag agttgctagg tcacaggaag cgcgactgtc agactgcttt tgtgaattca
10021 gtttctttaa aatttgggtt aatcttaaaa agaattgatc tcttttctc gtttcttctc
10081 tttctgtctt cttttttggc gggggcggga ggacagagta aggttcagga cgttccccca
10141 cttctgtttt tattttocac cgtctgataa agcaaaaaaga agcagatcaca ttacaagttc
10201 tttgtcagtt tttcagaatt aggggtgggc agggcctgag cattaccttg tcccactagc
10261 caatggcggg gcggcatgca aatgaggtcc gcatcagcc tgctcagtc acaacagtg
10321 gctcagagac ttgagggagg cgctcgact gacaagcggc tctgcccggg acctctcgc
10381 tttcatctgc cgctgcact aatggagggg cgggcaaccg agtgcttaat gctgtcttaa
10441 ctagtgtagg aaaacggctc aacccaccgc tgcgaaatg aagtataagg taagagagtg
10501 ccttttacag gttactctgc aagctgaaag ctgtgcctgc ggggtgtgtc ttgtgtatg
10561 gtgttcttta ctgtcagctc cttgtgtgtc cggagaggt ctaagatgag tctcgtcac
10621 tgaggttgac atgcaagcag acaagcaagc agagaccggc tctttgagac ccactccagg
10681 ggttcacagt acaccggagt ccatctgctc tgaagttgc cgggaaata cctcggtag
10741 aagttaagac ttggagccgc ttcacagcag ccactggaga tcagagggtg tctgacttga
10801 atcggcggcag gcaattggctc aagctcctt ggcttccccca ggctggctt ccactgccc
10861 ggggaactgt aatgagagga atgaggactg catagtctgt ctgactcgg gctctagtgc
10921 aaagttttcc agactttgct ttaactgctt ggtctcggaa ggagatgccc atatgcactt
10981 tttgtggggg aaataaaaag ccagatttac acagctgagg atggaaaaatt ttgacatcct
11041 tatgttatat tggatgtagg aataaataag tatgagccat ttcttgaaaa catttttatt
11101 ggagtttgaa tgggggtgaga gtgcaagggc tcaggctggc tcattgtgccc tgaagctta
11161 cagagtgatca tagtcatagt actcagcag cattattttc caatgcattt tacaccattg
11221 tttgtgggatt tttctggcca aaaggatttt tgacttgctc cgtatattcc cccctcccct
11281 ttttctttaa agtcaactcc atctaaggag gcaagcagct tccaggggac acaaaagaa
11341 cagactgcaa tgaattggac atgaattttt cttgaatgat gaatagacat gagtgcagt
11401 gctactatht tattttatgc taattttaaac aaaaagtgtta ttataagat ggaattgggc
11461 aagggtgcta ggcttgtgga ttgacaattt atattaactg tacactagct ggaagctact
11521 tcgctttttt tctaaaattt tctggtccat ccttttttga tghtaagggtg taaactctg
11581 gtcactactga tagccactga ctgactcag taataaagct tttgttcaaa aactatgaat

11641 cttattcaaa agctttaagt ctaaatgtca aaagtcttta tagtaatgcc tacgttacca
11701 ctgtctgaag acacaggtat cagctatttc tgtttcatca gctttctatt atcttcatca
11761 gttagggaaga tcagaggaaa gggtoatcct gaagactatt aatatttgac tttaggatgc
11821 aaccagaaac aaatccctct acttggcagg aaagtatct tccttaaagt ggctcaccoc
11881 atatttccctt atttagaaca atgataggac cagatattac tcagcctgga gtgacttttt
11941 tgctcctcct ttcctgttg ttgaataaga actggcttgc agaaaaaaga gaaagtatgt
12001 tcatatgtct attattggaa agtataaatg gctgaaatta acattgagtg ctataatcta
12061 gaaagtgcag aaagcgaaa agtctcaagt cacttttatt caatgatctc atcgtggtta
12121 gctttactct ttatggaaa aaaatctaaa ggcaactgat aaagtgactg acagcgtaaa
12181 ctgctgattg cattcatgga gaaacctgct tctccactgg gccttactgg tgttgaacac
12241 cttgcaaat ctccagaaa gatgtaata catgattttt attacctgt aggcaccttc accagcaaaa
12301 aagctaaact ctccgaccga acacatgact tatgacctat gatgactatt aaatcaacca
12361 atagctgaag aaatccactt tcctttttta taaagttttc tttctctcta gttaataatg
12421 aacaacttta cttcagaaa ggattttgtt attgtaagta gaggagagac acaaaagtaa
12481 tgaagtaaca ttaattgaga cttactgtga caacacaaga ttgtcatatt caactctccc
12541 aatagctcta caagtggggt attattttta tactcaattt caaatgacac agagaggcta
12601 agtaatttat ctaatgccac acagctagaa agtggtgagc tgggattaga actaaggcga
12661 tctggctcca gaactcatga ctttaaccac tattaagaga aagagaaga gctatcgttg
12721 acctctctaa aatattggca gtgttttctt ctcccagaaa gtttaagact atttcatccc
12781 aagtattcct ctaatgccac tctcttttaa gatagtaact ctacaaagca aaatgaagtg
12841 catgtttggc agttatttgt ttaattcgag ccacttaggt agtaaaacca gataattatt
12901 agatggtaaa atccagaga caggaattat ctctaaaata ctacgttgc ctatgcaactg
12961 taaatttagc acaaacctta aaatgtttac tgaagactt atgaaatcagg cctataaga
13021 ttgtcgttgt taacctgatt atctggtttg gctgcccag ggatcacacac tacggacaa
13081 caaaccttca cttattttgc acttaataata catagcttca ggcaggcag caaggtactt
13141 gcagtaactc tgagaactgt ggaatgtaag ctattactcc ggacagacat tctcgtttag
13201 cacttatcta atctgtcttt atttccctgt atgtttttat ttgtccacag gaaggttgc
13261 gtcaactgtca tacgactta attttccatt tctcttagaa gggattcagt ctgtggttat
13321 gtgatagtaa attcggggg cttcatttat taagaatttt ctacaaaatc ccttcatat
13381 acagagcatg ttcttaattg ggcgggggct ggcgggggta ggtgatgcc tcgatggcct
13441 tggtttgctt acccagtgaa ggctccctcc tgagggtctg gagggtgatg gttgtgctg
13501 ttcccaggag ggtgatgaa ggtctctgca gcagctgtgt ttgagcagaa gcccccgaga
13561 cccaccoccc ttgtgctg ccaggcccga gcccccgcc acctcaggcc cagcccgggc
13621 gggggctcag cggccccttg gcctggctgc taatggctga gcagagacgc ttttgggct
13681 ttgcaaat ctgagccct tactgacct cattaataat ctaaatatt tatctcgtct
13741 accatgcaac aaattcattc ttaacgttt tgactgaaga aaaattacag acggaactta
13801 caatgcoatt aagaaagggt cattctgaaa gtcagagtc tgtgttctgg ttgaatggg
13861 taggtcagg aaagagaaac ctgtgtgccg tgaaacgctt tggaaaggac tttgaaagta
13921 ttcgtatttc ctcaagcaag accgaggaaa ataagacag aggatcttta atttagtcaa
13981 tatggtoatg cataagctat taaattccca attatttctt tgccttgata ttttggttta
14041 aatgctttta tttttctctg tatgattttt gcaaccaatc caaatgtagg actcctgtcc
14101 ttttcccttt taaaccttgt atgagatcta tggatttaaa atcaactaaa catgctttga
14161 aaaatataca cttggttatt tatgtattta tgcatttatt tatttattta gtaaaccat
14221 ttgcagagct aaatggctta cctacacaga gataaaaagc tttagatgac tgaaggtgcc
14281 tgataatacc aaatttagca agttgtacag tgcgtaacat gccaaaggatt cctttagcat
14341 cctttcctct ctgggataca cgtcagctcc tgttctcaga attcagtggt tccctgtctc
14401 tcccttcaact tttttctctg gaaaaaaaaca ccttctctc cacttttctt tttttcttt
14461 tttgagatca agtctcactc tctgcccag gctggagtc agtgggtcca cctcagctca
14521 ctgagacctc tgcctcctgg gttcaagtga ttctctgtc tggcctcct gagtagctgg
14581 gattacaggt gccaccacc atgcctggat aagttttgta tttttagtag agatgggttt
14641 cactgtgttg gtcaggctgg tctcgaactc ttgacctcag gtgatccacc tgcctcagcc
14701 tcccaaaagt ctgggattac aggtgtgagc caccgcacc ggcctttttg caaattctct
14761 cccactttct tcttttatg acctcattgg ttctctttt atcttctct tcttctttc
14821 aggccttctc tacgcttctt taactactgac ttccgtagat cttacttcca acccctact
14881 cccagcccc ccaccgcac ctatctactg ccgcccctt gcctcccaca cacagatgtg
14941 acacttttaa tgcacattct gtagccctca tttttccttc tcttagact ctgctatggg
15001 aaatctgggt ccctcactgc cccattcat ctgctctct gtttgcgttt acatgacttg
15061 agtggcctgt cagtccogct agtaaaagtct cctcatccat ccactgttt taaaacaatca
15121 aactctgaaa cctgtgtctc ctggaaccac ctataatccc taaaataggc tgttatgctt
15181 ttcacctctg ccctactctg ttagcaactac cttacttatt gacctcttc aatcaaatcg
15241 ttatctaaag gatacctgta actcagatag gttgctact gggcctgttt agtttaagt
15301 aaacccact gaatatgaga gaccaccct ctatttgtat gttagaggcag attgatcgaa
15361 aagtccctga ataaaaaaca tgatctaggg tctgtgaagt tttgaggggg ccaagacttg
15421 gtgttttatg ctctgtgtt agagacatga tagagcatgg gctttgaaga aaggcatttc
15481 tttctcttat ggcttatagc tctggacct aggcaagtta agctctctaa gctcatttt
15541 acagcattgt ctgtaaaata gggataagaa taactgctc atactattcg aagacctggg
15601 ataatatatg aatgaaatgac ttactatggc tcttggcata tagtaagcag acaatgcaag
15661 ctggtccag ctctctttgt atggttagat ctcaatagat gttgaaagga tggatgtac
15721 tcaagactgt gtagcagaat tatgtcaaaa tccagttac taggttgaga tggttgaata
15781 ttgttgagta tctgtgggc ctggatgtgt attgtaagca tagggccta acagcatatg
15841 acccacttg ctaataact aatgacttga ttcttctatt attgttctt ggactcagta
15901 ttctgaaat tacaagact tgctcataga agcaaaaatg tatacacaaa tagccattta
15961 agaggatcct aactatata ggcatagtaa aaaaaaaca acaacaaca aaaaactggg
16021 cttgtttca gatcccact ttgttacttt ctaacagtat agttttatgc tagctacttt
16081 aaacctctt ttctcattt atcaaatgag aataatacct gtctgtcag atagtatatg
16141 gatataatat atgacaattg tcttctag cagatattag gcaattata aatggcagct
16201 attatatgat gttatataca catacccaca aagatataca gatataataga tatggaattt
16261 ttatatagat aaaagtgtt aaaggagaca ttcactagaa ttgtttacc ataacagaaa
16321 taccagtgag gaagagaaag tctgcaattc aaaaaaccaa agataaaatc caaagaatgt
16381 aagtggggag tacatgagaa gttcagggtg aactctctta tccaattgca gtcaattaga
16441 atgacataaa tgtaaagtga gaggtctgg ttgtctatgt ttgatcatt ttagggctag
16501 aaagaaatct gaacaaattg gtttgaaatg ccaaccacta ggaccaagcc aatactctgc

Annexes

16561 aagaacatat aggctgaatt accaggactt ctcgccaaga caaatgaaac agggccattg
 16621 ggaagaaata ctatatttct aacttaaaat gccagagagt aactgacggt ttctaggtg
 16681 atagatgggt gcaaagagta cgggcatgaa aaggggacac acacacacaa aaaaaaacc
 16741 tgtttatact ttgccaaaca cccccctc catcttattt actttgaaca ttccagccat
 16801 ctctctcgag taattcctgc tggctaataga ggattccaca cagtagggga acatgacagc
 16861 ctgcaaagga ttattttctt gaacaatctg cattttaaga taagtacacct tgttgtaac
 16921 cttttgtacc cttcattgga aagggtgact ctctttgaag acagtttgac caaacaatga
 16981 gatctaggtg aatttgagga agatagaacg ggcactccag aaatatggat agtggtgga
 17041 ctgacacagc tttttcatgg ttgacgtagg gagtgaggc agctgtcatg gagatattaa
 17101 agttgccaagt ggaatgtttt ccaatacata ttctctggcc ccacaatgga ctattaaatc
 17161 ccagttattc tttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaggccgggc gcggtggctc acacctgtaa
 17221 tcccagcact ttgggaggcc gaggcaggcg gatcacgagg tcaggagatc cagaccatca
 17281 tggctaacac ggtgaaaccc cgtctctact aaaaaatacaa aaaattagct gggcatgggt
 17341 gttgtccact gtaatcccag ctacttggga ggctaaggca ggagaatggc ttgaacccgg
 17401 gaggcggagc ttgacgtgag ccgagattgc accactgcac tccagcctgg gcgacagagt
 17461 gagactgctt caaaaaacaa acaaaacaaac aaataaacaa acaaaacaaa cagctagtct
 17521 ctttctcctt aatcccctca ctaaccaacta ctagtgtctt tgggtcttac acgggtgcta
 17581 agtaggtagt tcatgatcct tattcaaagg ctggatccag tgatttghta gtgtcatgtt
 17641 tctttgcaaa tctcagtcct gcgaattaga attcccctg atagtctaa catatcaagg
 17701 taatagtatt atgatgttac taaaaatgtc cctcacatga aatggtatgt ttatgcccac
 17761 aggaacacaa gatttagcaa caaatatgta aaagtgaac catttcaagc acaaaaaata
 17821 tttgatagcc cttttgaaat taatttgaat tccttttttt actgtgtgta tgtgtggtg
 17881 gggggcaggg gggcgggtga tggattaatt atctgtgaaa ccagtagaaa agttgcagta
 17941 accaaaacac gtgtaaagtt cagatttgaa ccagatctcc tgtctacttc ttaaggcatt
 18001 gtgcatttag atagtatatg tcatctcatg ttttctctagg ttttattggt caggcagaaa
 18061 cactgtgcta tctctggta actatgagtt agccttaatc tcaagtattc atgacagtcc
 18121 acttgttttc ctttaattaa tgcctcactc ccacaggaga tgaggctaac tgaggactca
 18181 tctagagacc tctttaagaa tgagctgggc ttttctgccc cccaacaccc tccgctccc
 18241 aaaataacaa taacaggcaa agccagcaca cagaaaaatg cagtaagtgg acttctagac
 18301 actccagcta cttctgagtc ttcagtgta ggacacatca gtcactgttc gatgagattt
 18361 ttttttctt tctcctttgt tctttctgtc ttgttactag tcaactgtgc atgactgaga
 18421 gtttggcagg aatgggttc gtggacctgt ggtacagtcg cactaccaca gcagcattgg
 18481 cctagcaaaa tgttgagccc tcttccctt gcactgtccc ctggggcaga agtccagtgc
 18541 tatctcctct cctcctgacc tctccactca gagcccagca tgacaagcac accttaaat
 18601 gggttcaagg aagggaaatg cagaaatgaa cgcagcccga cagcctcctt tctctgata
 18661 acccctgtca ctgtggagct ggacttctag gctatctcac agaggccagc aggcactgga
 18721 atcgatctca tttccttaca gacatcacct tgtcaattag agaacacata acgttgattg
 18781 aatttaagat tcttatacag gcctagctct tttctccca aatccgaaat tcagccatgg
 18841 cagatccata atcaagaaat atacttaact tcccactcct tgttgttggg ttcaaaaaata
 18901 tttctttttt gtgagtatgt atccatgttt tacaacacaa aaaaatggga catatggtct
 18961 gacaaaggga aggatatttg aacctgggga ctgctcggga gactccggaa gcacatggct
 19021 actctagaga ctgtcatcaa gggctgctcc tgagattaat ccactgtcga aggcattatc
 19081 ccatctcctt tacagcagcc ttttgaggga aactgtctaa gatgttggc ttttttttc
 19141 attgacttgt aaataacaag gtgctctcct tcttttctt tgacagaata ggcactttta
 19201 gaaataaagc catgcccatt ttgaaataag aactgttttg gaacacctga gactgttaag
 19261 cagtgccggg gatattgcat caattgttct tgcctttaaact ctggcatggg cgctctgcc
 19321 tcatagcccc cagcacctga atcaagcctc ctgctcctct tattaagatc ttaattacag
 19381 actcagctta gttcattgct gaagggaag aatttcaatt cctggaagtg tgtctgtttt
 19441 ttggtgtggc aggtgtaatc atgataagat catttctggg ttttttgggt tgttggtttt
 19501 ttttctcag aggaagtttt ttttccaag gggaggagta cagttcttaa gacacaattt
 19561 catgagctca tcttggcgca gtaataataa ctgtgctttg attttataga gactctttt
 19621 cctgaagaaa tcagagcatt tggagtaaat aatctcatga ttcctcatat ttttataaag
 19681 aagaacatgt ctattaatat ttattttgca gacagggaaa cagagggcaca aaaggcagag
 19741 atttgatggg catttagtctt caaatgtgaa gtctgaaact agaccctcct aattcagctc
 19801 ggtgtccatt cctctatcca gggttctca acctggcac tattgacact tagggcagg
 19861 tcatctcttg tgggtggggc tgtcctgtac actgtaggat gtttagcaac atccctggcc
 19921 actctaccca ctagatgcca gtaacacacg tgtgcatgca tgtgacatg cacacacaca
 19981 cacagtgaac accaaaaaat gccactaac attgcccgta ccagagggg acaaaaaatcc
 20041 tctagttga gaagcagtg tetaatctct tctactcctt ctccotaaaa ataaactgcc
 20101 tactcaaaaa taccocata gaactgactg ccataatttt atcattactg atattgagct
 20161 taatgtaaca ggtcctaacc aaaaagcaac ttctctctac aggccttggc ccagtttgtt
 20221 tcagtgaata ccacaaaata ctaagaagcg cagagtttca ttcaagtcaa atgtaaaacc
 20281 catcaaacca ctctcaagcc aactttaaag tatttctctg gcttctctct ctacaatatg
 20341 tacctcatca tggaaactgc atttagagct gggctcttaa gaaagctatt ttattctcat
 20401 aaactggtgt ataacatgtg cgtgtaagag cttgtctctc cacctcggca ctgaaacatt
 20461 tcacaatgaa ggttttttgt tccctttgct cctgccacct tttccctgtc ttctaactaa
 20521 gaagctgcag cttcaaaaac tcttctctga gacagcttag tggctgact gctgacagtg
 20581 tatgactgta aacacctctc agccaagtgt gtgaatctgt tttctaaaac tctctgagga
 20641 cctcacaagt gaagttagata ataccaatca ggcacaaaat ccaggtcaag tgacatctaa
 20701 aagagttcca gggagggttg gatcctattt acatcaactc ggttctggct gggagatgga
 20761 caacagttgc caggatgtgt atgcatttgt attgggtgggt ttgatataaa ccttgggctg
 20821 catagcttgg tgaaggaaga taagatagac aggaatggaa aaataggaac ctcttttct
 20881 tctttcaaac accttatcag atgttataac ttgtgcattt tgactttgag aaatgacatc
 20941 atttttggaa gtatatgtga atatagtaga ttggggtctc ctactccatt aaaacttaat
 21001 tcttatttct cttccctgag tacctggatg tttagagggat ttgtctagac aggcagatag
 21061 atatgatcca gttcaaacac gttcaatgct gctgaaatcc agatggttgt tttattgta
 21121 ataaaactca tcttgtgggt ggggtgggtg caggccttca tcattatatg gtgctgtca
 21181 gatttatcta cagacagaac cctgaaaaca gcttgtgctt gcccccatt tttgacccct
 21241 tgccaagata ctgtactgaa atctatcaaa atcaggcaac ctgggacaaa tgcctcgaga
 21301 ttccaaggct taatagcaac agtgctgact tctaagatgg agaagattct caggaagggc
 21361 atcctgtgct ggtggggaaa aattctagat taagaggtga accagatgct agctctggct
 21421 ctgocgctaa tctgagacc tctgggctgt aaaaataagga gatggggtta gaatggttcc

Annexes

21481 ttcttactct gaaattctac tctaatacaac tctgggcaag gtaggggga cttctgggtc
 21541 taatacctat aaaaaaccta ggtgttcttc cccctctctt tttctctttt cttttctctt
 21601 tttttttttt atgacagagt ctcgctctgt caccagcgtt ggagtgcaat ggcgtgatct
 21661 cagctcactg caacctccgc ctcccaggtt caagcaattc tctgcctca gctcccggag
 21721 taactgaaac tgcaagtgca cacctccatg cctggctaat tttttgtatt ttagtagaga
 21781 cgggggtttca ccaagttgca caggctggtc gcaaaactct gagctcaggc aatctgcca
 21841 cctcagcctc ccaaagtgtc gggattacag gtgtgagcca ccgtgcgcgg cctccacctt
 21901 ctttaagatt ctccagagtt gcttcggtaa acccaagac cacagatgag tgaaaaagaa
 21961 ctccagcagtc aaattcactc tccaccgtgg gccaggaat aatagaagtt gactgtgaca
 22021 ttgcacgtat acacacatat atgcaaatct gcctactaac tctttgccct aagattttgt
 22081 tggttacata gtaaaaaaat cctagcatat gaatgtgtct gtccagcacg aaccctaaat
 22141 caagcaagaa tagatggcat tcattcaagt atggggaagg agaggaaccc agcttttgag
 22201 gaaccccttt gtaattgcac agctatgctg tccatcatcat gttaccaaat ctggctcagag
 22261 agagatttct ttctgagatc caaatatcca aatttgagat gagcatcaga tcttttacc
 22321 agtctctcaa aagtaacttc actttggtat atgagccacc aaaaatagtc tgggttcaa
 22381 atgactcttc atcagacagc attggccagt gtggaagaga tgttaagatt ccaagccctg
 22441 gatctacaac cacacacagg cgcgtgcccc acagcacatc caggggatag taacagcttc
 22501 tcttgccatg tcaaagagta ccttcgggag gcaagtattt aatgtcacat tctcacaacc
 22561 ttctcccact cagacatgct caaaagagaa tgctatagct aaggttcaca aagctggaaa
 22621 atctaaagaaa ccttgaggac tctgggcaaa gtgaatgacg tcaagattcg cgggggggt
 22681 ccaagatact cctataagct ttgtaactgt cataggggtc tagaagaagc acttcccaga
 22741 aaataaaaaa tactgctgca aatgcagtct ggggtccaca ggaggccttg tgggaaatg
 22801 tgaacacctc tcagcagtg gcagaagat gccagggatt agtgggacaa agtgggtcc
 22861 tgcttttgcc tttctgtgag ctccattcag ctccactagt gaaaagtgtg tcagaacaca
 22921 gtcgacaaat agtactggga aaaaattagc atatottata ttatatcata acctatcata
 22981 tctctgtctc cctgtattga aagcttcatg cctgtgactt cataatctca agaggaacca
 23041 actcaaaaaa ttcgacattc cagatcttca gatcaagaa cctaagtgtg aaccaagat
 23101 tctgagaatt aaaaactctga cacttacaga tatccatggt tctgactat ggtgtttcc
 23161 ttctctgggg aaagcccaaca tcccctcta tcccaagggt gatgggtgga aggaaaggag
 23221 aatgtgagcc aaaaatggtt gcagttctca gaccaaaacc ggtttctgct agtatgaca
 23281 aaagcagctg agcctttctt tctcttccct gttgtgcccct gagactgacc ttgacaatg
 23341 taatccctca cctgactgca gctgctgccc ttaggactga ctctctgat gatggccatt tcttgaatg
 23401 tgtctgtttc tcagggtctg tctctgcat gcactgattt gcgcatgcag gcatgcaaac
 23461 ccacaagagt ccaggctaaa gttttggggg attgggtaca gaaaaatcat gtcattgaga
 23521 atggggcaac cctgaggcca tggcaggatc ccctgcactg caaatataga atgaaagtaa
 23581 aataatcaga ggaagccggg ccattgatga tgctatcagt cttagtgggg tgatacaca
 23641 gacattctgt ctcaattctc ttcaaacgac cgcagtagtg gtcattgaaa ctacaagtca
 23701 cacctctccc tatttggaaa agcagatcgt ttctctgaca taggagtaat aagctttctt
 23761 gacattttga tagcagtgag ggaagggaaa aaaggcaggg aggagttgga ggtggggtga
 23821 ggggtagaag ccgtcatgtg tcttagagct ctctgtacca gcgttctggt caactgtaca
 23881 gtattttctt cccaactcct aggcatagct tgggaaaccag gaacagcaga acccaagtgg
 23941 tctggcaaaag tgtttgaatg gtgctctgct acctagtgcc aaaagcagat tgcatacactg
 24001 aagggagaaa ggctcttaaa agagaccatt gtgtttaatc tcaactgggt ggtcagttcc
 24061 tcttggcctt cctgtttgct cctgtagttgc gaacactagt ttccaggggg tccaggctccc
 24121 gatctgctgc attatctctg ttaaataggg aggggcaggc cctttctctc tctctgtctc
 24181 ccatagttct tggctgtgag gcttgagtga cttggacatg acatttctct tctctgttca
 24241 ttcattttcc ccaactccat ctgaaaattc taaccaatg tcttctgtaa tctctaaagt
 24301 acaacaattt caccctccct gcagacaatg aggaaatcag agtccagaat ccatttcaac
 24361 ttagcaaaac tttactgagt ctatattttg tttcggatac tggggtaaaag tctctgaaat
 24421 gcaaaaaggaa tttgcatctc tgaacttaag gagttcacag tcttgaacag ggcaatccaa
 24481 gttgtactgt aaagaaatag tatgatcgag aactgggaaa ggaacagacc tttgaaatga
 24541 taccattctt ggttaaatgg aagatgggtt tgcaggggag aaggaattta atgcaggaaa
 24601 gccaaattggg aagcaatttc tgtgctacag aaaaaaaaaa aaaaaaagt gctgaagacc
 24661 tgaatgaagg gtggcagtg ggtgaaagc agggcccccag atgggttgca ggtcatgaa
 24721 agacacagca aacctctgca gctctactg cacagctgtg tgcactgctg taaccaagca
 24781 aagcaaaagca ggagaaaaag gtgtttgca tttgcttttag agaggaagat gccattaga
 24841 ctggatataa gggactggaa tgcagaagaa atatccagcg aagactatgg ctttaggaat
 24901 tatctgtatg ttcagatgcc atcctcctgt agagcgttag cacatagctg agaagaggaa
 24961 agtgcaaaag acaaatctct ttggaacatg atcaotttag ggaatggaaa aagatttagt
 25021 ctccagtgga gaataaggat gagagtgttc aagagaagac agagaacgaa aaagtggat
 25081 cgtggaggcc aagaagaagc agtttcaagg aagcttgggc tggggatcaa ggctagaggc
 25141 tgcctgcaatc agggttccct cagatagggc tcatgatcct aaatgctgat ttgcaatcct
 25201 gatttagagcc acagcttgtg ttgcacctgt atttccactg actaaaattct gtcccaattc
 25261 tagacctgaa gacaagaggc ctgaaattcct gttccagctc taagactttc ttgcccaggtg
 25321 agctggcaaa tcattaactc cttgaggctc attttttct tttgtaaagt gaaaggggtg
 25381 gacggtaatt gtttaaagt cctctgctct tccaagtct gtgccctaac tgttttggtg
 25441 ttttgccaag ctctagctgc actgctaact gccagccttt ggagactaac catccaagtg
 25501 aatatagagt tacatagctc tcttatctct ccttgatttg tttctgtgtt gaccttccct
 25561 acctgggaga taaatatcca agggggtgag tgggcaggag aaagagtaca tcttgagttag
 25621 attaaactgc ctctctgggg tttttctaag atagcagatc atcagcttct gactttgtg
 25681 ctcaaggaat cacacctttg cactgaagga gaggatccct ccacttctct gccagaagaa
 25741 ttcattctgt attttctat tacgactgat gtgcactttt gaatgagatg gtttatggtc
 25801 cagctgaaat tcatttggct gttatggtct tactgaaacc ttgcaccaac accaaatctt
 25861 ttcgaaaagtc caactcctgc ctcatgcctt ttctactctg ctgatgtatt atctgtgtt
 25921 gaactctgat acatttatcc ataatttato aagtagtata attattaata tgttgtctca
 25981 gaagttccct tgaatgcaac caatggtttc actattgctg tttgtaggca gatactcaac
 26041 aagaggttgc agtgacaaga actcattcat aattcagaaa tatactgctt taagataaca
 26101 gttcttctga aatgtaatcc tgagcaagat aaatatcaga taggtacaaa acatatataa
 26161 tagcatcatt ggaataggac caagcctgga ctgcaaatgg aaaggaggca agggggggag
 26221 ggagcctgaa gcccaagggc catctagcaa attaataaaa acatcacccat agcttaccaa
 26281 agaccgggaa actaagggccc aaagggatgc tgttgcctg caaagtaaca cagctagaac
 26341 ctaagaccgc aatatccaa tttattccat agacacaaaa agaagaaccy cctctcttca

Annexes

26401 gaactttatc atataatgga actgagccca gtaacaagga tgctgctggt ctgagctaag
26461 gtagcttaaa gttctggaaa gaggattaaa ctgaaagaac gcaattctct ttccatcgct
26521 gccaatagtg tggctctggg caaatgataa acttcaaatc tatttctctca tctgtgacac
26581 aaggggcattg tgtccagggt atctctaaag gtcctctggag ccgtaagctt cggtttagga
26641 gagggtgctg atgtagacat tggctctctg tagcttgccg agatattaaa taactatac
26701 tcctgttctgg ccaaggctga gaatatgtat cggtgtgtga ataggctggt gccgggtcc
26761 tggctactaa cagcaactgac aagctgtgcc tgaaacctaa tctctatggy cactgaggag
26821 gactgctggg aagctctgac aaccagtcag gaggactcac ctgocgtgcc cacatagcc
26881 cagactgtgg ggctctgaga gtttcccca agaagcagct cacaggccag tgtagaaca
26941 tttagccagct gctcaccagg tggtaagaag gttactgggg caggagacaa agaacgcca
27001 ggacgactct cgcacgggga tttctatctg cctctgatca agcatgctcc ggtgctccac
27061 ttcagtgctc catgggtgctc ttggagttgg aagtggccca attccgaatg ccttgagctg
27121 atttatgctg attagatctg tagccctttg cctttctact gttttctggt tctctcttt
27181 cccttctttg tagccagtat aattgocacag ctaccaacc ctgactccca tacaactagc
27241 ccgactctgt tgcctctgat ttcattgtgg ggcttcccga ttgctgaatg ggcccagaag
27301 aaagggacag acagaggcca gagtggctcag ctatctctc acttaataat ctocagtacag
27361 cctctggtgg gtcatttctc ggaggtcatt tttagtaaaag gaccagaatc ttgtcctctg
27421 taactctatg acttctcttg taaaatacag aataccaaa agatggggaga agagaacag
27481 agacaatttt aggattatga caccatcctt aaatgggtcc atgaacaggg gaaactgctg
27541 cctgattttt tctttatgta tgtgaacttt tcatgttag atgaaacca gcgctctg
27601 gaatattaac taccagtgga aaccttccc tgaatatgc actcctcagt ttcctttag
27661 cttccctggc cgtcaccctc tctgtgtctc acacttctg gatctcataa ctgtcaagaa
27721 aaagggactt aaccttattc ttgaagagta tcaaaaagct tctgaggac tgcctctat
27781 ggctttatct cttttaattg cctggctaa gaggaaactg gctcacagca gcagaactgg
27841 accgctccca actactgaat agagggcaga tcccttccat tgcacagccc tccagagcgg
27901 aaaacacaca ggaccgtgg caatggggct agcacaaggg gacgagta gtgcaagtca
27961 gctgcaaa aatgaaaagc acgaggctga atgatcaagt ccacgttgc agagaagaaa
28021 atagacagca aaagctcaga caatgacagc cgaaaatccc acgaatatgt catggtataa
28081 aataaagtca tgaacctgcc ccatccaatc cgtaactcct tcttccataa atgagccca
28141 cctcaatgac attaagtga tccaaacatc ttaacaaagc attagagttc acttttagtg
28201 ttccogagggc ttgtgctgaa tcaacaactg ccccgacttc gctgtgctct gggaggggg
28261 cagacatgag ggaatggctg cccgctgct gggaaaactt actaatgcca agaaatgaaa
28321 tcttccgagc ctttgaaggg cctccaagaa tgtcagcagc tactgctcgc cactctctg
28381 ctgaatgcct actttggctg tctgcttagt actgaatggt ccagacaggc cttcatataa
28441 agacggagag tgtgtgggc ccatgaaaag ggaaggcaca gctttctga tgtgaatggt
28501 gagatccaag aagttagtga cgaaggggga gggcaggag gggccctcag gaaaggtatg
28561 cataaaagac cgagagagaa gagttggcat ccactatgt gttataaat ttgtgtcaa
28621 agctggagat gtatatggct gctggcctat gctccaagct tgatggcatg tctacatgcc
28681 ttgctgtggy attctctctg gatccaaggg tctgtctatc tgagaacaag aatttctaag
28741 ccctgccaag gcatatata gtgtacttct attggcttt caactccaaa tataaatgct
28801 atttgactg ttgttattt gggattttt ttttactct ttcaactcca atatagaaca
28861 atattgagaa atgttcatg tccaacatct gaatatctcg ggtttttt ttcttaagc
28921 tcactttgaa aaaggaagaa aaatgtttg tatagtgaac catgctctaa ctctgtaaca
28981 ctgctactca taattcttg gcaaggcata tctgctaga ggaagaact cttctggtg
29041 tttgagcttt tccaaggagg cagtctgatg tcaactggtg cagatgcagt gtatatgat
29101 ctgtcttttg tctgcaccat ctgtttttc ccttacagtc tattgttcag atttatgctt
29161 ctctcttttc aggaagtgtg cctttccata agagcacggg ccttagtgta taaagggacc
29221 gacccaatat tctaacacgg tttccttctc ttccttccct cctagaactc tatggcaagc
29281 gccttatatg acaatgtccc agagtgtgcc gaggaaactg cctttcgcaa gggagacatc
29341 ctgacctatc tagacagaa cacaggggga ctggaaggat ggtggctggt ctcattacac
29401 ggtcggcaag gcattgtccc aggcaaccgg gtgaagcttc tgattggtcc catgcaagag
29461 actgcctcca gtcacagca gcctgctct ggactgatgc agcagacctt tggccaacag
29521 aagctctatc aagtgcocaa cccacaggct gctcccagc acaccatcta ccaagtgcca
29581 ccttctacc aaaatcagg aatttaccaa gtcccactg gccacggcac ccaagaacaa
29641 gaggtatata aggtgccacc atcagtgcag agaagcattg ggggaaccag tgggccccac
29701 gttggtaaaa aggtgagtaa atgactaact aaattttgt tctactttat tttttttcc
29761 cattacactt ggagcatttg gaaatgttcc caaattaata acttgaagct gccaagaagt
29821 agatataacc aatccttag ctacggcatc atgtttgcat gattttgcca ttcactatc
29881 attcagcaaa acttctttga actaccatgt gctgagtaca gttgatttcc agccctcta
29941 agttcctgtg tcatcctggg ttacatgggt tattaaactg tttctctcca tctttctcat
30001 atacagctt ctaagccttc actctgtgct cagatcgttt cctattttt ctgttcttc
30061 attgagtgga acaaacacca aatctctgac aagcctgatg atgcaacaag gatcctcct
30121 tggccaaaag ctgaatcatg acctcagtg cctggctgga caaggaacc acccaagta
30181 gcgagagtga ggaagctgg agtatgcat gctgaccaac tctttctata ggttatcag
30241 cttagtttga ctcatttaaa aatgcacaga tactagtgga attggaatga agccatctc
30301 ctgtccttca agtcatttct ataataatgc ctgaggcagt ggtgaaaac agtggagct
30361 ggtattttag gaaggaatta atttaaaaat acagtgtggg gactctgca acacctgtg
30421 taatcccaaa tacttttaga atttgaggtc aatagaaatt cactaattga acaatgatg
30481 ttgagcatct aatatatttt tgatgctgt gatacagtga ttaattaaag ataaacaaag
30541 ccctggtgat gcttacattg cgtgggggga gacagaagca accaagagaa tctaggtag
30601 ggacacgtgt tatcaggaaa ataatgtcag tggactgatc ggggtaaca cccacaacca
30661 aggtgatgct tatgtgagca tcacaaagga gggattttct ctttctattg ctggcaatt
30721 ccaatgggtc ctacaaggtt tggatttagg aatgaacaaa tttaatgga taagaagata
30781 tccctgaatt acaagagaa agatgcaatt acataccaga aagagcttgt tgacccttag
30841 aacactaact atagatgtgt cctgccccaa gtaaatctaa tatgaagtct gattttacaa
30901 acctctgtaa attaggaat atctatttga tgtattagaa tctctgtgtg aaaaaacaa
30961 ggattctctt aaacaatgaa agcactaatg catttttggg tacatggaaa gaggcagcct
31021 agagacctg tggagagccc ttagtgtttg gctggggagg tgccagggcc accctcctg
31081 cctcccacac ctggccatgt caccaccca gacctgacc ctgtgtgggt agattcctt
31141 aaacaacaaa gcactaatgc atttttaa atcactttgat ataaaaagta tgttttaca
31201 aatactctc aagagcacgc gtgtggcatg aactgagcgt aggttcgtta agagggattc
31261 ctcaaggggt gtgcacagct tttagacttg tactgcccac gacaacgatg ctgcctagag

Annexes

31321 gtgataaac gacttgtggc ttttcagtct tccttgtcct aggaattgta gattcaaaag
31381 gaaaacaaaa cctggcttct atctccagag gggaaaaata acagttgaaa ggtgtaacta
31441 taaaataagta acctcactca ttcttagtcc tgggtgtttg caccttaaaa atagctctcc
31501 cacatctgag ccagtgtag gcagaagggg aggccagagc aggaaaatgct tggctgggag
31561 gttgtgggct ctaaaccttc atcacagtgg actttggcag gaaggtagcg tgtttcctt
31621 ttttagacca accttttcag ctccaagtca gagaagccta agccttcaga cttcttcccc
31681 ttgtatctgc tgggactgcc ctgcaggctt tccccatggc tccccgtcct tcocagagggc
31741 agagatacgg actcatcttc ccttggattg atgtcaaaag gctgggggtgc tggggtgacc
31801 ctcgggcact cacattccat gttttgtttt gcttttttta agtctacact cagtagaaca
31861 ttttctgttt agcaaaaggt agatgagtc tgcaggagga aatcaacttc tgaaaatgac
31921 ctgtgccagc ccttccagga gttgcagcca gggctgaaga gtaggccgtg cctaagcat
31981 cacacagtca gggctctggg tagtgacatg gccaggatgg ggagggcaag aggggtggccc
32041 tggcaccttc cctgcocaaat accaagggct tctccacagt atcctgatcc tgggtctcta
32101 ggtgctctct ctccatgtac cccagagcag tggttcacat ccatgggagt gtggttgctc
32161 ctctctttct tttcactccc ttctcactt ctcttttcta tctctctctc tctctctctc
32221 tctctcccc catccccctc tcttccccct tccccctctt cctccccctc tctctttctt
32281 tcatagtggg gatggcttag ctgctaggag gtgattttag ccttccaggc aattgcaact
32341 gctttaaaaa acatctgtca acatcttctt gggatagga tattctcagt ggggtgggaat
32401 cattctaatg acttaagcct agggcctaa agataatccc agcacactgg ggatcaggcg
32461 tggctttttc atttttctga gttttgcattt tagtagtttt actgactggc ttaataaaagc
32521 aatttgctca ttttctctt aaatttttca tctgtaagat aatatgagcc cagaactaga
32581 tatgcctggg agtttaagct atggcttcta aaagctcttg aataagaaaa taaggaggca
32641 gtggactctt gatggcttag accgggggtg ggtttaaaaa tgttaatggg catagaatca
32701 cccagagag tagggcagtg agtttaaatg cagattccca ggtcttccc tcagagaaat
32761 taatccagta ggtctgggtg ggggcccagg aatctgcact ttattgagct ccttgcatag
32821 ttttgggtgg ggtggcctag gactagactt tgagaaacac tghtaaagga ccatgaaggg
32881 gctgggacat gctccaatct gattatgatt tgggactttc catagtcaa aattcccttg
32941 atattgtctac agactgtggg ctcccgaaat tttaccagc actgcttttt tctactaatg
33001 aatcacttaa gaaaaaa aagacagtga atctgcctt ctatcacttc aactttgctc
33061 tcttggaaac tccaactctt acccaccctc ttgcatcccc tccacactaa ctgacattca
33121 tcacatatta aatcagcatt tagagaaaaga aatatagtca taaaatcccc acccttttag
33181 gaaacaagca gacagtgtga gaattgtgga gagagtaagg ccttcagggt tcagctgatg
33241 ctgggtgtgt tctccatagc tgtatctct ttggtaagtt actgaccatc tctacgctt
33301 ggtttcttca tctgtttaat gggaaatgata ctaactact cataggctgt cgtgagaatt
33361 aaacagaagc atacatagaa agtcctctggc tcaagtctta gcatggcagg ggcttaaaag
33421 aatgcattcc tctcactctt cgtttcctt ctcagagttt atttcctact acatcagccc
33481 tgttgtgttt cttaacgacac accgaaggta caagtgttt cttgctaaca catatgctgt
33541 gtttttttag tgtgtggctt tctcttttgg tctgcaagaa tcttcaaaag ggtgaaaaaa
33601 aactctccaa gttatctgaa aaccatatac gctgacacct ttacttaatt tcaattggct
33661 ttttcaactc gtgttttggg cacagggcgg ttttatccat taggggttgt aggcaatatg
33721 cccagtgctt ataagaatgt ttgggagctg aataaaagat cttttgactc caaaatatga
33781 aacacaaaaa ctgcaaaaaa gaatttaata aacatttagg tcaatgtcta ggaaccata
33841 tcatgtctgc cccatttaatt gttttattta gggcttataa ctatctcctc atattagaaa
33901 acagtatgta gtttatattt ttctcacttt gcaaaagattt ctaaaatgca atcaggttg
33961 ccaagaacc caggcaatc ctaaaataaa taagttaact atagtcgaat aattgaaaa
34021 actgaattat aaaggaagaa aaaaagtttt caatttttaa cagcaaaaaa tctacttaat
34081 atgggattat ggtttgggtt aaatgaaatc tacaatggtt caaaacaaaa agcctaaaaa
34141 gatctaaaaa agtctcattt ctctgcttca aagatcagtg aaattgtctac ctgagttcat
34201 ccatttcaca gttgatctgc atgggaaatt atatgtgctt ctctgatttt tctttgggat
34261 tctcgttttt ctggaactat ttgtgtacc tttttctgaa gatcagtttg
34321 gggctaaatt acaagctcca tcagcacagg ggcctaggct gcctcctgac tgcgtaggc
34381 ttagcacttg tagagcactc agcccacaga tagcagccca gtgaaccaat gaacaggtgg
34441 aagcaagaat caaagtgtta aatgagagtt aacctttaat taactgaaaag gtggttctga
34501 tcttatcaca catccaccct cacacgctgc tgctogaatc coatggttca gctcattacc
34561 atctggtatg agaggtgtca gattatatac agtcatttcc ctctgtaag gaacctccag
34621 aatgtcactg cctgtctctt gtaagggtaa ctattcattt acaatcaatg agcacttga
34681 tgcaaaagcat gagtgtatga aagaagggct tatctgagag ttttaacttct gtgcattttg
34741 cccaatttag acaagattag ttaactcctc tgtggtcacc taaggaggaa aactaggctt
34801 tttttttttt tttttgagt agggctctgc tctgtcacc atgctgaagt gcggtgggtg
34861 catctcgctt cactgcaact tctggctcct gggttcaagg gattctcatt cctcagcctg
34921 cccagtagct gggactatag gcatgcgcta ccaagcctgg ctaatttttg tggtttagt
34981 agagacgggg ttttgccatg ttggccaggc tggctctgaa ctctggcct caggtgatat
35041 gcccgcttca gtttccaaa gtgctgggat aataggcatg agccactgag cctggcctaa
35101 ctttttctac tgaggggag aactccttct gcatatgta tgattttact agaagcctt
35161 tccctctctat ttccctgtg aactcctatc cattctttaa accccactcc aaggttctc
35221 cccctcatga agcttctct ctgcaaccca gcagtttctc ccttccctat ggtcccagaa
35281 tgtgtgtgat attccattga tctcaagggc ttcttaaaaa tggaaatggtc tgccattgca
35341 atgtgtgtga tggctctggac tggggttaagt attgctttga ggtggcactt ggaaaaactga
35401 agtaaatattc agatttacca agatcctatg acatcactt taaggaccat tttctacctt
35461 ccaaaatggg tcacggccaa atgttggcag gaaatgattc aaaggtttta gccaggtctt
35521 ccaggcccat tctgaaag taatgtaaga aacagaaata gattagctac aatgtttgta
35581 ccttcttaga cactgagtca tcacaaatta cacacataca cgtacataca catacacata
35641 cacacacaca gacaccata agctgttggc taaggaacaa ggaactcctt tattggaatt
35701 tgaggcattg tgcaatctg ttgccagag cgacactcag atactagcca actaagtgct
35761 atattatagc agcatgact gtctaacaac aagcaaaaaa taggtttaga ggaatgaaa
35821 gcttccagaa aagttaaat ctgacttca ctoacttct cctggtcctt gcctatacac
35881 acacaaaaa cgtacacacc caaaaaatc tctagggca gagggtactt cgggttctc
35941 atttataaat caataaagta caactatgtt ccagaattgt acatctctac ataaagataa
36001 tcttaagtga tatgaattgt ttgctctgat acatgggttt tggggctatg cagagaactg
36061 tacttgccat ctaaaatgtc accctgaag tttcaagata cattttaata ttacacaaaa
36121 ctggaggtca ttcagctctt gaagggcagg actttatgag ctcaacttga aatgagaag
36181 ttaacttttc tcagacaagt caccagagcc aaagcaatga gcaaaactca acaccctcc

Annexes

36241 ttaaaaaatta acaaaaggtcc tttttgtttg gccagtgcca aagccttcaa actcagttgc
 36301 acttcgttct aaattttata gataatgcat atttotaaga gtgcattagt aaacttctat
 36361 aaacccacac caaagcaaac agaggttaac cctccttttt caatgatttc atgctaaatg
 36421 actgtgctta tcagagttaa gaggtaagag actgctttaa tatgatgtct ggctaagttag
 36481 gagaacactg tgagagagag aaaaacagaat aaattttatt atttaatttc atgataaaca
 36541 atattcgttg aacacatctt tttttttatt tttgagatgg agtttctactc ttgtgtcca
 36601 ggctggaatg caatggcgca atcctggctc actgcaacct ccgcctccca ggttcaagcg
 36661 attcctctgt ctccgcctcc caagtagctg ggattacagg tgcccaccac cttgcccgcg
 36721 taatttttgg attttttagt gagacggggg ttcacatata tggtcaggct ggtctcaaac
 36781 tcctgatctc aggtgatctg cccacctcgg cctcccaaaag tgctgggatt acagacatga
 36841 gccatcaocg ccggcctggg tgtacaaaac tttaaaaaaa gacttgcttg actacattgt
 36901 gcaaaatgca gaactagaaa ctgtcagcaa tcaaaagcac ttcattctaa ctagctgtgc
 36961 cttaaacggt gtcaagataa ctctagaga gatgtgctgc tcctgtttaa agtgtgtcag
 37021 tgccactcac ataggacaat gtgtgttccct caaaagtcgg atgtaggctg ggcgcagtgg
 37081 cgcatgctg taattccagc actttggaag gccgaagtgg gtagatcacc tgaggctcagg
 37141 agtttgaac cagtctgact gataccatga aacccctct ccactaaata caaaaaatt
 37201 agccaggctg ggtggtgcat gctgtttaat ccgagtact tcggaggctg agacaggaga
 37261 atcgcttcta cctggggagg agaggttgca gtgagctgag atcacgcat tgcaactccag
 37321 cctgggcaac aagagcaaaa ctctgtctca aaaaaaaaaa aaagtaggat gtaactccag
 37381 taacatttga agagtccaaa ggagtcctct ctttaaaggg atctacagt atatcagttt
 37441 tttgaagcaa agaagccttt agcaatgcca caatgcctc tgatttattt gattaatttt
 37501 tgtaataact ggttttctta aagcatggca cacttaaac agttattttt tggaaatgtt
 37561 tttgttttca aagtcactac caattgaaatg tgcagccttc actggtgtca ttacccatg
 37621 cttccgtctc attttgcaag atagtgttag aactaaagt ggggtgacc caaggcctc
 37681 tgagccttgg ctccatgta gggatccat agaggtaacta ccacctgatc ctctccacag
 37741 cctcgtgagg tgcaacctac agcattttgct gttcagagga ggaactgag gctctgagaag
 37801 gaaattcact tgctgaagtt aacttgctgc ctccagttag aggcaggatt gatattgag
 37861 cccactctg tctgactcca atgctaata tttttacatc ccggctgaag gatgatattg
 37921 ccaagccttt aaagaagaag gcatatttgg acacctcatt agcaatttgg gcgtaaatc
 37981 ataccctggt ggccaggaag aattaaagt gctgccagg gctcccact caggccagg
 38041 gagtgcctc aatactgagg gaatctgaat taaggagctt ggaagtccc cccacctagc
 38101 tgtagtggc aagttcagag agttcagag tgggctgatc caggagctc gaccaggtca
 38161 gtctagactc cagtaccact gagaatgttg ctatgttggc tttctctgct acacagaaa
 38221 gctttttct tccttttctt tcttttctt ctttctttt ttttttttt tttgagacg
 38281 actcctcctc tttgtaccag gctggagtgc agtggcaca tetcggctca tctcggctca
 38341 cgctcctcgg gttcaagtga ttctcctgcc tttagcctcc gagtagctgg gactatgggt
 38401 ggcactacc atgcctgggt aatttttgta ttttttagtag agacaaagt tcaactcgtt
 38461 ggcaaggctg gtctcaaac cctgacctcg tgatctgccc acctcggcct cccaagtgc
 38521 tgggattata ggcgtgagcc accacgcctg gcctaagact gcttttccaa atgacttcaa
 38581 attccttcaa atgggtaact tcatttaacc aggtgggggc acctcccaa acacaagtta
 38641 cccagctttc aagttgtggc tctcatataa ggaagtaact tcttttgaga gtaattactt
 38701 gtgaaattat aaaaagtatg aatttctgga aatgtctaa catgtattgc tagcgtaggc
 38761 cgcagggcat tgagaacgt ataccgctgc actgctggcc cagctaacca aggtctcct
 38821 tcaacttctt gtcattaata gctgagtaa ctaactccac tttagtccc tcaactgtga
 38881 aatggcaagt gatgctagat tatctctaat gatctttgct aaaattttat atccttatct
 38941 gattctcaag cattgattat aaatttcaac ttgacctta agtttttga aatcttctc
 39001 actcttctct taggatccag cccaccatcc catccagaac cacagtgccc tttggaagac
 39061 agagctatgc caaaagacag caggagcagg cagggacaca aggaggcagg gactggagtg
 39121 tgctgagaca gtgagaatca gtgtttgaca gactggggtc ctgtacccaa aaaaacttc
 39181 agagttcccc attaaaggag actctcatcc ctgttttggc accaaagagt aagaagcac
 39241 ttcactctgg aactcattgt tttctgccca ttttccctta tgtaactctc ttggattttg
 39301 cacagctttt aggcctgttg tctctggaca cgacaaccac ctccagagct ggcaccgagt
 39361 tctgccttgg gagtgtttg ccccatcagc cactgcatcc cttctccaa ctaaacctga
 39421 gcgttctcct ctttaggaag aatgataacc aatcggcatt tgggtcccaa aattctcatc
 39481 tctcacctcc tctcacagt ccttctccc ttagggcagt actgtggcct ctctctaaa
 39541 tccatttccc aatctagatg tagcgtcag agtctctgtt aattttattt gacatcaaaa
 39601 gagccacaat acttgtgctt ttttatagtt ttctttcaaa gaacatttca gtccatgaga
 39661 cagaaaaaaa atggctttgc tgtatccaac ttgtcacagg cttgtatttg gcaattgtct
 39721 gagaaagacc tcaaccactc gtgaaacca gacgtcattt cccgtctgtt tcttcatgt
 39781 taaatgcttc tagctgctcg ctgggtgctg gtcactctat aactaaatat tgctttagca
 39841 ctggctacac aaagagcttc ctgaaagcag caggggggag atgtcagggg cttaaacaata
 39901 ggggcactgt ttccattgag cgggtttgct gcccaacgct ggttcaaatg aaagtaccc
 39961 aggagcacca ctgctccact tctgagcttc cactgtgac ttttctcctc ctggggaag
 40021 aagctggctg tgatttagat gtggctagca aaaggtttag tctggcata aatcaggca
 40081 tcagaacgac tttgaaagaa agtaattcac cttcaaaaat acatggggaa aaaacttcat
 40141 gagcaccaga gaagcatttg gaagagttaa ccttgacat ggcttacgag ggtgtattt
 40201 taaggccaga ctacagttttc attatattgt tgctatgcaa gtaaaataat gagctcactg
 40261 ctacaccocaa gctgggcaga atgaatttac agagaattaa taaatccagg gtaggcaaca
 40321 tgtgcttttt ctctcgttca tagagaagca actagtactc ttggatttta agcaggcaaa
 40381 cctctgtagc tttacagttt ctgaaaaatt gatcccagtt ctaattgggca ggcagtgata
 40441 atggtaatgt ttcttttctt aaggttttct ttaaagggaa gggatcaaat agttcattta
 40501 agacaaagag gttattataa agtctaataa atactgtggt agctctgtta atgttttca
 40561 agggcattta agtgaagaa gccctttcca acagggcagtt ttggaaagct aaacactctt
 40621 gtttaattcat gaaacgcaaa gagagataat ataaataaat caggggctgg ggaggaatta
 40681 gagatagaca ggaagcagtc aaattttact tcccacatat gccaaagaaa gtgcaaatag
 40741 atggctgtta cttagtaaaa cctactttta aattcaagaga atcgtaggta ctatgaatg
 40801 tgaggttata aatctgtaat cattacagca cggggacact ttttaacttc tcatcaatta
 40861 cccattgtta tttcctgagc acatcctggg ttacctagct cctgactagg cattagggaa
 40921 ggacacaaga cttagtaaaa acacattagt actctactaa attcaggggt aaactccact
 40981 ggtcaataat caagtcacta tctctatatt ggaggcaag gattgcacaa ttcaggctat
 41041 ttgtaattgt gctttggatt gtagagactt agactcagag gaatcacggg acatagaatc
 41101 tagaacaggt ctgtgtccca tcattctctt aaaagaaaac ctttcaagta atatttctta

Annexes

41161 ttatctttht aaatcttggt aaaatgacaa aatatatata tatttgtaat ttttaaaatt
41221 ttgatgcata caaagataga catagataga tagataatgt agaagtataa ataataataa
41281 gtcactagag catgactaac tagtgaagtt acccagctct cctccatcc catctctctg
41341 tctcccatac actctaccca actcttcctt tcaaaagata ggattttctt gcttcgthtt
41401 tttactgact tgttcttact tagggttgct ggaagcacat ggaaggaggg aagtgtcaa
41461 aacaagacat tgttgtaggg ggagagatga gaagtcatga taagtaggtg ggtgggtgac
41521 ccacagggct ggcatcagaa ggaacatag caaaacatga tggatatgag gcttctctg
41581 gggaggggga ttggcctttg tgagtggcag ccgtctgctc ccttcccgct tcccttagtg
41641 ctccattgag cttagcagcat gcagctgaga agttgaagtt ctgaccacat ggcctctgct
41701 gccgctgctc tgcccatacc caggcaccta gccagctctg cattaaggag gtgaagtggg
41761 tgcccraagga aagaagtgcc cccaaggaga cttgctgaga ccttgaacaa gtgacacaa
41821 gtgagcagaa cttgtcttga cagaaaatgc tttgtctcta ggtgttccag agagatgggc
41881 aagtgtccta tttcttagtg agagcctcta acaaacaccag cttgtgaacc tccactgaaa
41941 agatctcact tgatgagcat ttaataaag tgtcctgagt ttggaggctt gccgtcttc
42001 tcttgataa atactctcat ctctagact tggaaaaaca cattttctcc tggggttcc
42061 cattggcgtg tcttgagctg ctctggtgat aaccgtaata atgccaatac tgatacgaac
42121 agcagaaaa acgaaactac agatgatcat caaggaccac tgtctcttac
42181 catttgctgc tttggtttga aattctcact gcctcgtaga tctcattttg agcactatac
42241 attcctaaag attgatttct tctatctga cttaaattta ggaatgatta aatcttctt
42301 tctcccatac tttgatccta aaacattttg aaaggaaaca gccttgagat ctgtgattac
42361 taagacatac ataacattct tatcacatta gaaagcaaga attgactggt gcttgtcttg
42421 ttcctgttgt cttgtcccct gaattcctgt ttatcttga ttgtatgtgg gacattgtat
42481 tttcagtaac tttgtagaaa taatgtgaag cctataaaga tgttctctgc ctccagagag
42541 aattttgttt cctctgccca gcctcatagg caagcataca tctgatcca tctttagagc
42601 tgttctggca accctgatgt cttcagcctg tgcaagggtg ggtttacttc cagttaatcc
42661 ttatttttga tacagcctt agggttccaa cccaaagtcc ggggtggttt ggggtccctg
42721 ccttggtgag ccctatagtc caatgttccc ccttacccaa agaagctgta gaaaaccag
42781 cacagcctcc caggcaccag tttcagatca gcaaaaaata gcaaatgcc ccaggcttga
42841 aaagcaatct cacctctatt aactcttctc ccaaagtttg acctagtaat tcttattat
42901 ccttgaactc ttgacactat taagaagatc tttcggctg ggcgcagtg ctccgcctg
42961 taatcccagc acttctggag gccgagcgg gccgatcacg aggtcaggag atcgagatcg
43021 tctcgctaaa cacgtaaaa ccccgctctc actaaaaata caaaaaatta gctgggacg
43081 gtggcggggc cagtggggcg gtgcctgtag tcccagctac tgggaaggct gaggcaggag
43141 aatggcgtga actcaggagg cggagcttgc ggtgagccga gatctacca ctgcaactca
43201 gccctggcga cagagtaaga ctctgtctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
43261 aaaaaaaaaa gatcttctct agcttttctt cattttttta agttgtcttc agcaagatgg
43321 ttaattctca ttacctagtc catgatttct ggaagtcaa gtcaaaagggt aaaaatctata
43381 tagcctaggt gacaattaca ataacaataa caatagctaa ggcttattat ggcttattg
43441 caggtacttt atgcacttga tctcatttaa tactaatata gcctatgagg gaagtataat
43501 ttccatttth cctatgagaa aacaggctta gaatggaac tttgttctca tagcttgtga
43561 gttgtagaag cgggattttag atcccagctc gcctgagctc agcttctggt tgtcaattac
43621 ttccctcttc agacctaatt cttccaataa gcaacagaaa aagaccagat ggggccatgg
43681 cctctggcac acagcttctc ataaacgagc ctatcacaca tccccagaa taagcaatc
43741 gtagtctctc tctgagtgtg aggtaaaaag cagggtttgt tttggtttcc cttttccaaa
43801 acactcccc acatgtttct ggcttgggt taagaagaac ccaggtgttc atgtcacata
43861 cgagctcaac tggggaaaag gaaaccatcc agcagcctc cttgctgccc aatagtggt
43921 tcaccacaact tgggggtgcat tttctacag tttctgattt ctcaacttca cctaacttc
43981 ccttgccctc ttggatccct ctctgcccac acactaccat gcatggctga tagggcactg
44041 ttctgcccc tatcccattg gttctactta acccagagct ggttactctg gaaaccaagc
44101 ttattctgta gtcagcagacc tcacgccatc ttgcttaata gccttcagtt tctcttagt
44161 tgattaatgt atcaactcaat agattatgca agactactc tgcaggcac tgaactaggc
44221 cctgtggttt atattttaa gaagaggaa tgatctctga cttttaaattg ctggaagaag
44281 agatgagatg catcaagacc aagtataaag aagtataaag tctgtcaga gatgtgtgga
44341 tcaactggctc agggagttcc aaggatagag acatattatc tgtttgggaa gggcttggg
44401 ggggaaaggg attcagccgg gccttgaaaa tcaattaaag tttgaatatg aggaaagaa
44461 gaagagcacc tcagacaagg acatggcatg gatgaaggca cagaggtatg ggcgtgcagg
44521 gcactctgtg aaatggacag ctccagttctc gccgaggagg ggaattgggtg cagagcctg
44581 gggccctgcc ttcagaagat tccaagagg aaggagggca aaaaacaca gatgaaggca
44641 aagactggca gcccgaggc caaagacgg tttagtttg ccaagacact gttttaaaa
44701 ttttaagcaa ttttgaaac caggtttcac ataaaaatcc aaatttctg cttctgaaa
44761 cgtgaaagat ttggcaaac agggcgcaat gttctccctc tttcgtaga aggattctg
44821 tctcccggc accaaagcct ggcttgttcc tccctacac cctgcttget cggccctga
44881 gcactctgag ataggaccct tgcctctgta tgggtaccag ctccagggaac acagatgag
44941 aaacatcaga aagatccca agggcctctc atccaacttg ctgactgtca tcatgctggt
45001 tctcagacct ccctatctct ctctgctatc caaacacaga ccctcctctt taaaatttca
45061 gcatacatgg ctttcaaat tatgagcat gaaagtgtca aagcatctc cagaaactca
45121 tggcggcagg atctgagact caaaacagtg tggatcaaac accatcaag tgtgggtgg
45181 ggcaattcga gtttgtttcc ttgtttttat gtaagcagat taattagaga actaacataa
45241 cgccagctct tgggcttttg atcctatctt gccaggacc agacttggag atgtatataa
45301 tggattcttc cttttctaaa tggaaagatc tgccctctc gcttctatag ctctctcaa
45361 agtctctgtc ttggaccctc ccgttagtta ctgagaatgg tataactaca tctgagaaag
45421 gttggattcc tcttagggac agaaaatcca catatgaaa gtgcaaatcc tgtccgggt
45481 aatcacgaaa gcagttgag tagcattgga tcatagagcc ccaggagacc tcaaatca
45541 gcccccttcc tggcaaacct aatgaattaa gaggtcagtt tggtaattcc aaaggctaag
45601 cctttgtaac tataataaaa tgcacagaat gaaaggaatg tagaaaaaaa aaaaagcaaa
45661 cagaggggga aaggaatga aaaaactgac ttgatttcat tgagaaaatt agtttaaaa
45721 tgtcctttgt gtagcaattc ctttaatgcc tcaccgaaca aatgcctagg agaattcttc
45781 caaacttgag gtccccttaa ccagacctg gtgtgcgtct tcagctgaaa ttcagcagtt
45841 ctgggaggtg gaatgaggag agatcgttgg aaggtttttg tgaacttatg tcaacgagca
45901 agaaaaagcc ttaatgaacc acaaaactgg agactttgta aggtacagct cagtcagcac
45961 ttttctccg aggagaggac acacaattgg catgaaagtg acccaagcaa caggtcaggg
46021 cagagaatgt ccaaaagtag aagacttcca gctccctgat cttccacacg tcaaatgagc

Annexes

46081 gattgctgca ctggacttgg catttaaatg ggaccagcat tttgcatcct ggtcccattt
46141 aaatgccatt tgtggaccaa cgtgaattag atggaatgt caggaaggct ggaatcgggtg
46201 gtggcggggc ggggggtgctg tattcgggtt gcgtttcccc cctgtgggtt tccatcctg
46261 tttctttgaa tgcataaaca aggaaaatga ctggtttgga atgcagagtt ttaaaaaacc
46321 agaagaccac aggcacocctc taaatgagaa agagagagca agttgggggt ctgtgacatt
46381 tgtcaggaag tgaatgtta aataccggga agcattagcg ctttctgcca ggggaagatcc
46441 acaaaggcaa ggaacaactt tagcggtaga cctgcctccc ttttctgagg tctgtctatg
46501 tgttttatatg tcacctagtg ctattttcag acaccaacgc caccactctc agotcccaat
46561 ccccttctgg gttttttgtt tgtttgtttg ttttgttttg ttttgagaca gagtctctct
46621 ctgtcaacca ggctggagtg cagtggaaag atcttggctc actgcaagct cctcctccca
46681 ggttcacgcc attctcctgc ctcagcctcc caagtagctg ggactacagg cgcccaccac
46741 cacacctggc taatttttgt tatttttagt agagatgggg tttcactgtg ttagccagga
46801 tggctctgat ctctgacct cgtgatccgc gatccttgcc ctcccaaaagc gctgggatta
46861 caagcgtgag ccaccacgcc cagcctgttt gtttgattgt tttttgtttt tttgagacgg
46921 agtttctact tttttgcta ggctggagtg cagtggcaag atctcagccc actgcaacct
46981 ccgctctcgc aattcaagtg attctcctgc ctcagcctcc cgagtagctg ggattacagg
47041 cacatgtcac cacaccggc taattttata tttttagtaa agacggagtt tccatagt
47101 ggccaggctg gtctccaact cctgacctta ggtgattctc ccgcttggc ctcccaaaag
47161 gctgggatta caggcatgag ccaactgcgc cgacatgccc gcttctgttt ttaaacgaa
47221 agatgaacag ttaagctgga cttagccttg gtttccatt agcattattg ctaagttggc
47281 aacctgggat aaaaatccact cttggaaact ttaagctga acaaaagctg cactatgagc
47341 aggtgctatg ataaagccaa gacagcgtc taagttaggg ggtgatgaa atagactaag
47401 gggagatctt catttctctc cttggacaata gcgagtaaaa aaaaaaaacc aatcatataa
47461 gggcatttag aacacattgt gttttcttt agcaaagggc atcctgcttt gaaaaggaag
47521 gtttctatg cacatcacag tggccattct ataaagtggt tccgtatgct ccatgccaac
47581 agacctcaaa gcaataggtt ccttttttaa acccaagaca gttggagagc tttgagaaa
47641 ttttgatgac aactaatct cttttacttc gttgcaagaa acaatcagtt gtagcacta
47701 gggattaaaa gccaaattga actcaggcat tttgagagcg cctggggaga aggcattggt
47761 acttttggct gattttccacc ctttccagca taagttaggg gttggagcatt tttcacatag
47821 tctgttaggc agcctgacgc cagagttttc acttcagaga aaggataaaa gttgacgggt
47881 tcttagggaa caaccaactc ttcctcattt gcaatgtctg ttcctcctca agatgtctg
47941 ggcacagctt gaggatggca ctcaatgact caaagggtgg gggtttagga gaaacaagac
48001 cctgggcatg tagaagocct tggacgatta catatattc aaaaatgatt aagttcaaat
48061 aattttttgc tgggtgcttag cacaccaatg aagtatgtag atatgaaaac agggagctgc
48121 taggtaagat tcattttat ggcactggtt ccagatgcca gcatcgtgat gaacgctatt
48181 tgactctcga tatcccttga cgtaggtact gttgggagtg ttttcttccc tggggaaat
48241 gggaaaatga ttagagacca gaggtcagga gacctgaatt ctgttctctg tgccctccctg
48301 actcagatg tttttgttt gatcagttag aatgaaaact ccagaggtt tctaaggaca
48361 gcacagtttg agcattggct tttgaaaagt actctggtga cctgtggaat tacagttata
48421 atcatcataa taatgtccaa tgaagaggca tactgaggaa ggcagtagag gaattttaag
48481 tggctcaact ctatttgcatt tattcatttt acaaatggtt tcagagcctt aaagcaaat
48541 tcagtatgag gtaactttaga tgcaaaatgc tctcttagga ctttcaatag ttacacacaa
48601 gtatccctta aagtatattt cagaaatag cttgacgtgc atcaactcta tctgatgaac
48661 tttgagatga tcacaattaa ggggtataga gatattttag ggaatttttt tctcaattgg
48721 atccaagagg gattttaaag tttactaac tgggccaagat gcaagtgctc acacctgtaa
48781 tccctgcact tttgggggct gaggtgggtg gatcacctga ggtcaggagt ttgagaccag
48841 ccaacatctg gaaacctctg ctctactaaa aatacaaaaa attagctggc catggtggcg
48901 tgcacctgta atctcaacta ctcaggaggc tgaggcagga aatcacttg aaccgggag
48961 gcagaggttg ctgtaagctg agattgtgcc actgtactcc agcctgggga gcaagacaa
49021 aactccattt caaaaaaaa aaaaaaagt tactaacgtg gttgtcactt gtctcctcc
49081 tgttatgtct tctttctttg gtttctttct atctttttat gaggagaggt tggaggatga
49141 gtgcttagtt aggaggcaag gagattcaag gactcaggct tggaaattta cacctctgtg
49201 ccttctctcc cacaggtgat aacccccgtg aggcacaggcc atggctacgt atacagatc
49261 ccatccagat acccaaaagg cgtctatgat atccctcctt ctcaaccac tcaagggggtg
49321 cgtaccagaa catggtcaca agaggagaag cgtctctaag ggtagcattc cttcagggtc
49381 gttagagaaa gggagttcac aaattatgca ttaatatatg tcaatagaag ctttttttag
49441 gttgtctacc cagtagccac tttagccaat gctattttaa ttagttttc tggatttctg
49501 ttatcagaaa atctagtat ttcaccaag agagottatg tttcttaca attttctct
49561 agaaagttag ttttttttt ttttttttt tttttttaag acagaaatct actttgttgc
49621 ccaggctgga gtgcagtgcc tctatctcag ctcactgcaa cctccacctc ccaggctcaa
49681 gcaactctcc tgcccctgcc tcagcttccc aagttagctg gactacaggc acacacacca
49741 ccatacctga ctaatttttg tatttttagt ggacaggctt tttccatggt ggcaggctg
49801 gttttgaact cctaactgca agtggctgct ccacctcgcc cttccaaagt gctgggatta
49861 caggtgtgag ccacggcccc cagctgaaaa gttagaaaat taaactacac tttaaagtac
49921 agacagcgtg gatatttcac ataagattct ttttttttt ttttttttt tttttgagac
49981 agagtcttgt tctgtcacca ggctgggagt gcagtgacc gatctcagct cactgcaacc
50041 tctgcctccc gggttcagcc gattctcctg tctcagcctc ccaagtagct gggactacag
50101 gtgtgcacca ccacaccag ctaatttttg tatttttagt agagatgggg ttttaccatg
50161 tttggccagga tggctctgat ttcttgacct tgtgatctgc ccacctcagc ctccaaaagt
50221 gctgggatta caggcgtgag ccaccgtgcc tggccaaaat catttttata ttaaatgtaa
50281 gttaaaaacc ataaaatgta ttaaaaaaaa aggcataaaa tctgttataa catggagcac
50341 tgccaaagat caagcttcta cataacctgg taaataaatc cataatgaag tgcctaggag
50401 cataaaaaat gaccaagtat aagacatttc cattctgggt aactcacggg tttctctca
50461 ggtatacagc atccctccct catcagcaaa aggcctgtg ttttcagttc cagtgggaga
50521 gataaaaacct caaggggtgt atgacatccc gcctacaaaa ggggtgagtg agtgactaca
50581 aagcagcaaa aaggagtggt tgtgtgtgtc tgtgtgtcgg ggggtgcagg gttggaggg
50641 tgggtaagta gttcactcga ataaaaaac aaaggcaaac ccaaaagggg aaaaatgagt
50701 cttggtgaga gtaaaaggaag gaagcaaaaa aggaaaggca ctaattaaag atagctctag
50761 ggaatttcata ttgagaagcc ccaactaaaa aacactaggt ggccaaatag gataaccctt
50821 tggcagggaa gataattagt tcagtttggc aagtactaat atatatgtt agagggtttg
50881 ttttgttttg ttacattttg tttgagacag ggtctcctc tgtcaccagc gctggagtc
50941 agtggcgcaa ccacagctca ttgcagctt tacttcccag gctcaagcaa tctctccacc

Annexes

51001 tcaggctccc aagtagctgg gaccacaggt gcacgccacc atgactggat aaattttatt
51061 ttttgtagag acggtgtctc cctatgttgc ccaggctgtt ttgaaacata tgggcttaaa
51121 tgatcctact accttggcct cccaaagtgc tgagattaca ggttgagccg cgcctggcct
51181 gtagagggtt tgacagtttc ctcaagtgtg atgtttgagt gaactcgttt gactcactct
51241 gttaccctat ggggtatgcc tgcacaggag gcacagtaat cctacttta cagacaaggg
51301 gactgtgttt cagacgccta tgcagctcat tcagcatcac acagctggty tgataacca
51361 aaagaccggg ggagaactct ggtcttactc tgcctctcgg cacagatcag cagagaaaag
51421 ataccagga ggtggtcaga aacacaggac tggaaaacaca ggttgagcaa tttagccagg
51481 agggttgtac atacgagtct gcaccaagaa cgtggggttg gacacacttg gcaaaggaca
51541 agggaaagtga cagcagaata acggggaacc ttggaagtgc ctaacattgg ggcgggggag
51601 ggcgaccgaa aaagtgccag caaataggac tgagccatg ggaccacagg ttccatgag
51661 ccaactcaat aaatagcatt tcgctttcta cttgctttgc aggtatatgc cattccgccc
51721 tctgcttgcc gggatgaagc agggcttagg gaaaaagact atgacttccc cctcccatg
51781 agacaagctg gaagccgga cctcagaccg gagggggttt atgacattcc tccaactgc
51841 accaagccag cagggaaagga cttcatgta aaatacaact gtgacattcc aggagctgca
51901 gaaccggtgg ctggaaggca ccagagcctg tccccgaatc accaccccc gcaactcgga
51961 gatcagctgg gctctcagaa cgacgcata gatgtcccc gaggcgttca gtttcttgag
52021 ccaccagcag aaaccagtga gaaagcaaac ccccaggaaa gggatggtgt ttatgatgtc
52081 cctctgata accccgcaga tgctaaaggc tctcgggact tggatgagtg gatcaaccga
52141 ttgtctttct cactacacag cagcaccggg agtaacatgt ccacgtcttc caactctcc
52201 aaggagtctc cactgtcagc ctccccagct caggacaaaa ggctcttctt ggatccagac
52261 acagctattg agagacttca gcggctccag caggcccttg agatgggtgt ctccagccta
52321 atggcactgg tcaactaccg actggcggtgt tacggatata tggaaagaca catcaatgaa
52381 ataccgacag cagtggacaa ggtggagctg ttctgaaagg agtacctcca ctttgtcaag
52441 ggagctggtt caaatgctgc ctgcctcccg gaactcatcc tccacaacaa gatgaagcgg
52501 gagctgcaac agtttgaaga ctcccaccag atcctgagtc aaaccagcca tgacttaaat
52561 gagtgcagct ggtccctgaa tatctggcc atcaacaagc cccagaacaa gtgtgacgat
52621 ctggaccggt ttgtgatggt ggcaagacg gtgcccgatg acgccaagca gctcaccaca
52681 accatcaaca ccaacgcaga ggccctcttc agaccggcc ctggcagctt gcatctgaa
52741 aatgggcccg agagcatcat gaactcaacg gagtaccac acgggtggctc ccagggacag
52801 ctgctgcatc ctggtgacca caaggcccag gccacaacaa aggcactgctc cccaggcctg
52861 agcaaggagc agcccctga ctgtagcagc agtgatggtt ctgagaggag ctggatggat
52921 gactacgatt acgtccactc acaggtaaaa cagcggaaact cataaaacac ctacactcac
52981 tcacatgcag ggagcctgag aaagatgctt ataaggatgt cgggttgagc tgccaaagga
53041 gagaacataa ttaattgtaa tctacatggt tcacaaattg gagggagtggt cgtagagtag
53101 taagaacgct gggctgagag tctgtgagac tcaactcagat ctagcccttt ctctgacgtt
53161 tactgtgtga ccaacttatt caacctcctt gggccttaat ttctctattt gcaaaatgaa
53221 tggggtaagg ggttgatta gatcccgttg atatacctca ggttaagagga gactcaccaa
53281 gtaggataat aggccctcta ataataatc cagctccact tctatttgtg ttttatgtat
53341 agttccatgc aatattttat ttgaaaaaaa agttttctgc attaagaaaa agaatagaag
53401 acctttgcac cagagaattt ctaaggcccc tgctagccct actctgtgta tgtgtgtgta
53461 taattgcttt aaaaacttagc cccatctcag acttacctag aggaccactg ggcattagct
53521 agctgtccta ggagcttaat ctgtgtatgg gacattggat agtcacagtt ggcctcctac
53581 aattgggaat tctaccaagc tccaagttga cctgggattc cgacagcttt ccttccact
53641 ttgagggtt aaaaacttct actggctggg cgcagtggtt cacgcctgta atcccagcac
53701 tttggggagg tgaagcaggt ggatcacaag gtcaggagtt caagaccagc ctggccaata
53761 tgggtaaac ccatctctac taaaagtacg aaaattagcc aggcattggtg atgcagcct
53821 gtagtcccag ctacttggga ggccgaggca gaagaatcac ttgaaacctg gaggcggagg
53881 ttgcagtgag ctaagatcgt gccactggac tccagcctgg cgcacagagc gagactctgt
53941 ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa tctaccaaga tccattgttt aggactaggc ttactatctt
54001 atctgccat tcttttaatt tgactgagag tcacagatta tactgagaac tacgtaacta
54061 ttatgcaaaa tcccctcaag cgcaagaaag tgtggcaagg agaactgagc cccactgat
54121 gctgaggaag gaagtggaga gagagagat ggaggcattg aacattcatc ttactggttg
54181 tctgaccctg cacagtggga actactgcct tggagcagaa atctatagat gatttgaggg
54241 aactagaagt gagaggtgga ccacatttag acctgcattt gggggtttac aggttcacat
54301 ataactatg agaaaagaac ccagagacta taaaaagaac attatatatg agatttgaag
54361 ggaatcatga gtactctccc gaaaaattta aggtgcccga gaaagctggc accctatatg
54421 gcaatgggct ttattttct gccaccctg tcgtotaggg ttccacagtg tcaactgggc
54481 atttgagat ttgccaaagg agtggaaaat aaagagtatt tactcatccg tcaatgaaat
54541 tgtagcata agtgaatcac agttagtaca taatatgttc tttatgttga aaattaacag
54601 ggttaaggag agtttgagag gcaacagaaa gagctattgg aaaaagagaa tatcatgaa
54661 cagaacaaga tgcagctgga acatcatcag

//

Annexe 3

Les résultats obtenus par dosage de la fluorescence en temps réel ont été analysés par résolution graphique grâce au logiciel GeneAmp® 5700 SDS. Le logiciel calcule pour chaque échantillon une valeur de Ct à partir des courbes logarithmiques (Figure 1).

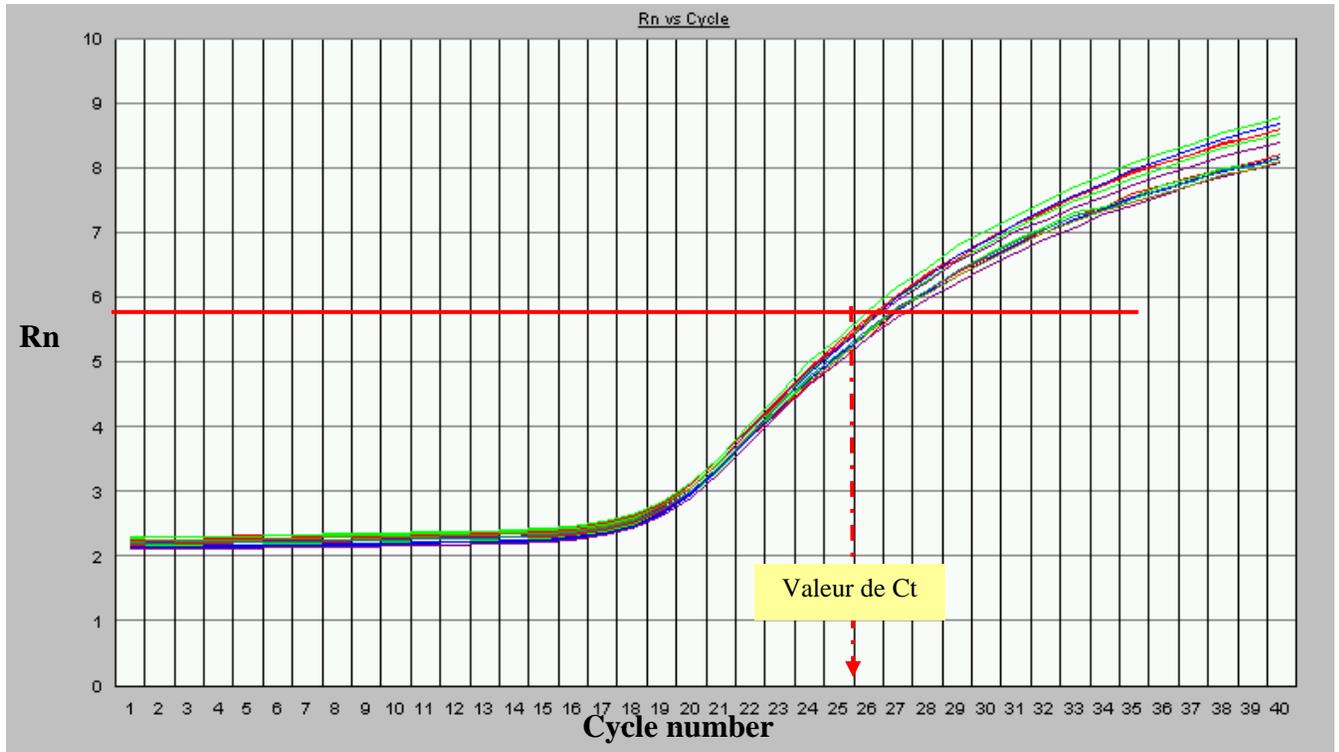


Figure 1: Graphique de l'évolution de la fluorescence au cours des cycles de PCR en valeur logarithmique. Représentation de la ligne de base permettant de déterminer graphiquement la valeur de Ct. Rn correspond au rapport de la quantité de fluorescence / ROX

La réalisation d'une gamme étalon permet d'attribuer une valeur de quantité de matrice à chaque échantillon (Figure). Les données regroupées dans un tableau peuvent être analysées. Pour chaque échantillon la quantité de matrice du gène d'intérêt évalué sera pondérée par la valeur du gène contrôle. On obtient ainsi une quantité relative d'ARN messager du gène cible présent dans chaque cellule.

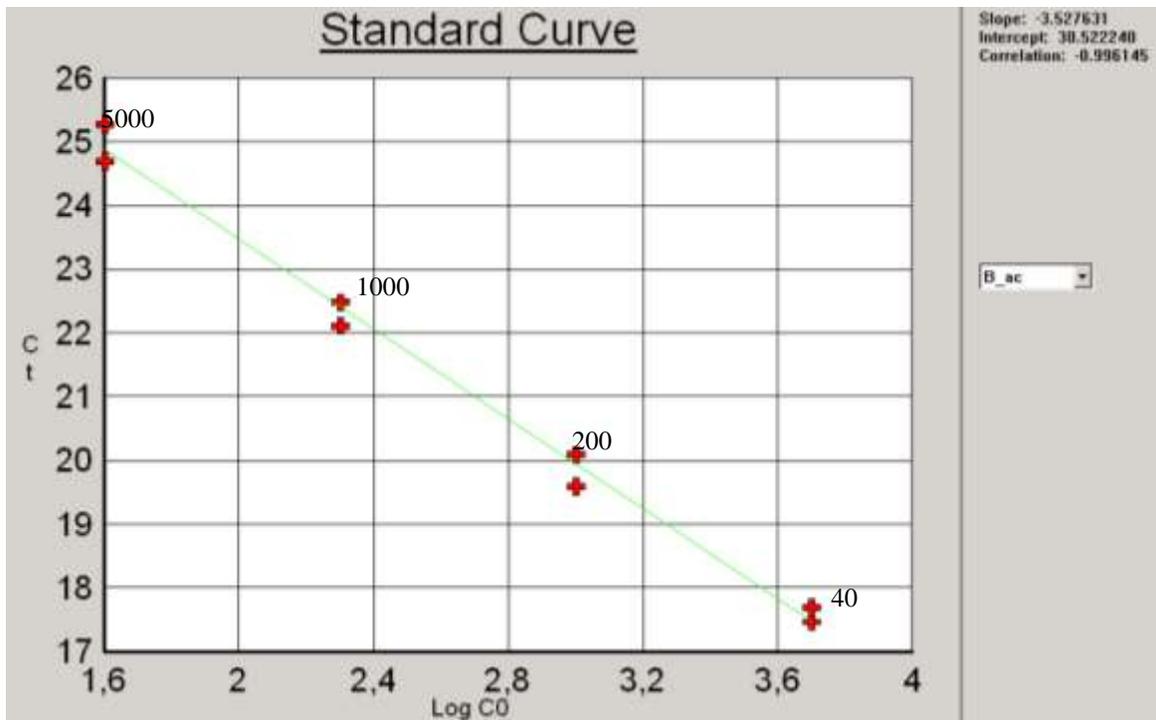


Figure 2 : Graphique de la gamme étalon. Relation entre les valeurs de Ct définies au point d'inflexion du suivi de la quantité de fluorescence au cours des cycles de PCR et des valeurs arbitraires attribuées en fonction de la dilution des ADNc matrices (log CO).

Communications

Communications affichées :

Malleter, M., Moreau, D., Tomasoni, C., Jacquot, C., and Roussakis, C.(2008). Activité d'une nouvelle molécule anti-tumorale, A190, en corrélation avec la surexpression de deux cibles moléculaires, HEF1 et B2, dans le cancer broncho-pulmonaires « non à petites cellules ». 3ème journées du Cancéropôle Grand Ouest et GendeBio Rennes

Malleter, M., Moreau, D., Tomasoni, C., Jacquot, C., and Roussakis, C. (2008). Activité d'une nouvelle molécule anti-tumorale, A190, en corrélation avec la surexpression de deux cibles moléculaires, HEF1 et B2, dans le cancer broncho-pulmonaires non à petites cellules : Caractérisation de l'ARN B2. Forum des Doctorants. Faculté de pharmacie Nantes.

Communications orales :

Malleter, M., Roussakis, C. Une molécule antitumorale, A190, en corrélation avec la surexpression de deux nouvelles cibles moléculaires, HEF1 et B2, dans le cancer broncho-pulmonaires « non à petites cellules ». Journée scientifique de la faculté de pharmacie de Nantes. (2008).

Publications

Arnal, I., Malleter, M., and Chrétien, D. 2007. Visualization of dynamic microtubules. In "Handbook of Cryopreparation Methods for Electron Microscopy", Cavalier A., Spehner D., and Humbel B. M. editors.

Malleter M, Jacquot C, Moreau D, Tomasoni C, Tsvetanova M, Chinou I, Juge M, Pineau A, Le Pape P and Roussakis C: A novel large regulator RNA, B2, partially overlaps the HEF1/NEDD9/Cas-L gene. Int J Mol Med 2010 Jun 25: 897-903.

A novel large regulator RNA, *B2*, partially overlaps the *HEF1/NEDD9/Cas-L* gene

MARINE MALLETER^{1*}, CATHERINE JACQUOT^{1*}, DIMITRI MOREAU¹, CHRISTOPHE TOMASONI¹,
MARIANNA TSVETANOVA¹, IOANNA CHINO², MARCEL JUGE¹, ALAIN PINEAU¹,
PATRICE LE PAPE¹ and CHRISTOS ROUSSAKIS¹

¹Université de Nantes, Nantes Atlantique Université, IICIMED/ERATU, Cancer du Poupon et Cibles Moléculaires, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 1 rue Gaston Veil, Nantes, F.44 035 Cedex 1, France; ²Division of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, Athens 15771, Greece

Received September 21, 2009; Accepted December 23, 2010

DOI: 10.3892/ijmm.00000420

Abstract. The non-coding RNAs are new players in cellular and molecular biology. Indeed, quantitative and functional non-coding RNA has long been underestimated. There is a great diversity and it seems that much of the genome is transcribed into RNA, while only 1.2% of DNA information is translated into proteins. Non-coding RNA has been categorized according to different specifications so large non-coding RNA includes RNA with 300 to more than 10,000 bp. In this study, we propose a new non-coding RNA named *B2* discovered by differential display. *B2* is a nuclear RNA which is 51,011 bp long with no significant open reading frame. This RNA has a continuous homology with the genomic DNA of the *HEF1/NEDD9/Cas-L* gene located on 6p24-p25. This homology has enabled us to characterize its structure by choosing overlapping fragments to perform several RT-PCRs. *B2* RNA extends from 10 kb upstream of exon 1 of the *HEF1* gene on the 5' end to exon 4 *HEF1* on the 3' end. In addition, a strategic choice of PCR primers enabled us to determine the location of *B2* in the subcellular compartment and then real-time PCR revealed overexpression of *B2* and *HEF1* in certain tissues such as thymus, cervix, liver, and spleen (among the 20 tissues analysed). *B2* seems especially interesting in that it can regulate apoptosis and cell proliferation by modulating *HEF1*. In addition, the fact that cytostatic treatments can induce *B2* reinforces the interest in this new potential target

in the development of anticancer treatments. These results show that this novel non-coding RNA is an attractive target.

Introduction

The non-small-cell lung carcinomas (NSCLC) represent 80% (1) of all cases of lung cancer but remain very resistant to all therapies currently in use such as chemotherapy, radiotherapy and surgery (2). These therapies focus on fast proliferating cells but such lung cancers have a slow doubling time, sometimes extending for many months, which explains their chemoresistance. In this context, a new approach would be to develop an appropriate strategy with a greater specificity for cancer cells and a lower toxicity for normal cells thus halting the slowly developing tumour. With this objective, we investigated the screening of original natural or synthetic chemical compounds to find new molecules with innovative mechanisms of action. Cytostatic substances, that induce the arrest of NSCLC cells in the G1-phase of the cycle and then cell death through the apoptosis pathway, should be considered as potential candidates. These selected compounds must also show low toxicity and marked antitumour activity confirmed by good results *in vivo* on nude mice xenografts. Two synthetic molecules, VT1 and A190, have been shown to exhibit all these activities and have already been patented by our laboratory. We have shown in our earlier studies on the NSCLC-N6 cell line that these substances trigger the overexpression of many genes involved in the arrest of G1 proliferation (3). Using the differential display technique and the NSCLC cell line (NSCLC-N6), a large RNA, named *B2*, was identified and located on the human chromosome 6 at the p24-p25 locus. *B2* has no significant ORF (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) and one very interesting feature is that it overlaps the *HEF1* gene (4). *HEF1* belongs to a family of docking adapter proteins, including p130^{cas} and Efs, named the Cas family (5,6). The gene *HEF1* was discovered in 1996 but, in recent years, an increasing number of studies concerning this gene have been published. *HEF1* is involved in many different cellular functions, including migration, mitosis, differentiation and apoptosis (7,8).

Correspondence to: Dr Christos Roussakis, Université de Nantes, Nantes Atlantique Université, IICIMED/ERATU, Cancer du Poupon et Cibles Moléculaires, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 1 rue Gaston Veil, Nantes, F.44 035 cedex 1, France
E-mail: christos.roussakis@univ-nantes.fr

*Contributed equally

Key words: large non-coding RNA, regulator RNA, *HEF1*, *B2*, A190, miRNA, cytostatic molecules

HEF1 is a ubiquitous gene, present in many healthy tissues as well as in cell lines at different levels of expression. It is particularly expressed in lung tissue and pulmonary cell lines (5,6,9).

The transcription of *HEF1* is lower in phase G1 and increases in phase S reaching a maximum during phase G2/M. During the cell cycle, the p105^{HEF1} protein and p115^{HEF1}, its phosphorylated form, present in phase G1, are cleaved by caspases into p55^{HEF1} and p65^{HEF1} in the G2/M phase (6).

Moreover, *HEF1* is concentrated in the centrosome and stimulates RhoA and Aurora A, two enzymes whose activation/inactivation is essential in the whole mitosis process (10). Dadke and colleagues (19) have shown that *HEF1* is essential, in a very precise quantity, for the cell cycle to progress. The protein depletion resulting from RNA interference, as well as its overabundance, trigger apoptosis. Lastly, during mitosis, p55^{HEF1} associates with the mitotic spindle and decreases suddenly at the end of mitosis as a result of proteosomal degradation.

The major role of *HEF1* in the apoptosis process was first revealed by Law and colleagues (5). They induced *HEF1* over-expression and showed that the cell cycle was blocked in the G1 phase. At the same time, they detected a new form of *HEF1* protein, the p28^{HEF1}. This protein is derived from the split of the protein p65^{HEF1} by caspases 3 and/or 7. It leads to cell death by destabilizing the focal adhesion site and stimulating anoikis. To date, the pro-apoptotic activity of *HEF1* has been fully demonstrated and closely linked with the presence of this p28^{HEF1} protein in the cell during *HEF1* overexpression (11).

In the present study, we show that the RNA *B2*, initially isolated through differential display, has a size of at least 51,011 bp and partially overlaps the *HEF1* gene. Furthermore, 10 kb of its sequences are located upstream of exon 1 of *HEF1*. We also report that *B2* has all the structural characteristics of a regulator 'large ncRNA'.

Materials and methods

Cell lines and cultures. Two cell lines were used in this study, A549 and NSCLC-N6 (L16), originating from an adenocarcinoma and an epidermoid lung cancer, respectively. The NSCLC-N6 (L16) is a cell line derived from a human non-small cell lung carcinoma of a previously untreated patient (moderately differentiated classified as T2N0M0) (12). The A549 line was obtained from ATCC (reference CCL-185) (13) and is known to have a wild-type p53 gene while NSCLC-N6 has a mutant p53 gene, so it is very close to tumours *in situ*.

These cell lines were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 enriched with 100 IU of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin, 2 mM of glutamine and 5% foetal bovine serum. Cell culture plates were maintained in humidified incubators at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. L16 has a cell doubling time of 48 h *in vitro*, and A549 has a 24 h doubling time.

Extraction of total, nuclear and cytoplasmic RNA. Total RNA was extracted from NSCLC-N6 and/or A549 cell lines using Trizol® Reagent (Invitrogen, CA, USA) and chloroform according to the supplier's recommendations. Cell extracts

were centrifuged at 12,000 x g for 15 min at 4°C. The aqueous phase containing RNA was transferred to a fresh tube. An equal volume of 70% ethanol was added to the aqueous phase and mixed by vortexing. Then, samples were transferred to an RNA spin cartridge supplied with the Trizol® plus RNA Purification Kit (PureLink™ Micro-to-Midi™ Total RNA Purification System, Invitrogen, Applied Biosystems) in order to remove DNA contamination. Then RNAs were eluted with RNase-free water.

The quality and concentration of purified RNAs were assessed using UV absorbance at 260/280 nm and samples were run on 1% agarose gel in order to check their quality. RNAs were stored at -80°C.

To separate nuclear and cytoplasmic RNAs, some steps were added before the same extraction was carried out. Cells were washed with cold PBS and removed without trypsin and centrifuged for 5 min at 1,000 g. They were resuspended with a lysis buffer (Tris-Cl 50 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM and 0.5% nonidet P-40) and incubated for a few minutes on ice. Extracts were centrifuged for another 5 min at 13,000 g. Supernatant was collected and pellets were washed twice with PBS. SDS 20% was added to each fraction (supernatant and pellet) and mixed thoroughly by shaking or vortexing. Proteinase K (20 mg/ml) was added and the mix was incubated for 15 min at 37°C.

DNase treatment. To remove genomic DNA prior to reverse transcription PCR, Turbo™ DNase (Ambion) was used. If the RNA concentration was >200 µg/ml, samples were diluted to 10 µg nucleic acid/50 µl. The 10X turbo DNase buffer was added to sample to a 1X final concentration. Next, 2 U of turbo DNase was added to 10 µg RNA in a 50 µl reaction. Samples were incubated at 37°C for 30 min. Then DNase Inactivation Reagent was added, the mix was incubated for 2 min then centrifuged at 10,000 x g for 1.5 min. The supernatant, which contained RNA, was transferred to fresh tubes.

RT-PCR. RT was carried out with 1 µg of RNA in 10 µl with 0.125 µg/µl random primers and RNase-free water. This mixture was denatured at 65°C for 10 min then kept on ice. Subsequently, it was completed to a final volume of 25 µl with a mix containing 8 mM of dNTP mix, 1X of M-MLV 5X reaction buffer, 25 units of recombinant RNasin ribonuclease inhibitor (Promega), and 200 units of M-MLV RT (Promega) and completed with RNase-free water. In order to check whether samples were contaminated by genomic DNA, the same mix was made with RNA without the reverse transcriptase. Following this step, samples were incubated for 2 h at 37°C. cDNAs were stored at -20°C. After reverse transcription, cDNAs were used as a template for specific PCR.

B2 was discovered as a 185-bp fragment during RT differential display analysis in NSCLC-N6 cells (4,14). In order to characterize the 5' and 3' ends, RACE-PCR was first applied. Then DNA homology with the human chromosome 6 (GenBank No. AL136139.6 and AL139807.6 sequences) was exploited to perform RT-PCR. Primers were chosen so that two contiguous amplicons overlapped by at least 100-150 bp (Fig. 1). All primers were designed using the Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

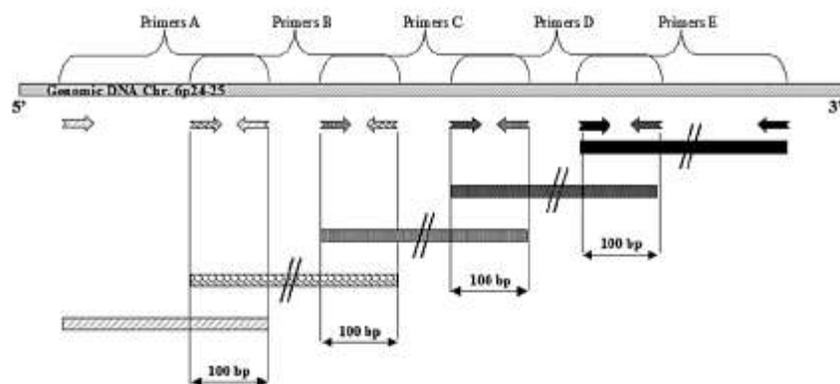


Figure 1. Schematic strategy for the identification of the B2 sequence. The genomic DNA sequence of chromosome 6 was used for sequence primers designed with the website Primer 3. Each amplified fragment was 1 kb long and overlapped the upstream and downstream amplified fragment over about 100 bp.

Table I. Characteristics of the probes used.

Probe name	Probe sequence	Tm* (°C)	Product size (bp)
Left primer B2-EX1-04	5'-AGGCCGCAAGACTCATCTTA-3'	60.5	533
Right primer B2-EX1-04	5'-GGATGCACTCCAACCAGACT-3'	59.9	
Left primer B2-Si3	5'-CAACTTGGGGTGCATTCTTC-3'	60.5	1,081
Right primer B2-Si3	5'-CTGAGA ACCAGCATGATGACA-3'	59.9	
Left primer B2-M EX	5'-CCGATATTCCTCAGGTACTCCA-3'	60.0	931
Right primer B2-M EX	5'-ACATGTCTCGATCTATGAAAAGA-3'	60.0	
Left primer B2-M INT	5'-AGGCTATCCAGCGTACTCCA-3'	60.0	320
Right primer B2-M INT	5'-CCTCCATGATGCTGCTTACA-3'	60.0	
Left primer HEF1 Exon 5	5'-AGCAGGGCTTAGGGAAAAG-3'	60.0	1,218
Right primer HEF1 Exon 5	5'-GCCAAGATATTCAGGGACCA-3'	60.0	

*Tm, temperature

Among all the B2 primers, B2-Si3 (Table I) matched the genomic sequence located between exons 2 and 3 of the *HEF1* gene and B2-Ex1-4 matched 4,000 bp upstream of the *HEF1* exon 1. Both were used to assess tissue expression and subcellular location.

HEF1 Exon5 primers (Table I) were used to assess *HEF1* expression on the FirstChoice Panel[®]. B2-M-INT and B2-M-EX were used as controls for B2-microglobulin amplification. These primer pairs were as follows, left B2-M-INT matched on the junction of the genomic sequence before exon 2 and exon 2 of the gene were included, and right B2-M-INT on the junction of the genomic sequence before exon 3 and exon 3 were included. They were employed for specific nuclear amplification of B2-microglobulin RNA.

Left B2-M-EX matched on the junction exon 1-exon 2 and right B2-M-EX on the junction exon 3-exon 4. They were used for cytoplasmic and nuclear amplification of B2-microglobulin RNA.

The PCR mix, consisting of 1X final of CoralLoad PCR buffer (QuiaGen), 200 μM of each dNTP, 0.5 μM of right Primer, 0.5 μM of left Primer and 2.5 units/reaction of Taq

DNA polymerase (QuiaGen) was in a final volume of 25 μl. The amplifications were performed with the following protocol, 3 min at 94°C for initial denaturation then 39 cycles of amplification (60 sec at 94°C, 60 sec at 60°C for primer annealing, 60 sec at 72°C for elongation), and 7 min at 72°C for final elongation. PCR products were analysed on 1% agarose gels stained with ethidium bromide (BET).

Race-PCR. The first step of this experiment consisted of a specific reverse transcription. It was achieved from tRNA extracted from A549 and L16. RNA (1 μg) was used with 1 μM of a specific primer (sequence) in 8.5 μl final volume. The mix was denatured for 10 min at 65°C in a thermocycler. Then, the 5X reaction buffer (Promega), dNTPs (10 mM), 20 IU RNase inhibitor (Promega), 100 mM DDT, 200 IU MMLV RT in 20 μl final volume were added and incubated at 37°C for 50 min, then 5 min at 70°C. In the second step, a poly C was added to the 3' end. The reaction buffer 5X, dCTP 2 mM and 10 U/μl were added to the previous mix and incubated for 15 min at 37°C and then at 70°C for 10 min. The third step is named anchored PCR. It is a normal PCR

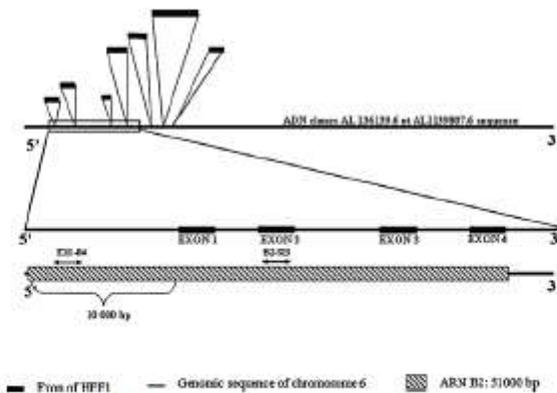


Figure 2. Schematic representation of homology between *HEF1* and *B2* in the region 6p24-25. *B2* is a large ncRNA that originates 10 kb upstream of the first exon of *HEF1* and ends at the intronic region encompassing exon 4 of *HEF1*. Specific primers of *B2* are shown in the figure. B2-SI3 spans the genomic sequence located between exons 2 and 3 of *HEF1* and EX1-04 is located upstream of exon 1 of *HEF1*.

but there is only one primer (sequence) and oligo dG 10 μ M is different from a classic PCR.

RNA panel. The RNA panel was used first in RT-PCR and then in qRT-PCR. RT-PCR was performed to study the expression of the *B2* RNA in different tissues. The First Choice[®] Human Total RNA Survey Panel (Ambion) was used as a source of RNA from 20 different normal tissues (ovary, skeletal muscle, trachea, prostate, placenta, thymus, small intestine, bladder, testes, brain, colon, esophagus, kidney, spleen, adipose, liver, heart, thyroid, cervix, lung). *B2*-EX-1, *B2*-SI3, *HEF1*, and β 2-microglobulin (*B2*-M EX and INT) amplifications were each carried out with all 20 RNAs.

Then these 20 normal tissues were tested in real-time PCR. *B2* and *HEF1* amplifications were carried out following the instructions of the manufacturer of SYBR Green PCR mix (Applied Biosystems) on the ABI Prism[®] Sequence Detection System 7300. The primers were designed using Primer 3 (as described above). For the gene *HEF1*, the primers were chosen on two different exons (1 and 2) to be sure of no interference between the amplifications of *HEF1* and *B2*. The primer sequences were *HEF1*, forward 5'-CGCTGCCGAAATGAATAT-3', reverse 5'-CCCTGTGTTCTGCTCTATGACG-3'; *B2*, forward 5'-ATTCCTTGGATCTTGCCTT-3', reverse 5'-CGTGAGGTCTGCCACTAC-3'. The relative expression was normalized with β -actin added to each gene, forward 5'-ATTCCCTTGCCTTCTTGGAT-3', reverse 5'-CGTGAGGTCTGCCACTACAG-3'. A control sample was used for each PCR to check the genomic DNA contamination of the cDNA template. The results were analysed using GenAmp 7300 SDS (Applied Biosystems).

Results

***B2* RNA is at least 50 kb.** From the 185 bp long initial fragment, we carried out as many as 117 RT-PCR (sequences not shown) to characterize the whole sequence of the *B2* RNA. Each amplicon was a 1-kb fragment and overlapped the previous and the next over at least 100 to 150 bp (Fig. 1).

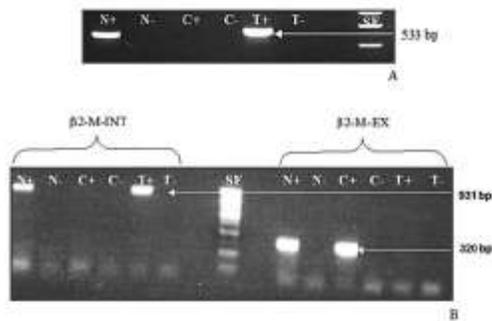


Figure 3. PCR amplification analysed on agarose gel 1% stained by BET. Cytoplasmic RNA and nuclear RNA were analysed by RT-PCR with *B2*-EX1-04 primers (A) and control primer (β 2-M-INT and β 2-M-EX) (B). (A) nuclear fraction with (N⁺) or without (N⁻) reverse transcription; cytoplasmic fraction with (C⁺) or without (C⁻) reverse transcription; T⁺ genomic DNA, T⁻ negative control; SF. (B) nuclear fraction with (N⁺) or without (N⁻) reverse transcription; cytoplasmic fraction with (C⁺) or without (C⁻) reverse transcription; T⁺ genomic DNA, T⁻ negative control. First six lanes show the amplification with β 2-M-INT and the last six lanes with β 2-M-EX.

To date, considering all the fragments joined together, *B2* spreads over at least 51,011 bp. It shows a total homology with the region 6p24-p25 of the human genome without any interruption. So it is formed with a single large exon.

B2 overlaps one part of the *HEF1* gene, 10 kb match upstream of the exon 1 *HEF1* and the last 40,000 bp spread from exon 1 to exon 4 of *HEF1* (Fig. 2). No significant ORF was identified in the whole sequence. Finally, the 5' end is defined. The sequence was published in Genbank, GQ497714.

***B2* is a nuclear RNA.** RT-PCR was performed on both nuclear and cytoplasmic RNAs. *B2*-SI3 as well as *B2*-EX-1 primers show amplification only on the nuclear RNA extract (Fig. 3). *B2*-SI3 lies on the initial differential display located in the

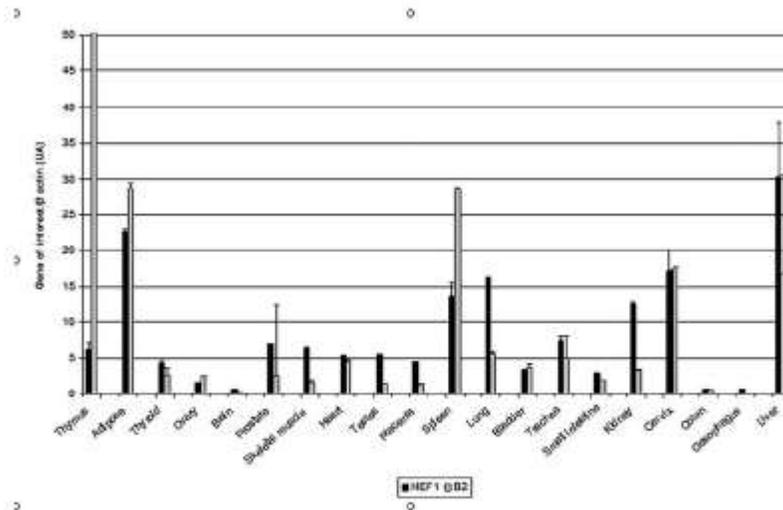


Figure 4. Expression of the gene *B2* (grey) and *HEF1* (black) on FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel (Ambion) by real-time PCR.

genomic sequence between exons 2 and 3 of the *HEF1* gene but *B2*-EX4-1 matches the part upstream of exon 1 of *HEF1*, thus ruling out any interference with *HEF1* mRNA. We have shown only the result with *B2*-EX4-1 because it is the same result.

Then RT-PCR was carried out with *B2*-M-EX and *B2*-M-INT primers on the same RNA extracts and the same cDNA. As might be expected, PCR amplification with *B2*-M-INT was possible only on the nuclear RNA extract. This experiment, with the DNase treatment, confirms that nuclear RNA could actually be amplified in our extracts. Moreover, it also confirms that no nuclear contaminants were present in the cytoplasmic RNA fraction. With *B2*-M-EX, PCR fragments were present both in the cytoplasmic and in the nuclear fraction because of the mRNA maturation that occurred in the nuclear compartment. Moreover, these latter primers enabled us to validate the RT step.

B2 RNA is as ubiquitous as the *HEF1* gene. As *B2* overlaps the *HEF1* gene, we were interested in the relation between these two genes. More precisely, we investigated whether *B2* and *HEF1* were expressed in the same tissues. To test this, we chose to use the same commercial RNA panel that had been employed in a recent study on *HEF1* (9). So additional RT-PCR was performed with *B2*-Si3 and *B2*-EX1-4 primers. Each primer pair was tested on all 20 RNA extracts.

The expression of *B2* RNA could be amplified in all normal tissues tested, such as for *HEF1*. The expression of these two genes were analysed with real-time PCR.

Quantification of B2 RNA and the HEF1 gene. As these 2 genes could be amplified in the 20 tissues tested, we investigated this directly using quantitative RT-PCR to analyse *B2* and *HEF1* expression in mRNAs prepared from 20 human tissues (Fig. 4). *HEF1* was most abundant in adipose, lung, cervix, liver and

Table II. *B2* and *HEF1* amplification from different tissues of the FirstChoice® Human Total RNA Survey Panel.

Tissue (+)	Expression <i>B2</i>	Expression <i>HEF1</i>	Tissue (x)
Bladder	+ x	+ x	Skeletal muscle
Testes	+ x	+ x	Heart
Oesophagus	+ x	+ x	Cervix
Brain	+ x	+ x	Lung
Trachea	+ x	+ x	Spleen
Colon	+ x	+ x	Kidney
Placenta	+ x	+ x	Small intestine
Thymus	+ x	+ x	Liver
Thyroid	+ x	+ x	Adipose
Ovary	+ x	+ x	Prostate

spleen and was detected at lower levels in the other tissues while *B2* was most abundant in thymus, adipose, cervix, liver and spleen and was detected at lower levels in the other tissues (Table II). These results are consistent with the study of Golemis *et al* (9).

Discussion

Since the sequencing of the entire genome, we know that the transcriptome is much bigger than had previously been supposed. Particularly, in recent years numerous studies have shown the importance of small non-coding RNAs such as miRNA, small nuclear and nucleolar RNAs, in the regulation of gene expression. However, a new class of non-coding RNAs has also now emerged which comprises RNAs of several thousand bp. Most of these 'large RNAs' are not spliced and

are at least 10 kb in size. Their function is not yet clear but some are involved in the regulation of the expression of adjacent genes. Among the best known is *Air*, a non-coding unspliced RNA of 108 kb which acts as the 'silencer' for three genes coding for proteins of the *igf2r* cluster (15). Another is *NTT*, an RNA of 17 kb situated in 6q23-q24 next to the receptor γ of interferon, whose expression it regulates in CD4⁺ cells. Finally, there is *Xist*, a nuclear RNA of 17 kb which is involved in the transcriptional silencing of one of the two X chromosomes in the female embryo (16).

The present study revealed a new large non-coding RNA, called *B2*, which is 51 kb long. It is nuclear, has no open reading frame and is found in the p24-p25 region of chromosome 6. It is particularly interesting because it presents a total and continuous homology with genomic DNA, and thus consists of one large exon that overlaps the *HEF1* gene from exon 4 to >10,000 bp upstream of exon 1. In addition, we have compared the tissue expression of *B2* and *HEF1* in 20 RNAs of healthy tissues. Our results show that these two molecular targets are expressed in all the healthy tissues of the panel. However, *HEF1* is overexpressed in adipose, spleen, cervix, liver, and lung. Moreover, when the expression of *B2* is weaker, as in liver, there is an overexpression of *HEF1*. These results are in agreement with those published by Golemis and co-workers who showed an overexpression of *HEF1* in lung (9). *B2*, however, is overexpressed in adipose, spleen, cervix, liver and thymus (Fig. 4). In fact, in the thymus, *B2* is greatly overexpressed compared to *HEF1*. Collectively, the results show that overexpression of *B2* leads to the repression of the *HEF1* gene, as observed in the thymus, adipose, and spleen. Conversely, when *B2* is weakly expressed, *HEF1* is overexpressed as seen in the lung and kidney. These results confirm a link between the overexpression of *B2* and the repression of *HEF1*, which implies that the non-coding RNA *B2* regulates the *HEF1* gene.

This could occur by numerous mechanisms, identified to varying degrees in previous studies. Among the best known is transcriptional interference. This results from a strong promoter acting on a weaker promoter located downstream and thus affects two genes close together (17). Another mechanism can explain this regulation of *HEF1* by *B2*: due to its nuclear location and large size, *B2* can induce a loop in the chromatin enabling the repression of *HEF1*. Such chromatin loops have already been suggested to explain how much ncRNA takes part in the phenomenon of higher-order chromatin silencing (17). Alternatively, the transcription of such a large RNA could simply enable all the transcription factors to be sequestered thus preventing gene *HEF1* transcription (17). Other hypotheses are also feasible; *B2* is a non-coding nuclear RNA which could form an RNA/DNA triple helix during the transcription of the RNA of *HEF1* thus blocking it as has already been shown (17). The final hypothesis to be considered here is that *B2* acts as an RNA precursor of miRNA. In fact, according to one study, *H19* was one of the first non-coding RNAs to be identified and has recently been described as a precursor of miRNA (18). As *B2* RNA overlaps several exons of the *HEF1* gene, it seems possible that *B2* could induce miRNA directed against *HEF1* mRNA. Moreover, bioinformatic analysis shows that the sequence of the *B2* gene can generate numerous sequences typical of miRNA. These sequences would be recognized and

cleaved into pre-miRNA by Drosha in the nuclear compartment then transferred by exportin 5 into the cytoplasm where the Dicer complex would transform these pre-miRNA into miRNA (18).

The *HEF1* gene is known for its involvement in the control of cell growth, in apoptosis and in cell motility through its interaction with cellular adhesion sites and the mitotic spindle (5,19). *HEF1* is responsible for the production of 4 different proteins, p115^{HEF1} and p105^{HEF1} cleaved into p65^{HEF1} and p55^{HEF1} by caspases. Moreover, Law *et al.* showed that overexpression of *HEF1* in MCF-7 cells increased the proteolytic activity of caspase 3 and/or 7 leading to the cleavage of p65^{HEF1} into p28^{HEF1} (20). The C-terminal region of this p28^{HEF1} seems to be responsible for the pro-apoptotic activity of *HEF1*. In fact, p28^{HEF1} favours the cleavage of Focal Adhesion Kinase (FAK) leading to apoptosis (11).

Cell proliferation, motility and growth are the three target areas of anticancer chemotherapy. In this approach, our aim was to demonstrate that *HEF1* and *B2* are involved in halting proliferation by inducing apoptosis in the anticancer chemotherapy of lung cancer. The work of Moreau *et al.* (20) has highlighted the antitumour effect of the cytostatic molecule A190 on nude mice xenografted by non-small cell lung carcinomas.

The results that we have obtained on the two lung cell lines A549 and L16 during treatment with A190 confirm the existence of *HEF1* gene regulation by *B2* RNA.

A190 induces cell apoptosis at the same time as it increases the expression of both *HEF1* and *B2* RNA. This overexpression occurs after 60 h of treatment and falls dramatically after 70 h. If non-coding *B2* RNA acts as a precursor of miRNA, it would enable the production of miRNA directed against *HEF1* mRNA, explaining the sudden drop in the level of expression. The decrease in *HEF1* mRNA would lead to a lack of *HEF1* protein which would fall below the minimal threshold required for the cell cycle to progress and apoptosis would be triggered.

The team of Golemis (7,8) has demonstrated that the normal progression of the cell cycle requires a precise quantity of the *HEF1* protein. This must lie between an upper and a lower limit, thus three possible situations can occur. If there is the correct quantity of *HEF1* protein in the cell, the truncated form p55^{HEF1} contributes to the normal cell cycle and mitosis can take place. However, if there is excess *HEF1*, above the upper limit, then the p65^{HEF1} form, also in excess, is cleaved into p28^{HEF1} which initiates apoptosis. Similarly, if there is insufficient *HEF1*, below the lower limit, the cell cycle will be irreversibly stopped in the very early stages of mitosis.

The latter situation would be applicable during treatment of cells A549 and L16. This would explain how the molecule A190 could trigger apoptosis even in the absence of p28^{HEF1} which has never been detected by Western blotting (data not shown).

There remains a great deal to discover about large ncRNAs. Their study is at an early stage and it would not be surprising to see their importance grow in numerous diseases, particularly in cancer. Our identification here of such an RNA in lung cancer cells is one illustration. *B2* seems especially interesting in that it can regulate apoptosis and cell proliferation by

modulating *HEF1*. In addition, the fact that cytostatic treatments can induce *B2* reinforces the interest of this new potential target in the development of anticancer treatments.

Acknowledgements

We thank La Ligue Départementale Contre Le Cancer, Région Pays de La Loire and Professors P. Tsitsi and Antoniadou-Vyza and Anne-Laure Biang for their contributions.

References

1. Lilenbaum RC, Herndon JE 2nd, List MA, Desch C, Watson DM, Miller AA, Graziano SL, Perry MC, Saville W, Chahinian P, Weeks JC, Holland JC, *et al*: Single-agent versus combination chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: the cancer and leukemia group B (study 9730). *J Clin Oncol* 23:190-196, 2005.
2. Ettinger DS: Overview and state of the art in the management of lung cancer. *Oncology* 18: 3-9, 2004.
3. Carbonnelle D, Jacquot C, Lanco X, Le Dez G, Tomasoni C, Briand G, Tsiotis A, Calogeropoulou T and Roussakis C: Up-regulation of a novel mRNA (NY-CO-1) involved in the methyl 4-methoxy-3-(3-methyl-2-butanoyl) benzoate (VT1)-induced proliferation arrest of a non-small-cell lung carcinoma cell line (NSCLC-N6). *Int J Cancer* 92: 388-397, 2001.
4. Jacquot C, Carbonnelle D, Tomasoni C, Papaconstadinou A, Roussis V and Roussakis C: Identification of a novel putative non-coding RNA involved in proliferation arrest of a non-small cell lung carcinoma cell line treated with an original chemical substance, methyl-4-methoxy-3-(3-methyl-2-butanoyl) benzoate. *Int J Oncol* 25: 519-527, 2004.
5. Law SF, Estojak J, Wang B, Mysliwiec T, Kruh G and Golemis EA: Human enhancer of filamentation 1, a novel p130cas-like docking protein, associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 3327-3337, 1996.
6. Law SF, Zhang YZ, Klein-Szanto AJ and Golemis EA: Cell cycle-regulated processing of HEF1 to multiple protein forms differentially targeted to multiple subcellular compartments. *Mol Cell Biol* 18: 3540-3551, 1998.
7. Law SF, O'Neill GM, Fashena SJ, Einarson MB and Golemis EA: The docking protein HEF1 is an apoptotic mediator at focal adhesion sites. *Mol Cell Biol* 20: 5184-5195, 2000.
8. O'Neill GM, Seo S, Serebriskii KI, Lessin SR and Golemis EA: A new central scaffold for metastasis: parsing HEF1/CasL/NEDD9. *Cancer Res* 67: 8975-8979, 2007.
9. Singh MK, Dadke D, Nicolas E, Sembriskii IG, Apostolou S, Canutescu A, Egleston BL and Golemis EA: A novel cas family member, HEPL, regulates FAK and cell spreading. *Mol Biol Cell* 19: 1627-1636, 2008.
10. Pagacheva EN and Golemis EA: HEF1-aurora A interactions: points of dialog between the cell cycle and cell attachment signaling networks. *Cell Cycle* 5: 384-391, 2006.
11. O'Neill GM and Golemis EA: Proteolysis of the docking protein HEF1 and implications for focal adhesion dynamics. *Mol Cell Biol* 21: 5094-5108, 2001.
12. Roussakis C, Gratas C, Audouin AF, Le Boterff J, Dabouis C, Andre MJ, Moyon E, Vo NH, Pradal G and Verhiet JF: Study of in vitro drug sensitivity on a newly established cell line from a primary bronchial epidermoid carcinoma of human origin (NSCLC-N6). *Anticancer Res* 11: 2239-2244, 1991.
13. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H and Parks WP: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51: 1417-1423, 1973.
14. Liang P and Pardee AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971, 1992.
15. Seidl CI, Stricker SH and Barlow DP: The imprinted Air ncRNA is an atypical RNAPII transcript that evades splicing and escapes nuclear export. *EMBO J* 25: 3565-3575, 2006.
16. Clerc P and Avner P: Role of the region 3' to Xist exon 6 in the counting process of X-chromosome inactivation. *Nat Genet* 19: 249-253, 1998.
17. Pauler FM, Koerner MV and Barlow DP: Silencing by imprinted noncoding RNA: is transcription the answer? *Trends Genet* 23: 284-292, 2007.
18. Cai X and Cullen BR: The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* 13: 313-316, 2007.
19. Dadke D, Jamik M, Pagacheva EN, Singh MK and Golemis EA: Deregulation of HEF1 impairs M-phase progression by disrupting the RhoA activation cycle. *Mol Biol Cell* 17: 1204-1217, 2006.
20. Moreau D, Jacquot C, Tsitsi P, Chinou I, Tomasoni C, Juge M, Antoniadou-Vyza E, Martignat L, Pineau A and Roussakis C: Original triazine inductor of new specific molecular targets, with antitumor activity against non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 123: 2676-2683, 2008.

Résumé

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité au niveau mondiale, ainsi qu'en France. Aujourd'hui, les cibles moléculaires utilisées agissent sur des cellules qui prolifèrent rapidement ; ce qui explique leur inefficacité sur le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (CBNPC) qui se développent lentement. Il est donc important de découvrir de nouvelles cibles moléculaires induites par de nouvelles molécules anticancéreuses qui puissent agir sur ce type de cellules.

Précédemment, l'équipe a identifié deux cibles moléculaires HEF1 et B2 exprimées dans le CBNPC.

- HEF1 est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires comme l'apoptose, la prolifération cellulaire et la motilité.

- Le gène B2 découvert et identifié par l'équipe superpose une partie de l'ADN génomique de HEF1. Cet ARN non codant de 54 Kb est exprimé dans différents tissus et plus spécifiquement dans le tissu pulmonaire comme le gène HEF1.

Au vu des caractéristiques de l'ARN B2 et de son homologie de séquence avec HEF1, nous avons émis l'hypothèse d'une relation de régulation de HEF1 par l'ARN B2. Cette régulation induite par l'ARN B2 s'effectuerait par le mécanisme des miRNA. En effet, cet ARN non codant de grande taille serait un précurseur de miRNA capable de réguler HEF1 tel que le miR-HSA-146b. Ce miRNA surexprimé dans les cellules NSCLC-N6 pourrait réguler HEF1 au niveau de l'exon 4.

Ainsi ces gènes préparent une nouvelle approche de thérapie génique dont l'expression serait modulée par des molécules cytostatiques telle que la molécule A190 brevetée par le laboratoire.

Mot clefs : Cancer broncho-pulmonaire, cibles moléculaires, ARN non codant, B2, HEF1, ARN régulateur, miRNA

Summary

The lung cancer is at the first place of the death at the world level and in France to. Today, the used molecular targets act on cells which has a speed proliferation, so the fact could explain their ineffectiveness on the non small cells lung cancer (NSCLC) which presents the particularities to have cells which have a slowly proliferation. So, it is very important to discover new molecular targets induced by new anti-cancer molecules which can act on these cells with the slowly proliferation.

Previously the laboratory has identified two molecular targets HEF1 and B2 expressed in NSCLC. HEF1 is involved in numerous cellular functions such as apoptosis, cell proliferation, motility. B2 discovered and identified by the laboratory overlapped a part of the HEF1 genomic DNA. This 54 Kb non coding RNA is expressed in different tissues and specifically expressed in lung tissue as the HEF1 gene. Having regard the B2 RNA characteristics and the homology of sequence with HEF1, we put in evidence the existence of a regulation of the HEF1 gene by the B2 RNA. This regulation induced by B2 would be made by the miRNA mechanism. In fact, this large non-coding RNA would be a precursor of miRNA which could for some of them being directed against the HEF1 gene such as hsa-mir-146B. This miRNA overexpressed in NSCLC-N6 cells, has a high homology with the B2 gene and could regulate HEF1 gene on the exon 4. So these genes could be an approach of a new gene therapy whose the expression is modulated by cytostatic molecules such as the molecule A190 patented by the lab.

Key words : lung cancer, molecular targets, non coding RNA, B2, HEF1, regulator RNA, miRNA