

Université de Montréal

Étude de l'implication des récepteurs de l'acide rétinoïque dans le contrôle de la tumorigénèse pulmonaire.

par
André Toulouse

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph. D.)
en biologie moléculaire

Septembre 1997

© André Toulouse 1997



QH
506
U54
1998
v. 008



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

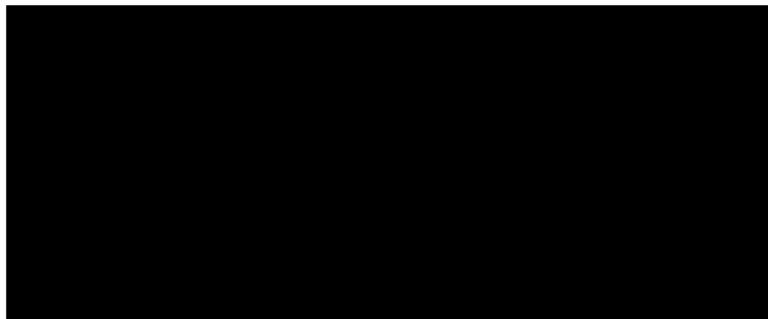
Cette thèse intitulée:

Étude de l'implication des récepteurs de l'acide rétinoïque dans le contrôle de la tumorigénèse pulmonaire.

présentée par:

André Toulouse

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:



Thèse acceptée le: 06.05.1998

Sommaire

Le cancer pulmonaire est aujourd'hui une des principales causes de mortalité à l'échelle mondiale. L'accroissement du nombre de cas se fait actuellement selon un patron épidémique si bien que l'on estime qu'annuellement ce sont 3 000 000 de vies humaines qui sont perdues des suites de cette maladie. Malgré d'importants progrès dans les modalités thérapeutiques, le taux de survie après cinq ans demeure très faible, il est d'environ 15%. Plusieurs groupes se sont attardés au cours des dernières années à identifier les événements moléculaires impliqués dans la formation des tumeurs pulmonaires, identification qui permettrait une meilleure compréhension de la biologie des tumeurs et possiblement une amélioration des capacités curatives.

Depuis plusieurs années, on sait que l'acide rétinoïque, un dérivé naturel de la vitamine A, possède des capacités d'inhibition de la croissance tumorale et de prévention de la tumorigénèse. Au niveau moléculaire, plusieurs études entreprises ces dernières années ont permis de déterminer que certaines cellules tumorales présentaient des anomalies d'expression d'un des gènes codant pour un des récepteurs de l'acide rétinoïque, RAR β . Des études ont montré que l'isoforme RAR β 1 est anormalement exprimé dans les tumeurs du groupe SCLC tandis qu'il y a perte de l'isoforme RAR β 2 dans les tumeurs épidermoïdes. Il a été démontré que l'introduction de l'isoforme β 2 dans ces dernières cellules supprime leur croissance *in vitro* et leur capacité à former des tumeurs *in vivo*. Nos études nous ont amené à caractériser la structure du gène RAR β et à déterminer la spécificité de son rôle dans le contrôle de la tumorigénèse ainsi que les mécanismes par lesquels il agit.

Nous avons cloné et caractérisé la partie 5' du gène $RAR\beta$, soient les régions promotrices et 5' non-traduites de l'isoforme $RAR\beta1$ ce qui nous a permis de compléter la cartographie du gène $RAR\beta$ humain. Par la suite, nous nous sommes attardés à la détermination de la spécificité de la fonction suppressive de $RAR\beta2$. En utilisant un système de lignées cellulaires épidermoïdes, nous avons montré que seule la ré-expression de l'isoforme $RAR\beta2$ est capable de médier les effets de suppression de croissance de l'acide rétinoïque et que la surexpression ou l'expression d'autres isoformes ($RAR\alpha1$ et $RAR\beta1$ respectivement) n'en étaient pas capables. De plus, nos études suggèrent fortement que les isoformes du gène $RAR\alpha$ ne sont pas impliquées dans la suppression de croissance et que différents mécanismes réguleraient la réponse des récepteurs à l'acide rétinoïque. Suite à cette démonstration, il devenait important de déterminer quelles sont les cibles du récepteur $\beta2$ et lesquelles pourraient médier l'effet supprimeur de l'acide rétinoïque. En utilisant une approche d'hybridation différentielle nous montrons ici que plusieurs gènes sont régulés spécifiquement par $RAR\beta2$ et que certains d'entre eux pourraient être impliqués dans le contrôle de la croissance et de la tumorigénèse.

Table des matières

Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et abréviations	xii
Remerciements	xiv
1. Introduction	
1.1 Statistiques sur le cancer	2
1.2 Facteurs de risque associés au cancer pulmonaire	3
1.2.1 Tabagisme et carcinomes pulmonaires	3
1.2.2 Diète et nutriments	4
1.2.3 Facteurs génétiques	7
1.2.4 Sexe	10
1.2.5 Histoire médicale	11
1.2.6 Exposition professionnelle	11
1.3 Principaux types histologiques de tumeurs pulmonaires	12
1.3.1 Carcinomes pulmonaires NSCLC	13
1.3.1.1 Carcinomes épidermoïdes	13
1.3.1.2 Adénocarcinomes pulmonaires	16
1.3.1.3 Carcinomes pulmonaires à grandes cellules	17
1.3.2 Carcinomes pulmonaires SCLC	18
1.3.2.1 Carcinomes pulmonaires à petites cellules	18
1.3.2.1.1 Les SCLC classiques	19
1.3.2.1.2 Les SCLC variants	19

1.4 Biologie des tumeurs pulmonaires	22
1.4.1 Anomalies chromosomiques des tumeurs pulmonaires	23
1.4.2 Oncogènes	25
1.4.2.1 Les oncogènes dominants	25
1.4.2.1.1 Les voies de signalisation cellulaire	27
1.4.2.1.2 Les récepteurs membranaires	27
1.4.2.1.3 La famille RAS	28
1.4.2.1.4 Les effecteurs de RAS	29
1.4.2.1.5 La famille MYC	29
1.4.2.1.6 Autres oncogènes	30
1.4.2.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs	30
1.4.2.2.1 Le gène du rétinoblastome (RB)	31
1.4.2.2.2 p16 ^{INK4}	32
1.4.2.2.3 p53	32
1.4.2.2.4 Chromosome 3p	35
1.4.3 Autres altérations génétiques	36
1.4.3.1 Activité télomérase	36
1.4.3.2 Instabilité génomique et gènes "mutator"	38
1.4.3.3 Méthylation	39
1.4.4 Les facteurs de croissance	40
1.5 Carcinogénèse pulmonaire	41
1.5.1 Modèle de cancérogénèse de Minna	42
1.5.2 Modèle de tumorigénèse à cellules souches	43
1.6 L'acide rétinoïque et ses récepteurs	45
1.6.1 Les récepteurs de l'acide rétinoïque	46
1.6.2 Les RARs et la régulation transcriptionnelle	50
1.6.2.1 Type de dimère actif	50

1.6.2.2 Les éléments de réponse	51
1.6.2.3 Interactions avec d'autres protéines	54
1.6.2.4 Le rôle spécifique des récepteurs de l'acide rétinoïque	56
1.6.3 Quels sont les gènes régulés par les RARs?	57
1.6.4 Les récepteurs de l'acide rétinoïque et le cancer	59
1.6.5 L'acide rétinoïque et la différenciation cellulaire	65
1.6.6 La différenciation de l'épithélium trachéobronchial et l'acide rétinoïque	65
1.7 Buts et raisons de cette thèse	67
2. Structure of the human retinoic acid receptor β 1 gene.	
Abstract	72
Introduction, Results and Discussion	73
Acknowledgements	77
References	78
Footnote	80
3. RAR β 2 specificity in mediating RA inhibition of growth of lung cancer-derived cells.	
Abstract	87
Introduction	88
Materials and Methods	92
Results	95
Discussion	99
Acknowledgements	103
References	104

4. RAR β 2, a tumor suppressor gene controls genes involved in immune surveillance.	
Abstract	121
Introduction	122
Materials and Methods	124
Results	127
Discussion	132
Acknowledgements	139
References	140
Footnotes	149
5. Discussion et Conclusion	
5.1 Structure du gène RAR β humain et implications fonctionnelles	160
5.2 La recherche des mécanismes de suppression tumorale	162
5.2.1 Implication des RARs dans le contrôle de la tumorigénèse pulmonaire	163
5.2.1.1 Modèles de culture cellulaire	163
5.2.1.2 Modèles murins, tumorigénèse pulmonaire et RAR β 2	168
5.2.2 RAR β et le contrôle transcriptionnel	170
5.2.2.1 Caractérisation par RAP-PCR des lignées dérivées de Calu-1	171
5.2.2.2 Isolement de gènes différentiellement exprimés	175
5.3 Conclusion	181
BIBLIOGRAPHIE	183

Liste des tableaux

Chapitre 1: INTRODUCTION

TABLEAU I	Carcinomes pulmonaires: principaux types histologiques et incidences relatives.	14
TABLEAU II	Marqueurs biochimiques associés aux principaux types de carcinomes pulmonaires.	21
TABLEAU III	Régions chromosomiques fréquemment altérées dans les tumeurs pulmonaires par délétions et translocations non-réciproques.	24

Chapitre 3: RAR β 2 SPECIFICITY IN MEDIATING RA INHIBITION OF GROWTH OF LUNG CANCER-DERIVED CELLS.

TABLE I	Effect of RA on growth of Calu-1 cells and transfected derivatives.	111
TABLE II	RAR α 1/ α 2 expression profile in lung cancer cell lines.	112

Chapitre 4: RAR β 2, A TUMOR SUPPRESSOR GENE CONTROLS GENES INVOLVED IN IMMUNE SURVEILLANCE.

TABLE I	Variations in fingerprint profiles	150
TABLE II	Genes differentially expressed on Atlas human cDNA Array I	151

Liste des figures

Chapitre 1: INTRODUCTION

Figure 1: Structure fonctionnelle des récepteurs de l'acide rétinoïque. 49

Figure 2: Éléments de réponse à l'acide rétinoïque et principaux type de dimères liés. 53

Chapitre 2: STRUCTURE OF THE HUMAN RETINOIC ACID RECEPTOR β 1 GENE

Figure 1: Sequence comparison of the 5' ends of human (h) and mouse (m) RAR β 1 cDNAs. 81

Figure 2: Genomic structure of the hRAR β gene. 83

Chapitre 3: RAR β 2 SPECIFICITY IN MEDIATING RA INHIBITION OF GROWTH OF LUNG CANCER-DERIVED CELLS.

Figure 1: RT-PCR analysis of Calu-1 transfected derivatives. 113

Figure 2: *In vitro* cell growth rates. 115

Figure 3: RAR α 1/ α 2 expression. 117

Chapitre 4: RAR β 2, A TUMOR SUPPRESSOR GENE CONTROLS GENES INVOLVED IN IMMUNE SURVEILLANCE.

Figure 1: Fluorescent RAP-PCR results. 152

Figure 2: Atlas human cDNA Array I.	154
Figure 3: Expression of ICAM-1 and MHC class I molecules at the cell surface of C30 and C64 Calu-1 derivatives prior to and after treatment with 100 nM RA for 7 days.	156

Liste des sigles et abréviations

%	pourcentage
α	alpha
β	beta
γ	gamma
μ	micro
^{32}P	isotope radioactif du phosphore
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AF	Fonction d'activation transcriptionnelle
AR	Acide rétinoïque
ARN	Acide ribonucléique
ARNase	Ribonucléase
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
Ci	Curie
CK-BB	Isoenzyme BB de la créatine kinase
CO ₂	Dioxyde de carbone
dCTP	Désoxycytidine-5'-triphosphate
DDC	L-dopa décarboxylase
dNTP	Désoxynucléotide-5-triphosphate
EDTA	Acide éthylènamide tétraacétique
ER	Récepteur nucléaire de l'œstrogène
GRP	"gastrin releasing peptide"
HCl	Acide chloridrique
KCl	Chlorure de potassium

LiCl	Chlorure de lithium
M	Molarité
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MMuLV-RT	Réverse transcriptase du Moloney Murine Leukemia Virus
NSE	Enolase spécifique aux neurones
NSCLC	Carcinome pulmonaire non à petites cellules (Non small cell lung cancer)
ORF	Cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame)
PBS-	Phosphate buffered saline
PCR	Réaction en chaîne de polymérase (polymerase chain reaction)
PLFR	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
RAP-PCR	"Arbitrarily-primed PCR fingerprinting of RNA"
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
RARE	Elément de liaison des récepteurs de l'acide rétinoïque
rpm	Rotations par minute
RXR	Retinoid X Receptor (récepteur de l'acide 9- <i>cis</i> -rétinoïque)
SCLC	Carcinome pulmonaire à petites cellules (Small cell lung cancer)
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TES	Solution Tris-EDTA-SDS
THR	Récepteur nucléaire de l'hormone thyroïdienne
Tg	Transgène
Tris	Tris(hydroxyméthyl) aminométhane
U	Unité d'activité enzymatique
UTP	Uridine triphosphate
VDR	Récepteur nucléaire de la vitamine D
°C	Degré Celsius

Remerciements

La curiosité est parfois défaut mais elle peut aussi s'avérer qualité auquel cas, elle doit être enseignée et entretenue par maints encouragements et conseils.. Au début il y a eu ma famille qui a su m'enseigner ce qu'est la curiosité, m'ouvrir de nouveaux horizons et m'encourager à les explorer. Par la suite à cette famille s'est ajoutée une personne qui a su partager et stimuler la curiosité. Enfin vint le laboratoire où j'ai pu terminer l'apprentissage de cette qualité. J'aimerais donc remercier tous ceux qui au fil des ans ont contribué à la formation et au développement de ma curiosité.

A Ted, merci d'avoir pris la chance de m'accueillir sans me connaître il y a six ans, merci pour ton ouverture d'esprit et le soutien offerts. Bien que cela ne soit pas toujours évident, tu as su me transmettre ton enthousiasme, ta créativité et ta rigueur scientifique.

A Johane, merci pour toute l'aide apportée et l'amitié partagée. Sans ta collaboration, ce travail aurait été beaucoup plus ardu.

Merci à Patrick Dion et Miguel Landers pour l'amitié et le support offerts ainsi qu'aux autres membres du laboratoire et de l'institut pour votre patience et vos encouragements.

*"Lecteur, je ne serais nullement
étonné si tu ne croyais pas ce que
je vais conter puisque moi, qui l'ai
vu, j'ai du mal à l'admettre."*

Dante

Enfer

Chant XXV

Chapitre 1

Introduction

1.1 Statistiques sur le cancer

Au fil des dernières décennies, l'incidence du cancer a évolué selon un patron épidémique au point de devenir un problème de santé majeur principalement dans les sociétés occidentales mais aussi dans les pays en voie de développement (Samet, 1993). L'évolution dans les habitudes de vie (alimentation, tabagisme, longévité) y contribuent beaucoup mais aussi certains facteurs environnementaux (pollution), l'évolution des méthodes diagnostiques et l'établissement de registres contribuent certainement à l'élévation du nombre de cas diagnostiqués (I. N. C. du Canada, 1997).

Dans les sociétés occidentales le carcinome pulmonaire représente actuellement la principale cause de mortalité par cancer si bien qu'on estime que 3 000 000 de vies sont perdues chaque année dans le monde des suites de cette maladie (Valanis, 1996). Au Canada on estime qu'en 1997, 169 000 personnes décèderont des suites d'un cancer dont 28% d'un carcinome pulmonaire (I. N. C. du Canada, 1997). Au fil des ans, on a remarqué une tendance à l'augmentation dans les taux globaux de carcinomes pulmonaires. Par contre, si on divise les tendances selon les sexes, le taux de mortalité par cancer pulmonaire a plafonné chez l'homme et le taux d'incidence diminue lentement (I. N. C. du Canada, 1997). A l'opposé chez la femme, les taux d'incidence et de mortalité sont en hausse si bien que le cancer du poumon dépasse maintenant le cancer du sein comme principal carcinome affectant les canadiennes (I. N. C. du Canada, 1997).

1.2 Facteurs de risque associés au cancer pulmonaire

1.2.1 Tabagisme et carcinomes pulmonaires

Avec la libéralisation des moeurs dans les années 60, on a observé une augmentation du tabagisme chez la femme, augmentation qui est corrélée avec les taux d'incidence et de mortalité actuels (I. N. C. du Canada, 1997). Par contre pour l'homme, les dernières statistiques canadiennes sur le cancer font état d'un recul l'incidence du cancer du poumon qui serait associé avec la décroissance du tabagisme masculin observée dans les années 60. Depuis les années 50, plusieurs études ont montré que le principal facteur de risque pour les carcinomes pulmonaire est, de fait, le tabagisme (I. N. C. du Canada, 1997; Coleman et al., 1993; Kabat, 1996; Samet, 1993) si bien qu'on estime aujourd'hui que 80% de tous les carcinomes pulmonaires sont dûs au tabagisme (Doll et Peto, 1978; Doll et Peto, 1981; Stanley et Hansen, 1985). Il semble en fait que le décalage observé entre les variations pour le tabagisme et les variations dans les taux de cancers soient la représentation du délai permettant l'accumulation de dommages génétiques nécessaires à la transformation cellulaire et à la croissance tumorale (Frank, 1989). Avec la démonstration que certains carcinogènes de la fumée de tabac sont directement responsables de mutations dans certains gènes régulateurs du cycle cellulaire (Denissenko et al., 1996), il devient évident qu'en incitant les gens à diminuer leur consommation de tabac, il sera possible de diminuer grandement les taux d'incidence et de mortalité dus au cancer pulmonaire.

Il reste cependant que d'autres facteurs entrent en ligne de compte et qu'il n'est pas possible de modifier les habitudes de vie au point d'en éliminer le tabagisme à court terme. Considérant que malgré la diversification des modalités de traitement du cancer pulmonaire, le taux de survie après cinq ans est demeuré à peu près inchangé

(15%) au cours des trente dernières années (Frank, 1989), il devient primordial de déterminer quels sont les facteurs impliqués dans le développement des tumeurs.

Au cours des dernières décennies, plusieurs types d'évidence ont menés les chercheurs à conclure que la majorité de ces cancers sont liés au tabagisme. De maladie rare qu'il était au début de ce siècle, le cancer pulmonaire est aujourd'hui devenu l'une des principales causes de mortalité à l'échelle mondiale (Frank, 1989; Samet, 1993). Si on observe le patron épidémiologique du carcinome pulmonaire à l'échelle planétaire, on peut constater qu'il existe de grandes variations géographiques mais que ces variations sont généralement bien corrélées avec les taux de tabagisme existant dans la région (Coleman et al., 1993). Au cours des années 50 et 60 plusieurs études épidémiologiques ont montré de façon claire qu'il existait une corrélation entre le tabagisme et le cancer (Samet, 1993). Cependant, plusieurs variables viennent affecter les données relatives au tabagisme entre autres, l'âge à laquelle la personne a commencé à fumer, le sexe de la personne, le type de cigarettes fumées, la fréquence et la durée de consommation, l'inhalation et l'exposition (professionnelle ou non) à d'autres carcinogènes (Samet, 1993). Il faut donc tenir compte de toutes ces variables lors d'évaluations épidémiologiques du facteur de risque associé au tabagisme. Cependant, en plus de tous les facteurs directement liés à la consommation de tabac, d'autres facteurs viennent influencer le niveau de risque de développer une tumeur pulmonaire soit en l'augmentant ou en le diminuant.

1.2.2 Diète et nutriments

Sachant que la nourriture contient des nutriments susceptibles de favoriser ou de contrer le développement de tumeurs, plusieurs études se sont attardées à

l'évaluation du lien existant entre l'alimentation et le risque de développer des tumeurs pulmonaires. Des études épidémiologiques ont montré que la consommation de légumes et fruits contenant de la vitamine A et de la β -carotène permettait une diminution du risque de développer des tumeurs du poumon(résumé dans (Davila et Williams, 1993; Miller et Risch, 1989). Les effets de la vitamine A se feraient via la promotion de la différenciation tumorale alors que la β -carotène agirait plutôt à titre d'anti-oxydant (Miller et Risch, 1989). Il faut toutefois noter que toutes les études ne montrent pas les mêmes niveaux de protection associés à la consommation de ces nutriments. Certaines études ont montré que la consommation de vitamine A préformée (i.e. celle retrouvée dans les tissus animaux ou dans le lait) ne procurait pas de niveaux de protection comparables à ceux offerts par la vitamine A de source végétale (Samet, 1993). De hauts niveaux sériques de β -carotène ont été associés avec une diminution du risque de développer des tumeurs pulmonaires (ATBC Cancer Prevention Study Group, 1994; Hennekens et al., 1996; Omenn et al., 1996a). Suite à ces études d'association, plusieurs groupes se sont intéressés à déterminer l'effet de la β -carotène sur le risque de développer des tumeurs. Deux études majeures faites auprès de sujets à risque (fumeurs, anciens fumeurs et travailleurs exposés à l'amiante) ont montré une élévation du risque de développer un néoplasme pulmonaire lorsqu'on administre de la β -carotène au sujet (seule ou en combinaison avec de la vitamine A ou de l'alpha-tocopherol) (ATBC Cancer Prevention Study Group, 1994; Omenn et al., 1996a). Il faut toutefois noter que ces deux études ont été menées auprès de sujets à risque, principalement des fumeurs et que ce facteur exerce probablement une forte influence. Une analyse plus détaillée de ces études a d'ailleurs démontré que les augmentations notées dans le risque de développer un néoplasme pulmonaire étaient surtout limitées aux grands fumeurs (plus de 20 cigarettes/jour) et que ce risque était moindre chez ceux qui fument un moins grand nombre de cigarettes (Albanes et al., 1996; Omenn et al.,

1996b). D'autres études dont la principale est la Physician's Health Study n'ont montré aucun effet négatif ou positif de la prise de suppléments de β -carotène sur une période de 12 ans (Hennekens et al., 1996). Il faut toutefois noter que dans cette étude, contrairement aux deux autres citées plus haut, une faible proportion de sujets (11%) était des fumeurs (Hennekens et al., 1996). Goodman et ses collaborateurs ont par la suite mesuré les niveaux sériques de β -carotène chez les sujets de l'étude CARET (Goodman et al., 1996). Ils ont montré que de faibles niveaux de β -carotène sont associés au tabagisme. Les niveaux les plus bas sont observés avec une plus grande consommation de tabac et ils augmentent proportionnellement au nombre d'années sans tabac (Goodman et al., 1996). Il semblerait donc que chez les fumeurs une interaction entre les carcinogènes du tabac et la β -carotène puisse affecter le métabolisme de cette dernière si bien qu'elle ne puisse se retrouver au niveau sérique (Goodman et al., 1996). Les résultats de ces études montrent encore une fois que le tabagisme est un facteur important dans la tumorigénèse pulmonaire et suggèrent que les fumeurs devraient s'abstenir de prendre des suppléments de β -carotène (Albanes et al., 1996; Omenn et al., 1996b). Ainsi, il semble que la consommation de β -carotène et de vitamine A d'origine végétale procure les meilleurs effets de protection; il faut cependant considérer que les fruits et légumes consommés contiennent d'autres nutriments susceptibles de bloquer le développement tumoral (Samet, 1993).

Connaissant le rôle anti-oxydatif potentiel de plusieurs autres micro-éléments, certaines études ont tenté de mettre en évidence un rôle protecteur pour la vitamine C, la vitamine E et le sélénium mais aucune de ces études n'a réussi à mettre en évidence un effet marqué (Davila et Williams, 1993; ATBC Cancer Prevention Study Group, 1994; Samet, 1993).

1.2.3 Facteurs génétiques

Il a déjà été démontré que plusieurs cancers ont des composantes héréditaires importantes allant de la mutation d'un seul gène (polypose familiale) (Nishisho et al., 1991) ou de la perte d'un fragment de chromosome (e.g.: chromosome 13 dans le rétinoblastome hérité) (Benedict et al., 1983) jusqu'à une hérédité multigénique (Reddel et Harris, 1989). Des facteurs génétiques pourraient aussi influencer le développement d'un carcinome pulmonaire. Plusieurs études épidémiologiques ont démontré un risque accru de développer des tumeurs pulmonaires chez les gens dont un parent de premier degré a développé une tumeur à d'autres sites liés ou non au tabagisme (Lynch et al., 1981; Swift et al., 1980). De même, les parents de personnes ayant développé une tumeur pulmonaire courent un plus grand risque de développer une tumeur, ce qui suggère une composante génétique prédisposante chez différents individus (Lynch et al., 1986; Sellers et al., 1987). Ces études suggèrent l'existence d'une composante familiale héréditaire. L'environnement (incluant le tabagisme) pourrait aussi jouer un rôle en augmentant ou en atténuant l'effet génétique. En appui à l'hypothèse de la composante héréditaire, il a été démontré que certaines des altérations génétiques sont retrouvées dans la première et la seconde tumeur d'individus ayant plus d'un néoplasme primaire, même lorsque ces tumeurs sont formées dans deux organes distincts (Minna, 1989).

L'équilibre entre l'activation et la détoxification des carcinogènes est un processus crucial au cours de la tumorigénèse (Minna et al., 1997). L'activation métabolique des carcinogènes (dont ceux du tabac) se fait par les enzymes de phase I, les cytochromes P450, par la suite la détoxification des composés réactifs pro-mutagènes générés lors de la phase I se fait par des enzymes de phase II comme la Glutathione-S-Transférase, les hydrolases d'époxydes ou les sulfotransférases.

Certaines études montrent qu'il peut y avoir une variabilité héréditaire dans la balance entre ces deux fonctions métaboliques qui résulterait en un déséquilibre en faveur des mécanismes d'activation des carcinogènes.

Une de ces différences est illustrée par le métabolisme de la débrisoquine, métabolisme qui est déterminé génétiquement. Les études initiales faisaient état d'un risque jusqu'à six fois plus élevé de développer des tumeurs pulmonaires chez les individus ayant une forte capacité de métabolisation de la débrisoquine déterminée par un polymorphisme du gène CYP2D6 (Caporaso et al., 1990). De même, certaines études suggéraient que des différences entre individus existaient quant à la capacité de métaboliser les carcinogènes du tabac et que ces différences seraient liées au risque de développer un néoplasme pulmonaire (Hayashi et al., 1991; Kawajiri et al., 1990). Ces différences seraient liées à différents allèles du cytochrome P450A1 (CYP1A1) qui est une des enzymes impliquées dans l'activation et le métabolisme des carcinogènes dérivés du tabac (Minna, 1989; Zang et Wynder, 1996). Les résultats connus aujourd'hui pour ces polymorphismes sont toutefois conflictuels. Il semblerait que l'environnement puisse affecter le niveau de pénétrance des polymorphismes des cytochromes P450 dans la détermination du risque de développer un carcinome pulmonaire. Certaines études montrent une association entre les carcinomes pulmonaires et les polymorphismes alors que d'autres n'en montrent pas ou alors limitée seulement à des populations particulières (fumeurs légers, japonais...) (Benahmou et Bonaïti-Pellié, 1998).

Plus récemment, le métabolisme de l'acide rétinoïque a aussi été associé avec une élévation du risque de développer certaines tumeurs pulmonaires. Les études de Rigas et al. (1993) ont démontré que le catabolisme de l'acide rétinoïque est effectué par les cytochromes P450 et que celui-ci peut être modulé par des inhibiteurs comme

le kétaconazole. Leurs études ont démontré que le kétaconazole permet en fait de distinguer deux classes de catabolisme de l'acide rétinoïque soient rapide et lent (Rigas et al., 1993). Dans une étude plus récente, ces mêmes auteurs démontrent que le taux de catabolisme permet de déterminer un facteur de risque pour certains types histologiques de tumeurs pulmonaires (Rigas et al., 1996). Le catabolisme rapide de l'acide rétinoïque est associé avec le développement de tumeurs épidermoïdes ou à grandes cellules alors que le catabolisme très lent est plutôt associé avec des adénocarcinomes pulmonaires (Rigas et al., 1996). Dans cette étude, les sujets sains présentent des taux métaboliques intermédiaires entre ces deux classes (Rigas et al., 1996). Une mesure des taux plasmatiques d'acide rétinoïque a démontré que les cataboliseurs rapides ont des niveaux plus bas que les cataboliseurs lents. Plusieurs études ont déjà associé de faibles niveaux plasmatique d'acide rétinoïque avec un risque accru de développer un néoplasme pulmonaire (révisé dans Davila et Williams, 1993). Plusieurs études ont lié la perte d'expression d'un des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR β) avec les carcinomes épidermoïdes du poumon (Gebert et al., 1991; Houle et al., 1991; Nervi et al., 1991). Si les niveaux d'acide rétinoïque circulant sont faibles chez les métaboliseurs rapides, il y a moins d'acide rétinoïque disponible pour activer ces récepteurs, ce qui pourrait expliquer le développement préférentiel de tumeurs squameuses. Les résultats de Rigas et al. (1993, 1996) ont un impact important en regard des nombreuses études de chimioprévention car il faut désormais tenir compte de la capacité de l'individu à métaboliser l'acide rétinoïque. Ces résultats suggèrent aussi une influence génétique sur le développement de types histologiques particuliers de néoplasmes. Une ré-évaluation des études de polymorphisme précédentes en fonction des types histologiques pourrait peut-être apporter de nouvelles informations sur les influences génétiques impliquées dans le développement des néoplasmes pulmonaires.

Les enzymes de phase II contribuent aussi à la détermination du facteur de risque pour le cancer pulmonaire. Un polymorphisme pour la Glutathione-S-Transferase M1, qui est une enzyme de détoxification des carcinogènes du tabac, suggère la présence d'un facteur de risque génétique dans le cancer pulmonaire. Les individus possédant l'allèle GSTM1*0 (allèle nul suite à une délétion) présentent un risque plus élevé de développer une tumeur que ceux présentant un autre polymorphisme de cette enzyme (GSTM1*A, B ou C) (Nazar-Stewart et al., 1993). D'autres enzymes de phase II ont aussi été associées avec une élévation du risque de développer un carcinome pulmonaire.

1.2.4 Sexe

Des différences liées au sexe des patients ont aussi été observées au cours de plusieurs études. Il semble que les femmes aient un risque de 1.5 à 2 fois plus élevé de développer une tumeur pulmonaire que les hommes (Ryberg et al., 1994; Zang et Wynder, 1996). Zang et Wynder (1996) suggèrent, en se basant sur des études animales, que cette différence serait attribuable à une variation dans les niveaux d'activité du cytochrome P450 entre hommes et femmes car il semble que les hormones sexuelles influencent les niveaux de cytochrome P450 (références dans Zang et Wynder, 1996). A l'appui de cette hypothèse une étude a démontré que les femmes recevant des suppléments d'oestrogène ont un risque supérieur de développer une tumeur pulmonaire comparativement aux femmes qui ne reçoivent pas ces suppléments et que le tabac et l'oestrogène ont des effets synergiques sur le développement des tumeurs (Taioli et Wynder, 1994). Ryberg et al. (1994) quant à eux suggèrent qu'il existe une différence entre les deux sexes quant à la susceptibilité aux dommages à l'ADN causés par les hydrocarbures aromatiques

polycycliques (HAP). Les deux hypothèses sont toutefois compatibles avec les modèles impliquant le métabolisme des carcinogènes par les enzymes de phase I et II qui constituent un facteur de risque pour le cancer pulmonaire.

1.2.5 Histoire médicale

L'histoire médicale d'une personne peut avoir un effet important sur le développement de tumeurs au cours de son existence, plusieurs maladies ayant été décrites comme favorisant le développement de celles-ci. Plusieurs études ont montré que les patients souffrant de maladies obstructives pulmonaires chroniques (bronchites, pneumonies, emphysème) ont un risque accru de développer des tumeurs pulmonaires (Minna, 1989; Osann, 1991; Reddel et Harris, 1989). Cohen a émis l'hypothèse selon laquelle la dysfonction pulmonaire permettrait une plus forte concentration des toxines et carcinogènes dans le poumon et contribuerait ainsi à augmenter le risque de développer une tumeur (Cohen, 1978).

1.2.6 Exposition professionnelle

Finalement, l'activité professionnelle peut aussi avoir un fort impact sur la probabilité de développer des tumeurs pulmonaires. L'exposition à la fumée secondaire dans les milieux de travail a longtemps présenté un facteur de risque mais l'instauration de politiques plus sévère limitant le tabagisme dans les lieux de travail favorisera certainement une diminution du risque attribuable à ce facteur. L'amiante est un des carcinogènes en milieu de travail qui a été le plus fréquemment étudié. De très fortes corrélations ont pu être établies entre le cancer pulmonaire et l'exposition prolongée à ce carcinogène (pour revue voir Davila et Williams, 1993; Frank, 1989;

Mooi, 1996). D'autres composés sont aussi reconnus comme carcinogènes en milieu de travail soient l'arsenic, le benzène, le béryllium, les éthers de chromométhyl, les dérivés du chrome, le nickel, l'uranium ainsi que les radiations (Frank, 1989; Mooi, 1996). Dans tous ces cas, l'instauration de politiques et d'habitudes de travail limitant l'exposition des travailleurs à ces carcinogènes est nécessaire afin de réduire les cancers contractés en milieu de travail.

Bien que le risque de développer une tumeur pulmonaire puisse être de diverses natures, il semble que le tabagisme demeure la principale cause et qu'il a souvent un effet synergique avec les autres facteurs. La prévention du tabagisme demeure donc un objectif souhaitable mais elle doit être soutenue par un effort de compréhension des processus de cancérisation et de suppression de ces tumeurs.

1.3 Principaux types histologiques de tumeurs pulmonaires

Il existe une vaste gamme de néoplasmes primaires bénins et malins qui peuvent se développer dans les bronches et le parenchyme pulmonaire. On estime que 90% de ces tumeurs sont des carcinomes i.e. des tumeurs dérivées de l'épithélium pulmonaire (Gould et Warren, 1989). Au fil des ans, le développement de nouveaux marqueurs histopathologiques a grandement facilité la classification des tumeurs si bien qu'aujourd'hui, on reconnaît quatre grands types histologiques de carcinomes pulmonaires (carcinomes épidermoïdes, adénocarcinome, carcinomes à grandes cellules et tumeurs à petites cellules) regroupés en deux classes, soient les tumeurs à petites cellules ou SCLC par opposition aux tumeurs non-SCLC (NSCLC) qui regroupent les trois autres types histologiques (Tableau I) (WHO, 1982). Ce regroupement se fait sur la base de caractères tumoraux définis comme la possibilité de résection de la tumeur, la croissance de la tumeur et la sensibilité à la

radiothérapie et à la chimiothérapie (Gould et Warren, 1989; WHO, 1982). Nous nous attarderons, au cours des prochaines sections, à définir les principales caractéristiques morphologiques et biologiques de ces différents types histologiques.

1.3.1 Carcinomes pulmonaires NSCLC

1.3.1.1 Carcinomes épidermoïdes

Les tumeurs pulmonaires épidermoïdes (ou squameuses) forment l'un des types histologiques les plus fréquents (Tableau I). Ce carcinome est plus fréquent chez l'homme que chez la femme où c'est l'adénocarcinome qui prédomine (Gould et Warren, 1989). Le carcinome épidermoïde est le type histologique le mieux associé au tabagisme.

Ces tumeurs surviennent généralement dans les grosses bronches, elles sont considérées comme étant centrales à l'arbre pulmonaire (Ginsberg et al., 1997; Gould et Warren, 1989; Mooi, 1996). Les bronches touchées montrent fréquemment des zones d'atypie cytologique et architecturale qui seraient un reflet des changements pré-néoplasiques multifocaux induits par le tabac (Mooi, 1996).

Les tumeurs épidermoïdes apparaissent à la surface de la muqueuse pulmonaire sous forme d'amas de cellules épithéliales présentant une différenciation squameuse prononcée (Gould et Warren, 1989; Mooi, 1996). La croissance de ces tumeurs est généralement lente comparativement aux autres tumeurs pulmonaires (Ginsberg et al., 1997).

TABLEAU I Carcinomes pulmonaires: Principaux types histologiques et incidences relatives.

Classe	Type Histologique	Incidence^a
NSCLC		75%
	Carcinomes épidermoïdes	30%
	Adénocarcinomes	40%
	Carcinomes à grandes cellules	5%
SCLC		20%
Autres		5%

^a Les incidences sont tirées de Mooi (1996)

Les tumeurs épidermoïdes apparaissent à la surface de la muqueuse pulmonaire sous forme d'amas de cellules épithéliales présentant une différenciation squameuse prononcée (Gould et Warren, 1989; Mooi, 1996). La croissance de ces tumeurs est généralement lente comparativement aux autres tumeurs pulmonaires (Ginsberg et al., 1997).

Les cellules de la tumeur sont arrondies avec un cytoplasme abondant à caractère éosinophile (Gould et Warren, 1989). Le noyau est généralement volumineux et d'aspect irrégulier, le nucléole est aisément détectable mais non proéminent et les mitoses apparaissent abondantes à l'examen histologique (Gould et Warren, 1989; Mooi, 1996). Ces cellules sont généralement liées par des pont intercellulaires et montrent souvent une forte kératinisation (Gould et Warren, 1989; Mooi, 1996).

L'utilisation de techniques immunohistochimiques a permis une meilleure définition des différents types de carcinomes pulmonaires. Les carcinomes squameux sont caractérisés par l'expression de marqueurs de la différenciation squameuse (Gould et Warren, 1989). Les cellules épidermoïdes réagissent fortement contre des anticorps anti-desmoplakine montrant la présence abondante de plaques desmosomales (Mooi, 1996). De même, les cellules des tumeurs épidermoïdes réagissent à des niveaux variables contre différents anticorps contre les cytokératines. Certaines de celles-ci sont caractéristiques de l'épithélium stratifié alors que d'autres sont plutôt typiques de l'épithélium simple. Les kératines 5, 6, 8, 13, 17, 18 et 19 sont exprimées dans la majorité des carcinomes épidermoïdes alors que les kératines 4, 14 et 15 se retrouvent en quelques occasions (Gould et Warren, 1989; Mooi, 1996).

1.3.1.2 Adénocarcinomes pulmonaires

Ce type histologique est aujourd'hui le plus fréquent avec 40% des cas (Tableau I). Alors qu'auparavant, le carcinome épidermoïde représentait la majorité des cas, on observe actuellement une incidence croissante pour l'adénocarcinome alors qu'il y a diminution de l'incidence pour les autres types histologiques. Cette croissance reflèterait l'augmentation du nombre de cancer chez la femme où ce type est prédominant contrairement à l'homme où le carcinome épidermoïde demeure le plus fréquent (Mooi, 1996).

Ces tumeurs se présentent en masses rondes et irrégulières d'apparence mucoïde (Gould et Warren, 1989). Elles présentent une différenciation glandulaire caractérisée par la présence de structures tubulaires ou papillaires ou encore par la production de mucines (Gould et Warren, 1989). Ces tumeurs peuvent être subdivisées selon le type de structures formées (Ginsberg et al., 1997; WHO, 1982). Ce sont des tumeurs généralement localisées en périphérie de l'arbre pulmonaire (Mooi, 1996).

Les cellules de ces tumeurs sont relativement grosses et ont un cytoplasme clair. Le nucléole est proéminent et leur activité mitotique est variable selon les zones tumorales observées (Gould et Warren, 1989). En immunohistochimie, ces tumeurs sont liées par des anticorps caractéristiques des cellules exocrines (Gould et Warren, 1989). Il y a présence de plaques desmosomales tel que mis en évidence par des anticorps anti-desmoplakine et expression des cytokératines de l'épithélium simple (cytokératines 7, 8, 18, 19 et 23) (Gould et Warren, 1989). En fait, l'absence d'expression de la cytokératine 14 et la présence de la kératine 7 sont caractéristiques de ces tumeurs (Mooi, 1996). Au fil des ans, plusieurs autres

anticorps ont été développés pour permettre le diagnostic différentiel des adénocarcinomes pulmonaires.

1.3.1.3 Carcinomes pulmonaires à grandes cellules

Ces tumeurs forment un groupe très hétérogène dépourvu de caractéristiques précises représentant environ 5% des cas de tumeurs pulmonaires (Tableau I). L'identification de ces cellules est en fait basée sur cette absence de caractères, le diagnostic étant fait sur l'absence de critères de différenciation squameuse, glandulaire ou neuroendocrine (Mooi, 1996). Ce sont des tumeurs solides, généralement localisées en périphérie pulmonaire et présentant parfois de la nécrose (Gould et Warren, 1989). Les cellules tumorales sont grosses (50µm, d'où le nom des tumeurs). Le noyau est central à la cellule, le cytoplasme est très abondant et légèrement éosinophile. Le nucléole est proéminent et les mitoses sont fréquentes dans les tumeurs (Gould et Warren, 1989).

Il est intéressant de noter que 20 à 40% des tumeurs à grandes cellules montrent aussi des caractéristiques neuroendocrines similaires aux SCLC et que 50% d'entre elles ont un phénotype exocrine (Gould et Warren, 1989). Les tumeurs à grandes cellules expriment généralement les cytokératines de l'épithélium simple (les mêmes que les adénocarcinomes et les tumeurs SCLC) mais un sous-groupe exprime aussi les kératines caractéristiques des tumeurs épidermoïdes (Gould et Warren, 1989). Il s'agit donc d'un groupe de tumeurs très hétérogène ne possédant pas de critères de différenciation bien définis mais identifiables par l'absence de réactivité contre la plupart des anticorps utilisés pour démontrer le caractère squameux, glandulaire ou neuroendocrinien des tumeurs.

1.3.2 Carcinomes pulmonaires SCLC

1.3.2.1 Carcinomes pulmonaires à petites cellules

Ce groupe histologique représente environ 20% des cas de cancer pulmonaire et est souvent associé au tabagisme. Ce sont essentiellement des tumeurs épithéliales qui expriment des marqueurs neuroendocriniens tels des neurotransmetteurs, des modulateurs paracriniens et des hormones (Gould et Warren, 1989; Mooi, 1996). Ce sont des tumeurs centrales généralement localisées près de l'hile pulmonaire qui présentent une bonne réponse initiale aux traitements de chimio- et de radiothérapie (Mooi, 1996); elles sont cependant très métastatiques (Gould et Warren, 1989). Elles n'ont pas de patron architectural bien défini mais présentent fréquemment une nécrose centrale massive (Gould et Warren, 1989; Mooi, 1996).

Ces tumeurs sont formées de petites cellules fusiformes à noyau pléomorphe et hyperchromatique (Gould et Warren, 1989). Elles présentent peu de cytoplasme et ont un cytosquelette peu développé (Gould et Warren, 1989; Mooi, 1996). En microscopie électronique, on peut observer la présence de granules de sécrétion denses qui sont en fait l'appareil de synthèse de nombreux amines biogènes. Ceux-ci sont présents dans les cellules de type APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) qui sont des cellules neuroendocrines. Ces granules sont aussi nécessaires à l'élaboration de nombreux peptides hormonaux et de facteurs de croissance (Ihde et al., 1997).

En immunohistochimie, on a remarqué que les cellules SCLC expriment les protéines des neurofilaments ainsi que les cytokératines 8, 18 et 19 (Gould et Warren, 1989) et que l'expression de desmoplakine est rare, reflétant la désorganisation de la tumeur (Mooi, 1996). Ces tumeurs sécrètent toutefois une

variété de neuropeptides et de facteurs de croissance dont certains pourraient contribuer de façon autocrine à la croissance de la tumeur (Minna et al., 1997). Parmi ces peptides, certains se sont avérés être des marqueurs spécifiques aux tumeurs à petites cellules. Ce sont la L-Dopa décarboxylase (L-DDC) qui est essentielle au phénotype APUD, l'isoenzyme BB de la créatine kinase (CK-BB), l'énolase spécifique aux neurones (NSE) et le "gastrin-releasing peptide" (GRP) (Carney et al., 1985). En se basant sur l'expression de ces marqueurs dans différentes lignées établies à partir de tumeurs SCLC, Gazdar et al. ont pu établir une subdivision des lignées SCLC en SCLC dites "classiques" et "variantes" (Gazdar et al., 1985).

1.3.2.1.1 Les SCLC classiques

Ce type représente environ 70% des lignées SCLC établies. Les cellules de cette catégorie croissent sous forme d'agrégats flottants relativement sphériques et présentent une faible efficacité de clonage en agar mou (Gazdar et al., 1985). De plus, elles ont une croissance lente par rapport aux SCLC variantes (Gazdar et al., 1985). Ces cellules expriment les quatre marqueurs spécifiques des tumeurs SCLC (Tableau II) (Gazdar et al., 1985; Ihde et al., 1997).

1.3.2.1.2 Les SCLC variants

Les SCLC variants représentent seulement 30% des tumeurs à petite cellules. Par rapport aux cellules de type classique elles présentent une plus forte résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Ces cellules sont caractérisées par une forte concentration de CK-BB et une expression plus faible de NSE mais la principale

différence réside dans le fait qu'elles n'expriment pas la L-DDC et le GRP (Tableau II) (Vinocour et Minna, 1989). Les cellules SCLC variantes sont aussi caractérisées par l'amplification et/ou l'expression abondante du gène MYC (Little et al., 1983). Ces cellules ont un temps de doublement plus court que les classiques et sont facilement clonables en agar mou. En culture, elles formeront des amas irréguliers (Gazdar et al., 1985). Plusieurs auteurs croient que les cellules SCLC variantes en culture correspondraient aux tumeurs SCLC à histologie mixte à grandes cellules chez le patient qui présentent des caractéristiques semblables de croissance et de réponse aux traitements (Carney et De Leij, 1988; Gazdar et al., 1988; Ihde et al., 1997).

Bien entendu, il existe aussi plusieurs autres types de tumeurs pulmonaires très peu fréquents qu'il serait cependant superflu de décrire ici .

TABLEAU II Marqueurs biochimiques associés aux principaux types de carcinomes pulmonaires.

Marqueur	SCLC Classique	SCLC Variant	NSCLC
L-DDC	+	-	-
GRP	+	-	-
CK-BB	+	++	-
NSE	+	+	-

1.4 Biologie des tumeurs pulmonaires

Le développement des tumeurs cancéreuses est le résultat du bouleversement des processus normaux des cellules. Ces changements dans la physiologie cellulaire normale sont généralement le résultat de modifications du génome de la cellule. Ces altérations peuvent être des changements structuraux majeurs visibles en microscopie optique comme des pertes ou des gains de chromosomes ou de parties de chromosomes, des translocations et des amplifications d'unités génétiques (Nowell, 1991). Les altérations peuvent aussi être submicroscopiques comme des mutations ponctuelles, des délétions, des duplications ou d'autres réarrangements allant jusqu'à des altérations du patron de méthylation de l'ADN (Nowell, 1991). On considère généralement qu'il faut plusieurs événements génétiques et/ou épigénétiques majeurs pour mener au développement d'une tumeur, ce qui en fait un processus séquentiel (Minna et al., 1997; Vogelstein et Kinzler, 1993).

Parmi les mutations génétiques acquises au cours de la progression vers le phénotype tumoral, plusieurs sont communes à différentes néoplasies humaines alors que d'autres sont spécifiques à certaines tumeurs. Ainsi, les découvertes en matière de carcinogénèse qui sont effectuées dans un système tumoral particulier sont souvent applicables à d'autres types de tumeurs d'origine histologique différente. Au fil des ans, les techniques de biologie moléculaire se sont perfectionnées, permettant une analyse raffinée des événements qui surviennent dans les cellules tumorales.

1.4.1 Anomalies chromosomiques des tumeurs pulmonaires

L'étude de l'ADN contenu dans les cellules des carcinomes pulmonaires a révélé que 85% des cellules tumorales sont aneuploïdes; leur contenu en ADN variant de l'hypoploïdie à la tétraploïdie (Carney, 1991). L'analyse cytogénétique raffinée des tumeurs pulmonaires a permis de détecter des anomalies chromosomiques récurrentes, permettant ainsi de soupçonner la présence de gènes qui sont altérés ou délétés. Toutefois, l'identification de régions chromosomiques perdues par délétion interstitielle ou par translocation non-réciproque n'est que le premier pas dans l'identification de gènes impliqués dans la tumorigénèse. Les analyses de polymorphisme permettent de circonscrire des régions mieux définies de perte chromosomique. L'analyse PLFR fait appel à des sondes d'ADN pour détecter des régions spécifiques des chromosomes. Chez un individu hétérozygote, une sonde devrait détecter deux fragments de différentes longueur pour la même région chromosomique toutefois si, dans la tumeur, un des deux chromosomes a subi une délétion, la sonde ne détectera qu'un seul fragment dans l'ADN tumoral; on appelle ce phénomène "perte d'hétérozygotie" (LOH) (Lewin, 1994). Les analyses de PLFR (faisant appel à des enzymes de restriction) et l'amplification par PCR de marqueurs chromosomiques polymorphiques sur des échantillons de tumeurs pulmonaires ont permis de détecter des régions chromosomiques précises qui sont fréquemment perdues dans ces tumeurs (Tableau III) (révisé dans Minna et al., 1997). Comme nous le verrons plus loin, certains des gènes cartographiés dans ces régions ont une implication potentielle dans la cancérogénèse pulmonaire.

TABLEAU III: Régions chromosomiques fréquemment altérées dans les tumeurs pulmonaires par délétions et translocations non-réciproques.

Chromosome	Région chromosomique ^a
1	p, q1, q3
3	p12-13, p14.2 (gène FHIT) p21.3, p24-26
5	q (gènes APC et MCC)
8	p
9	p21 (gène p16)
11	p13, p15
13	q14 (gène RB)
17	p13 (gène p53)
22	q

^a Les lettres "p" et "q" désignent les bras chromosomiques court et long respectivement. Les chiffres suivant les lettres indiquent les subdivisions de chaque bras, 1 étant le plus proximal.

^b Tiré de Minna et al., 1997.

1.4.2 Oncogènes

Depuis l'identification du rôle du gène *V-SRC* dans la transformation cellulaire, la recherche en biologie moléculaire a permis l'identification de nombreux autres gènes qui sont impliqués dans l'oncogénèse, d'y définir leur rôle particulier et de déterminer leur mode d'action. Ces gènes étant impliqués de façon directe dans le développement de tumeurs, on nomme "oncogènes" les versions altérées ou mutées des contreparties cellulaires normales, qui sont nommées "proto-oncogènes" (Lewin, 1994).

De façon générale, les proto-oncogènes sont des gènes qui ont un rôle à jouer dans la prolifération et la différenciation normale des cellules. Ces gènes ont une activité contrôlée dans la cellule normale, c'est-à-dire qu'ils sont actifs à certains moments du cycle cellulaire alors qu'à d'autres moments leur activité n'est pas détectable. Suite à l'acquisition de mutations, deux possibilités se présentent; soit que les oncogènes sont activés de façon constitutive (oncogènes dominants) soit qu'ils deviennent non-fonctionnels (gènes suppresseurs). Les mutations affectant ces deux types d'oncogènes semblent impliquées de façon collaborative dans les processus de cancérisation (Bishop, 1991). Une troisième classe de gènes est fréquemment altérée dans les tumeurs humaines, il s'agit des gènes "mutator" qui sont impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome.

1.4.2.1 Les oncogènes dominants

L'activation des oncogènes dominants ne nécessite la mutation que d'une seule des deux copies du gène, ce qui se traduit généralement par un gain de fonction. Ces oncogènes sont activés par différents mécanismes; soit par mutation ponctuelle, par

surexpression, par amplification génétique ou par réarrangement chromosomique. Un oncogène peut subir une mutation dans la séquence codante, résultant en un changement d'acide aminé ou une troncation du produit protéique, ce changement peut conduire à une activation constitutive de la protéine suite à la perte d'un site de régulation de l'activité protéique. Outre cette mutation à un site régulateur, la protéine conserve généralement sa fonction normale, ce qui lui permet de jouer un rôle dans la prolifération et la différenciation des cellules cancéreuses. D'autre part, cette mutation peut survenir dans les régions promotrices du proto-oncogène et causer une surexpression de la protéine suite à la perte d'un site régulateur de transcription. Cette surexpression protéique amène une activité constante dans la cellule et un dérèglement de la physiologie normale des cellules. La séquence d'ADN codant pour un proto-oncogène peut être amplifiée à l'intérieur du génome cellulaire, on parle alors d'amplification génique. La cellule se retrouve ainsi avec un surnombre de cette protéine et une activité accrue. Finalement, les réarrangements chromosomiques peuvent causer une expression aberrante d'un oncogène en le plaçant sous le contrôle de régions promotrices fortes ou encore créer un produit de fusion où deux gènes se retrouvent accolés, créant ainsi un mutant fonctionnel (e.g.: PML-RAR α , bcr-abl) (Kakizuka et al., 1991; Walker et al., 1987).

Depuis le début des années 80, plusieurs oncogènes dominants ont été identifiés comme étant activés dans les tumeurs pulmonaires. Pour plusieurs d'entre eux, le mode d'activation est aujourd'hui connu même si leur rôle précis dans la tumorigénèse pulmonaire reste à préciser alors que pour certains autres, au contraire, les nombreuses études de biologie moléculaire des dernières années ont permis de bien définir leur mode de participation à la tumorigénèse (Bergh, 1990; Carney et Sikora, 1990; Minna, 1993; Minna et al., 1997).

1.4.2.1.1 Les voies de signalisation cellulaire

Les voies de signalisation cellulaires sont formées par une chaîne complexe de protéines interagissant entre elles via différents mécanismes afin de transmettre un signal provenant de la surface cellulaire au cytoplasme ou au noyau et ainsi activer certains processus cellulaires spécifiques. Le signal extracellulaire est généralement intégré à la surface externe par un récepteur membranaire, possédant une activité de protéine kinase, qui ainsi activé par son ligand transmet le signal à une cascade de protéines intracytoplasmiques qui vont à leur tour le transmettre au noyau ou à des protéines effectrices. Les altérations de la voie de signalisation peuvent donc se faire à différents niveaux.

1.4.2.1.2 Les récepteurs membranaires

Quelques récepteurs membranaires ont été décrits comme ayant subi des altérations dans les tumeurs pulmonaires. Ces récepteurs ont souvent une activité tyrosine kinase impliquée dans la transmission du signal de la membrane vers le cytoplasme (Minna et al., 1997). La surexpression ou la présence de mutations activatrices de ces protéines peut donc altérer les voies de signalisation.

Les récepteurs ERB B1 (récepteur du EGF) de la famille ERB sont surexprimés dans les tumeurs NSCLC mais moins fréquemment dans les SCLC (Cerny et al., 1986) tandis que le récepteur ERB B2 de la même famille est surexprimé dans un tiers des tumeurs NSCLC où il a été associé à une courte survie des patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires (Weiner et al., 1990). Le récepteur KIT et son ligand, le "stem cell factor", sont exprimés dans les tumeurs SCLC créant ainsi une

boucle autocrine favorisant la croissance des cellules tumorales (Sekido et al., 1993).

Le signal généré à la surface et intégré par le récepteur est ensuite transmis, via des phosphorylations, à des protéines cytoplasmiques faisant partie d'une cascade de signalisation. Les gènes de la famille RAS reçoivent le signal des récepteurs par l'intermédiaire des molécules GRB et SOS et vont ensuite le transmettre à des protéines effectrices (Avruch et al., 1994)

1.4.2.1.3 La famille RAS

Les gènes RAS (HRAS, KRAS et NRAS) codent pour des protéines liant la guanosine triphosphate ("GTP binding proteins") et sont généralement activés par des mutations ponctuelles aux codons 12, 13 et 61 (Bos, 1989). Ainsi, de 15 à 20% des tumeurs NSCLC portent une mutation à un des gènes RAS, ce taux allant jusqu'à 35% pour les adénocarcinomes pulmonaires (Bos, 1989). On estime que 90% des mutations de RAS sont dans le gène KRAS, desquelles 85% sont au codon 12 (Minna et al., 1997). La majorité de ces mutations (~70%) sont des transversions de guanosine à thymidine représentant le type de dommage généré par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou des nitrosamines qui sont les principaux carcinogènes du tabac (Minna et al., 1997; Prahald et al., 1997). Certains auteurs ont d'ailleurs corrélié les mutations de KRAS dans les tumeurs pulmonaires avec la consommation de tabac (Kobayashi et al., 1990; Westra et al., 1993).

1.4.2.1.4 Les effecteurs de RAS

Les molécules immédiatement en aval de RAS comprennent plusieurs protéines kinases parmi lesquelles on note RAF-1, les protéines de la famille MEKK, les MEK ("MAP kinase/ERK-activating Kinases) et les MAP kinases. Ces protéines font présentement l'objet d'études quant à leur implication potentielle dans la carcinogénèse pulmonaire. Certains résultats montrent que les MEK ne seraient pas fréquemment altérées dans les tumeurs pulmonaires (Bansal et al., 1997). Ultiment, le signal relayé par ces effecteurs de RAS aboutira à l'activation de proto-oncogènes nucléaires ou d'effecteurs cellulaires.

1.4.2.1.5 La famille MYC

Le produit des gènes de la famille de phosphoprotéines MYC (MYC, MYCL et MYCN) est impliqué dans le contrôle de la croissance en formant des hétérodimères avec les protéines de régulation transcriptionnelle MAX. Les protéines MAD sont impliquées dans la régulation négative de l'activité de MYC en formant des hétérodimères avec MAX et en compétitionnant pour les sites de liaison à l'ADN (Ayer et al., 1993). Ces hétérodimères contrôlent l'expression d'autres gènes impliqués dans la régulation de la croissance (Ayer et al., 1993). Le gène MYC est surexprimé (via des dysrégulations transcriptionnelles suite à des mutations, des translocations ou des amplifications géniques) dans les tumeurs SCLC et NSCLC alors que MYCL et MYCN sont amplifiés dans les tumeurs SCLC seulement (Bergh, 1990; Little et al., 1983; Nau et al., 1985; Richardson et Johnson, 1993). La surexpression des membres de la famille MYC amène alors un déséquilibre du contrôle de la croissance cellulaire et permet aux cellules tumorales une croissance inappropriée.

1.4.2.1.6 Autres oncogènes

Plusieurs autres oncogènes nucléaires (généralement des facteurs transcriptionnels) sont connus et peuvent être actifs dans les cellules des tumeurs pulmonaires (Minna et al., 1997). Ces oncogènes sont soit la cible directe des cascades de signalisation ou sont activés par d'autres régulateurs transcriptionnels. Leur rôle précis lors de la tumorigénèse pulmonaire reste cependant à déterminer.

1.4.2.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs

Dans le cas des gènes suppresseurs, il n'y a pas d'activation à proprement parler mais leur rôle dans l'oncogénèse vient plutôt d'une perte de fonction. Deux événements génétiques affectant chacun une copie du gène doivent se produire pour que cette perte de fonction ait lieu (Knudson, 1971). Le premier événement est généralement une mutation ponctuelle ou une délétion affectant une copie du gène dans les cellules germinales d'un des parents ou dans les cellules somatiques de l'individu affecté. Cette mutation est transmise et présente dans toutes les cellules somatiques de l'enfant dans le cas d'une mutation héritée ou dans toutes les cellules-filles dans le cas d'une mutation somatique. Par la suite, une de ces cellules somatiques subira une mutation dans la seconde copie du gène. Donc, dans les cas où aucune mutation n'est héritée, deux événements mutationnels devront survenir. Ces événements peuvent être de différentes natures, génétiques (par exemple: délétion, mutation d'un site actif pour le rendre inactif, mutation d'un codon en codon d'arrêt et troncation de la protéine, mutation du promoteur et perte d'expression) ou épigénétiques (par exemple: méthylation du promoteur et perte d'expression). La cellule ainsi mutée se retrouve donc sans la protéine ou avec une protéine qui est inactive suite aux mutations (Minna, 1993). Le concept de

suppression tumorale provient donc du fait que la ré-introduction d'une copie normale du gène muté dans la cellule amène fréquemment une résorption totale ou partielle du phénotype transformé.

Les études de perte d'hétérozygotie telles que celles que nous avons décrites plus haut suggèrent la présence de gènes suppresseurs de tumeurs sur certains chromosomes (voir Tableau III). Parmi les gènes susceptibles d'être localisés dans ces régions, plusieurs ont été identifiés. Les études effectuées sur le système de tumeurs pulmonaires ont permis de lever le voile sur leur implication mais dans d'autres cas, les gènes ne sont toujours pas identifiés. Nous nous attarderons, au cours des prochaines sections à la description du rôle de certains d'entre eux.

1.4.2.2.1 Le gène du rétinoblastome (RB)

Comme nous l'avons mentionné auparavant, les découvertes en matière de tumorigénèse sont souvent transférables d'un système tumoral à un autre. Ainsi, le gène du rétinoblastome (RB), qui a servi à établir le concept de gène suppresseur, est fréquemment altéré dans les tumeurs pulmonaires. Ce gène est localisé dans la région q14 du chromosome 13 qui montre fréquemment des pertes d'hétérozygotie (Cavenee et al., 1983).

Le gène RB code pour une phosphoprotéine de 105 kD impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire (Buchkovich et al., 1989). La protéine RB contrôle, par son association avec des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines (CDK), l'entrée des cellules en phase de synthèse au cours de la mitose. La protéine RB hypophosphorylée bloque la progression du cycle cellulaire en séquestrant le facteur E2F (Chellappan et al., 1991). La cycline D1 stimule la phosphorylation de

RB par la CDK4, ce qui inactive RB qui relâche E2F et permet l'entrée de la cellule en phase S. Plusieurs autres protéines aussi sont impliquées dans le contrôle de ce processus (Minna et al., 1997; Richardson et Johnson, 1993).

Des études ont montré que les personnes ayant hérité d'une délétion d'une copie de RB, donc susceptibles de développer un rétinoblastome présentent un risque accru de former une tumeur pulmonaire (Sanders et al., 1989). Plusieurs études ont montré que RB présentait des anomalies d'expression (absence) ou de structure dans les tumeurs pulmonaires. On a ainsi montré que 90% des tumeurs SCLC et 30% des NSCLC avaient subi une inactivation de RB (Minna et al., 1997; Reissmann et al., 1993; Xu et al., 1991). Le faible taux d'inactivation de RB dans les tumeurs de type NSCLC suggère qu'il existe d'autres mécanismes d'inactivation du point de contrôle G1/S du cycle cellulaire dans ces tumeurs. Ces mécanismes d'inactivation impliqueraient en fait les autres protéines dont nous avons fait mention plus haut, soient les cyclines, les kinases dépendantes des cyclines (CDK) et les inhibiteurs de CDK.

Une étude montre que dans les SCLC où RB est inactivé, les niveaux de cycline D1 sont faibles. Par contre, dans les NSCLC où RB est normal, il y a surexpression de cycline D1 ce qui permettrait le passage en phase S par inactivation physiologique de RB via cette cycline D1 (Schauer et al., 1994). Une voie alternative d'inactivation de RB serait d'altérer un inhibiteur de la CDK4, p16^{INK4} (CDKN2), ce qui permettrait à la CDK4 de phosphoryler RB et ainsi favoriser la transition G1/S.

1.4.2.2.2 p16^{INK4}

Le gène codant pour l'inhibiteur de CDK4, p16^{INK4} (CDKN2), est situé en 9p21, une région qui est fréquemment altérée dans les tumeurs pulmonaires (Center et al., 1993; Merlo et al., 1994). Il a été démontré que p16 est inactivé de multiples façons dans les tumeurs NSCLC (délétions, mutations ou méthylation des régions promotrices) (Merlo et al., 1995; Shapiro et al., 1995) mais très rarement dans les tumeurs SCLC, ce qui tend à confirmer que les tumeurs utilisent une voie ou l'autre d'inactivation de la transition G1/S contrôlée par RB.

1.4.2.2.3 p53

Le gène p53 est un des gènes les plus fréquemment altéré dans les tumeurs humaines (Greenblatt et al., 1994). La protéine p53 remplit deux rôles majeurs dans la cellule, soient le contrôle du cycle cellulaire (Kastan et al., 1991) et de l'apoptose (Lowe et al., 1993) en réponse aux dommages à l'ADN ou à d'autres facteurs de stress. La protéine est généralement présente à de très faibles niveaux dans les cellules mais peut être induite par une augmentation des niveaux transcriptionnels ou de sa demi-vie (Soussi et al., 1998). L'accumulation de p53 dans la cellule dirigera celle-ci vers deux voies distinctes dépendantes du contexte, l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire. La protéine p53 possède une fonction de régulation transcriptionnelle contrôlant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'apoptose, BAX, IGF-BP3 et FAS (Harris, 1996). Suite à l'induction de ces gènes, la cellule est dirigée dans la voie apoptotique. On parle alors d'apoptose dépendante de la transcription (Harris, 1996). L'accumulation de p53 en réponse à des dommages cellulaires peut aussi induire l'expression d'autres gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Pietenpol et al., 1994).

Le gène p21^{WAF1} est induit par p53 et produit un inhibiteur des cyclines dépendantes des kinases (CDKs), ce qui amène un blocage du cycle cellulaire en G1. Suite à ce blocage la machinerie de réparation et de réplication de l'ADN sera activée sinon la cellule sera dirigée vers l'apoptose si les dommages ne peuvent être réparés (Harris, 1996). En plus de ses capacités transactivatrices, p53 et les protéines induites par celle-ci (GADD45, p21^{WAF1}) peuvent interagir avec des protéines responsables de la transcription, de la réplication ou de la réparation de l'ADN. Suite à ces interactions et en fonction des dommages subis par la cellule, celle-ci peut voir son cycle bloqué en G1 et l'ADN sera réparé ou la cellule sera dirigée dans la voie apoptotique (apoptose indépendante de la transcription) (Harris, 1996).

Le gène codant pour p53 est localisé dans la région p13 du chromosome 17 dont une copie est fréquemment altérée dans les tumeurs pulmonaires (Takahashi et al., 1989). Suite à la délétion d'une copie, il y aurait inactivation mutationnelle de la seconde copie dans 90% des SCLC et 50% des NSCLC (Chiba et al., 1990; Kishimoto et al., 1992; Minna et al., 1997). Les mutations de p53 sont fréquemment associée au tabagisme (Greenblatt et al., 1994). Les transversions G à T sont les mutations les plus fréquemment observées (Soussi et al., 1998) et il a été démontré que le benzo [a] pyrene, un des composés de la fumée de tabac, pouvait induire ce type de mutations (Denissenko et al., 1996). Il pourrait donc y avoir un lien direct entre la consommation de tabac et les mutations du gène p53.

La plupart des mutations (environ 90%) sont localisées dans la région codant le domaine de liaison à l'ADN (Soussi et al., 1998) ce qui altère les propriétés de régulation transcriptionnelle. La mutation du gène p53 peut donc conférer un avantage sélectif aux cellules mutées. La dysrégulation des voies normalement sous contrôle de p53 (arrêt du cycle cellulaire en G1, réparation et réplication de

l'ADN et apoptose) permettent à la cellule de proliférer même en présence de dommages à l'ADN. Au fil des réplifications, il y a accumulation de dommages, créant une instabilité génétique qui favorisera l'émergence de nouvelles mutations.

1.4.2.2.4 Chromosome 3p

Au début des années 1980, Whang-Peng et ses collaborateurs ont démontré, par études de perte d'hétérozygotie, qu'un des événements génétiques les plus souvent associé avec la formation de tumeurs pulmonaires est la délétion de sections du bras court du chromosome 3 (3p) (Whang-Peng et al., 1982). D'autres études ont par la suite précisé les régions affectées par la perte d'hétérozygotie si bien qu'aujourd'hui on reconnaît au moins trois régions susceptibles de contenir un gène suppresseur dont l'inactivation serait impliquée dans la tumorigénèse pulmonaire, soient les régions 3p24-26, 3p21.3-22 et 3p14-cen (Hibi et al., 1992; Whang-Peng et al., 1991). Plusieurs études ont montré que la perte de matériel génétique dans ces régions est l'un des événements les plus précoces du processus de tumorigénèse. La perte de matériel est détectée dès les stades pré-néoplasiques et en plusieurs foyers indépendants, ce qui suggère que cet événement est lié à la cancérisation par champs (field cancerization) (Chung et al., 1995; Hung et al., 1995; Sundaresan et al., 1992). La cancérisation par champs est l'illustration qu'un carcinogène comme le tabac va affecter tout l'organe et créer de multiples lésions pré-néoplasiques indépendantes, desquelles quelques unes seulement évolueront en tumeurs.

Plusieurs gènes ont été identifiés dans les régions affectées du chromosome 3p mais aucun n'a été définitivement identifié comme gène suppresseur des tumeurs pulmonaires. C'est le cas, entre autres des gènes FHIT (Fragile Histidine Triad) en

3p14.2 (Sozzi et al., 1996), des gènes de sémaphorines SEM IIIIF (Xiang et al., 1996), SEM IV et SEM V (Sekido et al., 1996) en 3p21 qui sont des molécules impliquées dans la croissance des neurones et du gène de la maladie de Von Hippel-Lindau en 3p25 (Sekido et al., 1994). Par contre, le gène RAR β situé en 3p24 pourrait jouer un rôle de suppression tumorale, au moins dans les tumeurs épidermoïdes. Des anomalies d'expression de ce gène ont été relevées dans plusieurs lignées dérivées de tumeurs pulmonaires mais aussi dans certaines tumeurs épidermoïdes (Gebert et al., 1991; Geradts et al., 1993; Houle et al., 1991; Nervi et al., 1991). Il a aussi été démontré que l'introduction de ce gène dans des cellules en ayant perdu l'expression, pouvait diminuer leur taux de croissance *in vitro* et leur capacité à former des tumeurs *in vivo* (Houle et al., 1993). Nous reviendrons plus abondamment sur ce dernier gène qui est l'objet de cette thèse.

1.4.3 Autres altérations génétiques

De multiples altérations génétiques sont retrouvées dans les tumeurs pulmonaires en sus de celles que nous avons décrit ci-haut. Parmi celles-ci, notons l'activité télomérase, présente dans pratiquement 100% des tumeurs pulmonaires, l'instabilité génétique et les altérations du patron de méthylation dans plusieurs tumeurs.

1.4.3.1 Activité télomérase

Les télomères sont des séquences répétées d'ADN présentes aux extrémités des chromosomes afin de les protéger contre des fusions, des recombinaisons ou encore

la dégradation (Greider, 1996). L'enzyme responsable de la synthèse des télomères est une ribonucléoprotéine, la télomérase (Greider, 1996). L'activité de cette enzyme n'est généralement pas détectable dans les cultures primaires de cellules humaines où un raccourcissement des télomères est observé au fil des divisions cellulaires (Counter et al., 1992). Par contre, l'activité télomérase est détectable dans les cellules immortalisées ainsi que dans 80 à 90% des tumeurs humaines (Kim et al., 1994; Shay et Bacchetti, 1997). La présence d'activité télomérase dans les cellules tumorales suggère que la présence de celle-ci est nécessaire pour l'immortalisation cellulaire et la progression tumorale en assurant le maintien des extrémités chromosomiques et que l'inhibition de cette enzyme pourrait être une avenue thérapeutique (Counter et al., 1992). Des résultats plus récents suggèrent que l'activité télomérase pourrait ne pas être nécessaire pour l'immortalisation cellulaire, la transformation oncogénique et la formation de tumeurs (Blasco et al., 1997). Des souris ayant subi une inactivation sélective du gène de la composante ribonucléique de la télomérase (*mTR*^{-/-}) montrent un raccourcissement des télomères au fil des divisions cellulaires (Blasco et al., 1997). Toutefois, des cellules dérivées de ces souris montrent un taux d'immortalisation cellulaire, de transformation cellulaire et de formation de tumeurs dans les souris nues semblables à ceux de cellules dérivées de souris normales (Blasco et al., 1997). Ces résultats suggèrent que la présence d'activité télomérase est effectivement nécessaire au maintien des télomères mais que son inactivation n'affecte pas les processus d'immortalisation et de transformation cellulaires ou la croissance des tumeurs. Il faut toutefois noter que ces cellules proviennent d'un système murin et que les différences avec le système humain pourraient être très significatives du point de vue de la tumorigénèse et de la croissance cellulaire. Des études plus approfondies seront donc nécessaires pour déterminer tout le potentiel

de l'inhibition de la télomérase comme avenue thérapeutique dans les cancers humains.

1.4.3.2 Instabilité génomique et gènes "mutator"

Les anomalies génomiques sont une des caractéristiques marquantes des cellules cancéreuses. On peut y observer plusieurs types de modifications du matériel génomique, allant de l'aneuploïdie à la polyploïdie en passant par des translocations, des insertions, des délétions ou des mutations (Brambilla, 1998). Ces anomalies seraient le reflet d'une instabilité du génome et surviendraient très tôt au cours du développement des tumeurs puisque des cellules aneuploïdes sont détectées dans l'épithélium bronchique normal de patients ayant une tumeur pulmonaire (Smith et al., 1996). L'instabilité génomique a été associée avec la progression tumorale, plus une tumeur progresse des stades pré-néoplasiques vers des stades plus avancés, plus le nombre d'anomalies chromosomiques augmente (Wistuba et Gazdar, 1998). Ces résultats suggèrent que la détection des anomalies chromosomiques pourrait être un outil de détection précoce et renforcent l'hypothèse de cancérisation par champs dans le cancer pulmonaire.

Les microsatellites sont de courtes séquences répétitives d'ADN présentes en grand nombre dans le génome et sont souvent altérées dans les cancers (Loeb, 1994). Certains auteurs suggèrent que les altérations des microsatellites seraient le reflet d'une instabilité généralisée de la cellule (Fishel, 1996). Des études effectuées sur une forme familiale de cancer du colon ont permis de démontrer que la forte instabilité des microsatellites dans ces tumeurs est associée avec un phénotype appelé "mutator" (Peltomaki et al., 1993). Par contre dans les cancer pulmonaires,

ces altérations sont détectées dans 0 à 45% des tumeurs selon les études (Adachi et al., 1995; Fong et al., 1995; Mao et al., 1994; Merlo et al., 1994).

Le phénotype "mutator" a été évoqué pour la première fois par Loeb en 1991. Cette description était basée sur l'hypothèse que les taux naturels de mutation ne pouvaient expliquer la présence des nombreuses mutations et anomalies chromosomiques présentes dans une seule cellule et nécessaires au développement et à l'expansion des tumeurs cancéreuses (Loeb, 1991). Par la suite, certaines études ont démontré que l'instabilité des microsatellites dans les cellules de patients HNPCC ("Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer") est associée avec le phénotype "mutator" et que celui-ci est expliqué par la présence de mutations dans certains gènes du système de réparation des mésappariements de l'ADN (gènes "mutator", e.g.: MLH1, MSH2) (Aaltonen et al., 1993; Fishel et al., 1993; Leach et al., 1993; Parsons et al., 1993). Les gènes "mutator", contrairement aux oncogènes et aux gènes suppresseurs ne sont pas impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire ou de la différenciation des cellules. Les produits de ces gènes sont responsables de la fidélité de la réplication de l'ADN et de la réparation des mésappariements (Fishel, 1996). Les mutations causées dans ces gènes amèneront une perte de fidélité et de stabilité du génome, permettant l'introduction des mutations décrites plus haut. Fischel (1996) suggère que plusieurs gènes impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire puissent aussi contribuer à ce phénotype puisque la dysfonction de ces points de contrôle peut être impliquée dans le développement de l'instabilité génomique (e.g. p53).

1.4.3.3 Méthylation

Dans le génome humain, les cytosines sont souvent méthylées dans les îlots CpG qui sont associés avec les régions promotrices de certains gènes afin d'en moduler l'expression (empreinte parentale ou modulation transcriptionnelle) (Lewin, 1994). Les cellules tumorales présentent souvent des zones d'hypo- et d'hyperméthylation dans leur génome (Counts et Goodman, 1995). Il semblerait que les zones d'hypométhylation soient associées avec une expression massive de gènes alors que les régions hyperméthylées seraient plutôt associées au silence transcriptionnel de gènes suppresseurs de tumeurs (Counts et Goodman, 1995). Dans plusieurs tumeurs on a noté des anomalies dans l'expression de l'enzyme responsable du maintien du patron de méthylation, l'ADN méthyltransférase, ce qui pourrait expliquer les changements observés dans le patron de méthylation du génome tumoral (Minna et al., 1997). Sachant aussi que les 5-méthyl-cytosines (les cytosines méthylées) sont susceptibles de se déaminer spontanément en thymidines, on conçoit aisément que les altérations du patron de méthylation (hypo- ou hyperméthylation et mutations susceptibles d'être produites par déamination) sont susceptibles d'avoir un effet majeur sur le développement des tumeurs (Counts et Goodman, 1995).

1.4.4 Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des peptides régulateurs sécrétés par les cellules. Ces peptides, une fois sécrétés sont liés par des récepteurs membranaires associés avec des voies de signalisation intracellulaires qui vont ultimement mener à l'émission de signaux mitogènes (Minna, 1993). Dans les tumeurs, les cellules tumorales mais aussi d'autres cellules produisent ces facteurs qui forment ainsi des

boucles autocrines et paracrines en se liant aux récepteurs des cellules tumorales, leur conférant ainsi un avantage de croissance en induisant des signaux mitogènes (Minna et al., 1997).

1.5 Carcinogénèse pulmonaire

Bien que l'on n'ait pas encore de vue d'ensemble très détaillée de la carcinogénèse pulmonaire, les travaux entrepris depuis une dizaine d'années nous permettent aujourd'hui d'entrevoir les mécanismes causant les dérèglements cellulaires qui conduisent à la formation des tumeurs. On considère généralement deux concepts importants dans la tumorigénèse pulmonaire, soient la cancérisation par champs (field cancerization) et la nature progressive de ce phénomène (Hong et al., 1995). La cancérisation par champs implique la formation de plusieurs lésions pré-néoplasiques d'origines indépendantes. Ces lésions seraient le résultat d'une exposition répétée du champ épithélial (le poumon) aux carcinogènes (Sporn, 1991).

La théorie de la cancérisation par champs est supportée par différentes évidences. Premièrement, les tumeurs surviennent dans un tissu subissant une forte exposition aux carcinogènes, le poumon (Hong et al., 1995). L'usage du tabac augmente grandement le risque de développer une tumeur pulmonaire et les carcinogènes contenu dans la fumée de tabac affectent tout le champ pulmonaire, il y a donc une forte probabilité de voir des tumeurs se développer en plusieurs endroits. Deuxièmement, dans un organe comme le poumon, les tumeurs multiples surviennent à grande fréquence dans le champ touché, ce qui suggère que plusieurs événements initiateurs indépendants se sont produits (Hong et al., 1995). Les résultats de plusieurs groupes montrent en effet que différentes lésions pulmonaires

indépendantes ont subi les mêmes altérations génétiques qui sont absentes du tissu sain (Gazdar, 1994; Lee et al., 1987; Sozzi et al., 1992; Sundaresan et al., 1992), ce qui suggère des événements mutagéniques précoces et qui surviennent en plusieurs foci du champ.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la cancérogénèse est généralement considérée comme étant un processus progressif i.e. que plusieurs étapes sont nécessaires à la formation de tumeurs (Vogelstein et Kinzler, 1993). Les événements génétiques s'accumulent, ce qui résulte en changements phénotypiques comme des dysrégulations affectant la croissance cellulaire, la différenciation, la mort et les fonctions cellulaires (Hong et al., 1995). Ce concept est particulièrement bien illustré par la tumorigénèse pulmonaire. D'un point de vue clinique, l'apparition de tumeurs de l'arbre respiratoire est précédée par des lésions dites pré-néoplasiques (métaplasie et dysplasie) dans le champ à risque. Bien que les tumeurs n'originent pas nécessairement de ces lésions, leur présence a été associée avec une augmentation du risque de développer des tumeurs (Hong et al., 1995). L'accumulation de changements génétiques dans le processus progressif est donc susceptible de résulter en changements phénotypiques séquentiels associés avec le phénotype tumoral. Deux modèles de cancérogénèse pulmonaire tentent d'intégrer les différents événements connus en un processus de carcinogénèse continu.

1.5.1 Modèle de cancérogénèse de Minna

Pour Minna (1989), la première étape de la tumorigénèse qui entraîne les cancers pulmonaires à petites cellules (SCLC) consiste en l'exposition des cellules aux carcinogènes; la susceptibilité d'un individu à l'agent initiateur peut être augmentée par les facteurs héréditaires, les habitudes de vie (diète ou tabagisme),

l'environnement ou l'histoire médicale. En réponse à cette exposition, les cellules neuroendocrines du poumon sécrètent des facteurs de croissance créant une boucle de stimulation autocrine. De cette stimulation, il résulte une prolifération cellulaire polyclonale et une production accrue de facteurs de croissance. L'exposition continue des cellules épithéliales des bronches aux carcinogènes amène la formation de délétions et de translocations non-réciproques à divers endroits dans le génome et donne lieu à des anomalies clonales qui affectent certains oncogènes récessifs. Parmi ces délétions, celles en 3p semblent conférer un avantage sélectif aux cellules tumorales. Finalement, les mutations subséquentes de différents oncogènes modifient le comportement cellulaire pour donner des cellules invasives localement puis métastatiques (Minna, 1989).

1.5.2 Modèle de tumorigénèse à cellules souches

Plusieurs auteurs considèrent aujourd'hui que les différents types de tumeurs pulmonaires seraient dérivés d'une même cellule souche pluripotente capable d'exprimer plusieurs phénotypes (Gould et Warren, 1989). En effet, les cancers pulmonaires montrent fréquemment plus d'un type histologique et des tumeurs de différentes histologies montrent souvent des similitudes dans la production de facteurs de croissance et l'expression de protéines de surface associées au phénotype différencié (Ginsberg et al., 1997; Mooi, 1996). Mabry et ses collaborateurs ont proposé en 1991 un modèle de cancérogénèse pulmonaire semblable à celui de Minna mais qui intègre la plupart des données moléculaires connues et qui suggère une cellule souche épithéliale commune pour les quatre types histologiques majeurs de carcinomes pulmonaires (Mabry et al., 1991). Dans ce modèle, toutes les cellules pulmonaires normales sont originaires d'une même cellule souche via une voie de différenciation à deux intermédiaires et impliquant les

différents proto-oncogènes. Le premier progéniteur (A) aurait des caractéristiques neuroendocrines transitoires et donnerait naissance à un second intermédiaire (B). Ce deuxième intermédiaire (B) aurait des caractéristiques des cellules des tumeurs à grandes cellules et une capacité de différenciation en plusieurs phénotypes matures (cellules ciliées, cellules neuroendocrines et cellules productrices de mucines) (Mabry et al., 1991). Les progéniteurs (A et B) sécrèteraient des facteurs de croissance de façon autocrine pour stimuler leur prolifération mais dans le tissu sain, l'action de ces boucles serait contre-balancée par des signaux de différenciation. L'épithélium bronchial étant soumis à un stress chimique et physique constant, les cellules se renouvellent sans cesse. Lorsque des lésions plus sévères surviennent, les intermédiaires A et B vont alors proliférer anormalement pour donner lieu à une hyperplasie de la plupart des types cellulaires qui seront générés en suivant les voies de différenciation normale. Cette hyperplasie cellulaire est souvent accompagnée d'une métaplasie squameuse anormale dans les bronches (Mabry et al., 1991). Les cellules hyperplasiques qui sont exposées à des agents carcinogènes subiront ensuite des événements mutationnels variés qui affecteront à divers degrés les proto-oncogènes (incluant ceux mentionnés dans les sections précédentes) et donneront naissance à des cellules transformées qui génèreront des carcinomes. Le phénotype initial du néoplasme est déterminé par le phénotype de la cellule de départ (Mabry et al., 1991). Les cellules dérivées du précurseur A donneront des tumeurs SCLC, les tumeurs dérivées du précurseur B seront à grandes cellules tandis que les cellules métaplasiques donneront des tumeurs épidermoïdes et les cellules productrices de mucines seront les précurseurs d'adénocarcinomes. Par la suite, les cellules vont proliférer de façon incontrôlée et progresser vers un phénotype de plus en plus malin puis métastatique au fur et à mesure que des mutations affecteront les gènes impliqués dans cette progression (Mabry et al., 1991). Ce modèle est particulièrement intéressant puisqu'il tient aussi compte de l'hétérogénéité intra-

tumorale observée, en proposant une transition entre les différents types tumoraux via certains événements génétiques (Mabry et al., 1991).

1.6 L'acide rétinoïque et ses récepteurs

L'acide rétinoïque, le principal dérivé actif naturel de la vitamine A, fait partie d'une famille de composés chimiques naturels et de synthèse appelés rétinoïdes (Gudas, 1992). Chez les vertébrés, ces composés sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires et développementaux physiologiques ainsi que dans certaines pathologies (Gudas, 1994). Dès 1925, les expériences de Wolbach et Howe ont démontré que chez le rat, une privation de vitamine A dans la diète peut entraîner une métaplasie squameuse de l'épithélium trachéal (Wolbach et Howe, 1925). Les rétinoïdes possèdent aussi un rôle morphogène, c'est-à-dire qu'il sont impliqués dans la spécification de l'axe antéro-postérieur de l'embryon et le développement des membres et organes (Gudas, 1994). De même, on a démontré que les rétinoïdes peuvent affecter la prolifération et la différenciation de plusieurs lignées cellulaires en culture (Lotan, 1980; Roberts et Sporn, 1984). Ce n'est toutefois que dans la dernière décennie que l'on a commencé à en élucider les mécanismes d'action. L'identification et le clonage de récepteurs cellulaires et nucléaires pour le transport et l'action des rétinoïdes ont en effet permis d'identifier certains événements génétiques et physiologiques contrôlés par ceux-ci.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, les rétinoïdes forment une famille complexe de composés chimiques dont le plus abondant est l'acide rétinoïque *trans*. Il existe plusieurs récepteurs cellulaires et nucléaires pour les rétinoïdes (pour une revue voir Chambon, 1996). Cette multiplicité de ligands et de récepteurs permet à l'organisme de générer une foule de voies de signalisation cellulaire. En raison de

la complexité du sujet et de la portée de cette thèse, nous nous attarderons principalement à l'acide rétinoïque *trans* et à ses récepteurs nucléaires.

1.6.1 Les récepteurs de l'acide rétinoïque

Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont des récepteurs nucléaires faisant partie de la superfamille des récepteurs stéroïdiens et thyroïdiens (Evans, 1988). La plupart des membres de cette famille sont des facteurs de transcription dont l'activité est induite par la liaison du ligand. On connaît aujourd'hui deux familles de gènes codant des récepteurs de l'acide rétinoïque, les RARs (Brand et al., 1988; Giguère et al., 1987; Krust et al., 1989; Petkovitch et al., 1987) et les RXRs (Leid et al., 1992b; Mangelsdorf et al., 1992; Mangelsdorf et al., 1990). Bien que leur structure et leur mode d'action soient similaires (voir plus bas), les deux familles possèdent des affinités très différentes pour les divers rétinoïdes naturels et de synthèse. Les RARs lient l'acide rétinoïque *trans* et *9-cis* avec une affinité similaire (K_d : 0.2-0.4 nM) et sont activés par les deux isomères (Allegretto et al., 1993; Allenby et al., 1993). Il a été démontré que les RXRs lient uniquement l'acide rétinoïque *9-cis* (K_d : 2-15 nM) et sont activés par cette liaison (Allegretto et al., 1993; Allenby et al., 1993). Aucune liaison des RXRs n'a pu être observée avec les isomères *trans* ou les stéréoisomères *7-cis*, *11-cis* et *13-cis*, ce qui suggère que la conformation spécifique *9-cis* serait nécessaire pour la liaison et l'activation des RXRs (Allenby et al., 1993). Suite à la liaison de leur ligand, les récepteurs vont généralement former des hétérodimères RAR-RXR ou des homodimères RXR-RXR et lier des séquences régulatrices de certains gènes (Gudas, 1992). Ces séquences sont appelées éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) et sont constituées de répétitions (généralement 2) de courtes séquences d'ADN (5 ou 6 nucléotides) espacées de 1 à 5 nucléotides, où l'espacement va déterminer le type

de dimère lié (Mangelsdorf et Evans, 1995) (voir Figure 2 et section 1.6.2.2). Chaque partenaire du dimère interagit avec une des répétitions du RARE via son domaine de liaison à l'ADN. Il est à noter que les RXRs sont aussi des partenaires de dimérisation des récepteurs de l'hormone thyroïdienne, des récepteurs de la vitamine D et des PPAR (peroxisome proliferator activated receptor), ce qui ajoute à la complexité des voies de régulation par l'acide rétinoïque (Leblanc et Stunnenberg, 1995; Mangelsdorf et Evans, 1995)

Comme nous l'avons mentionné plus haut, il existe deux familles de gènes codant pour les récepteurs de l'acide rétinoïque, les RARs et les RXRs. Chacune des familles comporte trois gènes, α , β et γ (Brand et al., 1988; Giguère et al., 1987; Krust et al., 1989; Leid et al., 1992b; Mangelsdorf et al., 1992; Mangelsdorf et al., 1990; Petkovitch et al., 1987) Les produits de ces gènes présentent un taux de conservation de la séquence protéique d'environ 85% entre membres d'une même famille, ce qui suggère que tous les membres d'une famille originent d'un ancêtre commun (Chambon, 1996). Toutefois, les RARs et les RXRs ont un degré de similitude relativement faible, ce qui suggère une origine distincte pour les deux familles (Mangelsdorf et al., 1994).

Chaque gène RAR code pour différents isoformes qui sont générés par épissage alternatif et l'utilisation de deux promoteurs (P1 et P2) (Kastner et al., 1990; Leroy et al., 1991a; Zelent et al., 1991). Ces différents isoformes ont en commun la majorité des domaines protéiques mais varient dans leur région amino-terminale. La structure des récepteurs, comme celle des autres membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens, peut être subdivisée en six grands domaines. Le domaine A représente la région amino-terminale variable et spécifique à chaque isoforme; par contre les domaines B-F sont identiques chez tous les isoformes d'un même gène.

La région C code pour le domaine de liaison à l'ADN, soit l'interface de la protéine qui interagira avec les séquences du RARE. Le domaine D est une région charnière nécessaire aux changements de conformation de la protéine. La région E remplit de multiples rôles, c'est le domaine de liaison du ligand et c'est aussi dans cette région que les récepteurs interagissent lors de la dimérisation (Figure 1). Le domaine F quant à lui n'a pas de fonction établie à ce jour. (Chambon, 1994; Chambon, 1996; Leid et al., 1992a).

Comme nous l'avons mentionné, les récepteurs de l'acide rétinoïque sont des facteurs transcriptionnels; leur séquence protéique contient donc des acides aminés responsables de cette activité. Les RARs possèdent deux fonctions d'activation de la transcription, soient AF-1 et AF-2 (pour Activating Function) (Folkers et al., 1993; Nagpal et al., 1993). L'AF-1 est située dans la région A/B des récepteurs, elle est donc variable d'un isoforme à l'autre (Folkers et al., 1993; Nagpal et al., 1993). Elle est indépendante du ligand, i.e. qu'elle ne nécessite pas l'activation par l'acide rétinoïque pour être fonctionnelle (Chambon, 1996). L'AF-2 quant à elle est située dans la région E et est dépendante du ligand (Figure 1) (Folkers et al., 1993; Nagpal et al., 1993). Cette dépendance serait due au fait que lorsque la protéine est inactive, elle adopte une conformation qui masquerait les acides aminés activateurs. Lors de la liaison de l'acide rétinoïque, il se produirait un changement de conformation (impliquant entre autres, le domaine D) qui exposerait la fonction AF-2 en plus de permettre la dimérisation (Renaud et al., 1995).

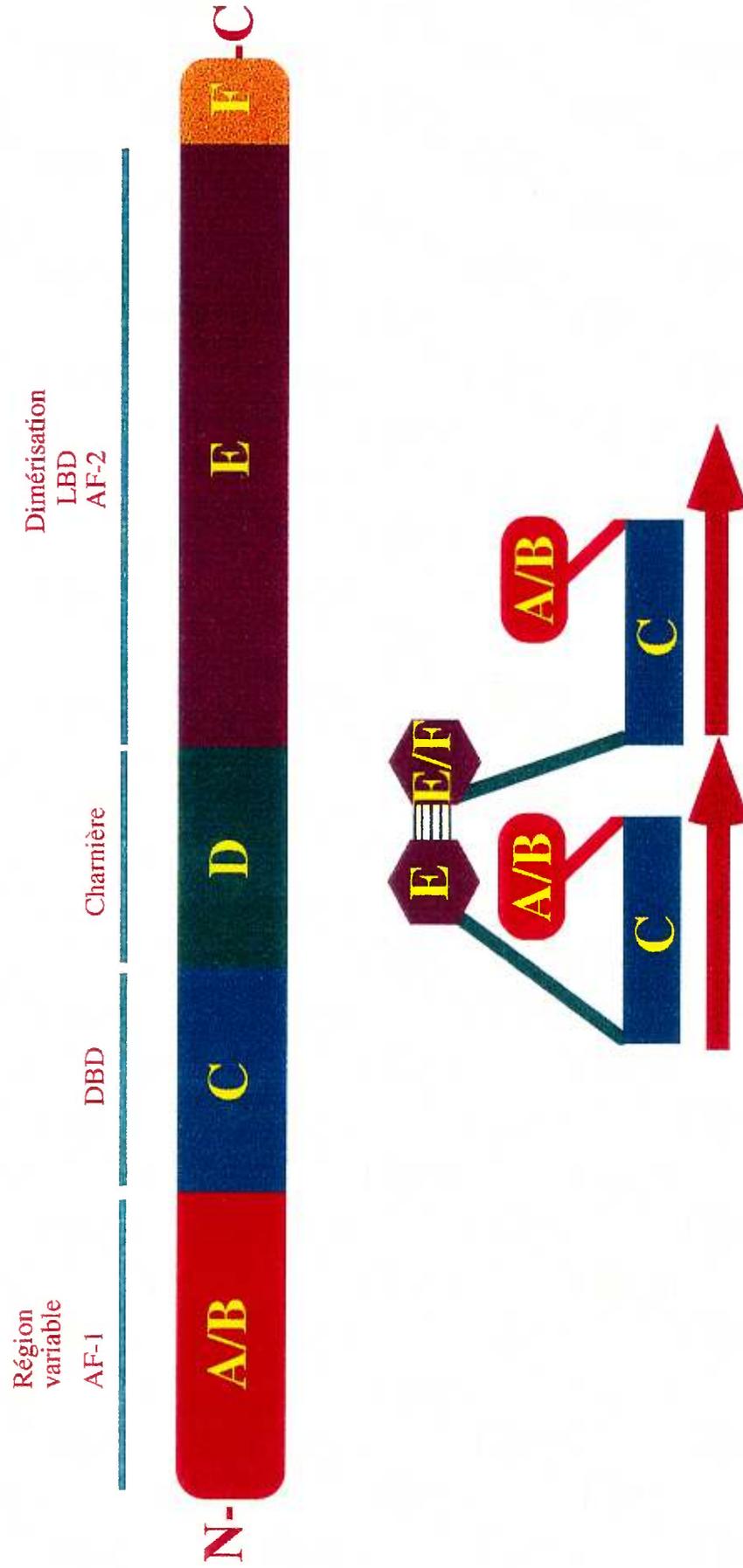


Figure 1: Structure fonctionnelle des récepteurs de l'acide rétinoïque

1.6.2 Les RARs et la régulation transcriptionnelle

Comme nous l'avons mentionné plus haut, les voies de régulation par l'acide rétinoïque sont multiples et complexes. Plusieurs facteurs contribuent en fait à cette multiplicité. Tout d'abord, la disponibilité physiologique des différents rétinoïdes est un facteur de toute première importance. Cette biodisponibilité est nécessaire à la formation d'un dimère actif. Déjà à ce stade, plusieurs protéines sont impliquées dans le transport et le métabolisme des précurseurs des rétinoïdes en acide rétinoïque disponible pour l'activation des RARs et RXRs. Toutefois, nous nous attarderons, au cours des prochains paragraphes à décrire les facteurs contribuant à la multiplicité des effets de l'acide rétinoïque au niveau transcriptionnel donc des récepteurs actifs.

1.6.2.1 Type de dimère actif

Le premier facteur contribuant directement à la variété des effets de l'acide rétinoïque est le grand nombre de dimères pouvant être générés. Comme nous l'avons mentionné ci-haut, les RARs fonctionnent en formant des dimères avec les RXRs. Par contre, les RXRs peuvent aussi fonctionner sous forme d'homodimères (Zhang et al., 1992). Sachant que chaque famille possède trois gènes et que chacun de ces gènes peut générer plusieurs isoformes, on arrive au nombre impressionnant de 84 combinaisons possibles. Bien entendu, chaque récepteur a un patron d'expression qui lui est spécifique; ainsi une seule cellule n'a que très peu de chances de pouvoir générer toutes les combinaisons possibles. Un autre facteur influençant la formation des dimères est le type d'acide rétinoïque présent. Comme nous l'avons mentionné, les RARs ont un spectre d'affinité plus large que les RXRs ainsi, selon l'acide rétinoïque présent, on favorisera l'activation

d'un type ou l'autre de récepteurs. Étant donné que dans un dimère actif un seul des deux membres est lié au ligand (le membre qui liera la répétition 3' du RARE) (Kurokawa et al., 1993; Perlmann et al., 1993; Zechel et al., 1994) on comprend facilement que si un RXR est activé, celui-ci formera généralement des homodimères ou un hétérodimère avec certains récepteurs orphelins comme NGFI-B (Perlmann et Jansson, 1995). Dans le cas d'un hétérodimère avec un récepteur orphelin, le RXR occupe la répétition en 5' du RARE (Leblanc et Stunnenberg, 1995).

1.6.2.2 Les éléments de réponse

Les récepteurs activés contrôlent l'expression de certains gènes en se liant à de courtes séquences d'ADN présentes dans les promoteurs de ces gènes, ce sont les éléments de réponse à l'acide rétinoïque ou RARE (Figure 2) (Gudas, 1992). Ces RAREs sont un des éléments cruciaux dans la détermination de la spécificité transcriptionnelle. Il a été démontré qu'un même promoteur ne répond pas de la même façon à différents dimères et que différents promoteurs ne répondent pas de la même façon à un même dimère; il y aurait donc une spécificité de contexte (Nagpal et al., 1992a). La structure même de l'élément de réponse est variable, on reconnaît un consensus constitué de deux répétitions directes du motif AGGTCA qui sont séparées par un nombre variable de nucléotides (Figure 2) (de Thé et al., 1990b; Gudas, 1992; Sucov et al., 1990). Toutefois d'autres conformations de l'élément de réponse sont aussi possibles, ce qui contribue à augmenter la diversité de la réponse à l'acide rétinoïque (Mangelsdorf et al., 1994). L'espacement entre les deux répétitions est aussi un facteur important dans la liaison du dimère à l'élément de réponse (Umesono et al., 1991). Un dimère de type RXR-RAR liera principalement des répétitions directes espacées de 2 ou 5 nucléotides (DR-2 et DR-

5) alors qu'un homodimère RXR-RXR liera généralement un élément où les séquences consensus sont séparées par 1 nucléotide (DR-1) (Figure 2) (Chambon, 1996). Il faut toutefois noter qu'un hétérodimère RAR-RXR peut aussi lier un DR-1; auquel cas ce dimère aura une activité de répression de la transcription (Figure 2) (Kurokawa et al., 1994; Kurokawa et al., 1995). En plus de l'espacement des deux motifs, des variations dans la séquence de ceux-ci et dans les séquences en amont semblent affecter la spécificité de la liaison des dimères (Mader et al., 1993; Vivanco-Ruiz et al., 1991).

Les récepteurs de type RXRs sont les partenaires de dimérisation de plusieurs autres récepteurs nucléaires (THR, VDR et PPAR) (pour une revue du sujet voir Mangelsdorf et al, 1995). Selon le type d'élément de réponse présent dans les séquences promotrices des gènes et si les ligands de ces récepteurs sont présents, d'autres dimères peuvent être formés et compétitionneront pour la dimérisation avec les RXRs. Ainsi, les dimères PPAR-RXR lieront un DR-1, les dimères VDR-RXR lieront un DR-3 et les dimères THR-RXR lieront un DR-4 (Figure 2) (Leblanc et Stunnenberg, 1995; Mangelsdorf et Evans, 1995). Le type d'élément de réponse, en combinaison avec les différents récepteurs présents ajoutent donc un degré supplémentaire de complexité.

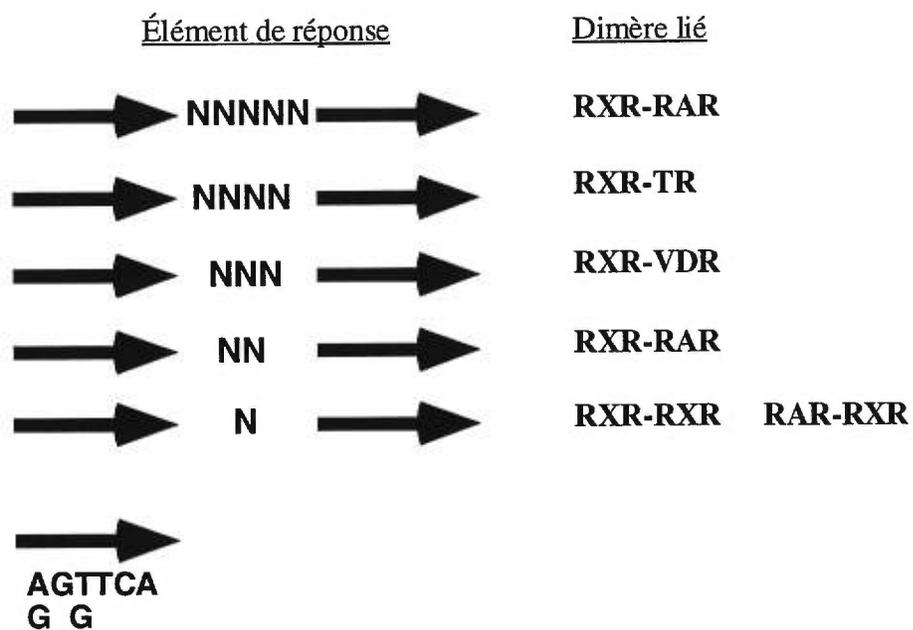


Figure 2: Éléments de réponse à l'acide rétinoïque et principaux dimères liés

1.6.2.3 Interactions avec d'autres protéines

Les voies de régulation par l'acide rétinoïque sont bien sûr régies par les différents récepteurs de l'acide rétinoïque et les séquences de liaison présentes dans les régions promotrices des gènes mais aussi par l'interaction avec d'autres protéines. Nous nous sommes déjà attardés à la description des interactions entre les RXRs et les autres récepteurs nucléaires; il faut cependant noter que d'autres protéines peuvent interagir ou entrer en compétition avec les récepteurs de l'acide rétinoïque. Depuis quelques années, certains résultats suggéraient que l'interférence transcriptionnelle entre les fonctions activatrices de différents récepteurs stéroïdiens et thyroïdiens pouvait être due à l'existence de co-facteurs pour lesquelles ils compétitionnent (Meyer et al., 1989). En utilisant différentes approches, plusieurs co-activateurs des récepteurs nucléaires ont pu être clonés: SUG1/Trip1 (Lee et al., 1995; vom Baur et al., 1995) TIF1 (Le Douarin et al., 1995), RIP140 (Cavaillès et al., 1995), SRC-1 (Onate et al., 1995), et TIF2 (Voegel et al., 1996). Ces co-activateurs sont des protéines nucléaires qui interagissent spécifiquement avec le domaine de liaison du ligand (LBD) de divers récepteurs nucléaires incluant les RARs et les RXRs. L'interaction entre le co-activateur et le récepteur nucléaire n'est pas possible lorsque ce dernier est lié à un antagoniste ce qui suggère la nécessité d'une conformation allostérique particulière pour que l'interaction se fasse. Il existe d'ailleurs des variations dans l'efficacité de cette interaction en fonction du récepteur lié et du co-facteur (vom Baur et al., 1995).

En absence de leur ligand respectif, les récepteurs de l'hormone thyroïdienne et de l'acide rétinoïque sont capables de réprimer l'expression basale de gènes cibles (Hörlein et al., 1995). Cette répression n'est pas due à une compétition avec d'autres facteurs nucléaires pour des sites de liaison et a été associée avec le domaine

carboxy-terminal (incluant le LBD) des récepteurs (Martin et al., 1994). Ces résultats suggéraient que des co-répresseurs interagissaient avec cette région des récepteurs. Deux de ces co-répresseurs N-CoR (Hörlein et al., 1995) et SMRT (Chen et Evans, 1995) ont été clonés. Les deux présentent un certain niveau d'homologie dans les régions liant les récepteurs (Chambon, 1996). Lors de la liaison du ligand au récepteur, le répresseur est relâché, ce qui permet l'activation transcriptionnelle. Kurokawa et al. (1995) ont montré que la présence du répresseur N-CoR expliquait les capacités de répression du dimère RAR/RXR sur un DR-1. Sur un élément de réponse DR-5, N-CoR est relâché par la liaison du ligand au dimère RXR/RAR par contre sur un élément DR-1, la polarité du dimère est inversée et le répresseur n'est pas relâché d'où l'activité de régulation négative de ce type de dimère (Kurokawa et al., 1995).

La présence d'une variété de co-facteurs transcriptionnels capables d'interagir à des degrés divers avec les dimères RXR/RAR ajoute donc un niveau de complexité supplémentaire à la régulation transcriptionnelle par les récepteurs de l'acide rétinoïque.

D'un autre côté, il a été démontré que les récepteurs de l'acide rétinoïque peuvent interférer avec d'autres voies de signalisation telles la transcription médiée par le facteur AP-1 (Nicholson et al., 1990; Schüle et al., 1991) bien que dans ce cas-ci, le mécanisme ne soit pas encore bien défini. Cette interférence avec AP-1 établit un lien entre les voies de signalisation des récepteurs membranaires et la modulation de leur activité par les récepteurs de l'acide rétinoïque

1.6.2.4 Le rôle spécifique des récepteurs de l'acide rétinoïque.

Au fil des dernières années, plusieurs groupes ont entrepris l'inactivation fonctionnelle ("knock-out") des différents récepteurs de l'acide rétinoïque afin de déterminer le rôle spécifique de chacun. Les récepteurs de l'acide rétinoïque ont chacun un patron d'expression très spécifique au cours du développement et dans les tissus adultes ce qui suggère que chacun d'entre eux a un rôle particulier à jouer ((de Thé et al., 1989; Dollé et al., 1990; Giguère et al., 1987; Leroy et al., 1991a; Mendelsohn et al., 1994a; Mendelsohn et al., 1991; Ruberte et al., 1991; Ruberte et al., 1990; Ruberte et al., 1993). L'inactivation d'isoformes spécifiques $RAR\alpha 1$ (Li et al., 1993; Lufkin et al., 1993), $RAR\beta 2$ (Mendelsohn et al., 1994c) ou $RAR\gamma 2$ (Lohnes et al., 1993) ont montré que la perte d'un isoforme d'un récepteur n'affecte pas le développement ou la vie adulte des souris. De même, des souris dont le gène $RAR\beta$ a été inactivé, qui n'expriment donc aucun des isoformes, ne montrent pas de malformations majeures sinon la formation d'une membranes rétro-cornéenne (Ghyselink et al., 1997; Luo et al., 1995). Ces résultats suggèrent que la perte d'un isoforme de $RAR\alpha$ et $RAR\gamma$ ou de tous ceux de $RAR\beta$ peut être compensée, en partie, par les autres récepteurs; ce mécanisme de compensation fonctionnelle a d'ailleurs été démontré dans des cellules F9 ayant subi l'inactivation de $RAR\gamma$ (Taneja et al., 1995) Des études subséquentes dans les cellules F9 ont démontré que cette redondance fonctionnelle était vraisemblablement générée lors de l'inactivation d'un des gènes (Taneja et al., 1996).

Des souris ayant subi l'inactivation de tous les isoformes $RAR\alpha$ ou $RAR\gamma$ ou de l'isoforme $RAR\gamma 1$ développent certaines des anomalies associées avec les syndromes de déficience en vitamine A (Lohnes et al., 1993; Lufkin et al., 1993; Subbarayan et al., 1997). Ces anomalies sont cependant restreintes à un sous-

groupe des tissus qui normalement expriment le gène inactivé, l'inactivation de ces gènes pourrait donc être compensée dans certains tissus (Lohnes et al., 1993; Lufkin et al., 1993; Subbarayan et al., 1997). Ces souris montrent aussi une importante léthalité périnatale et des problèmes de croissance (Lohnes et al., 1993; Lufkin et al., 1993; Subbarayan et al., 1997). Le croisement de différents mutants RARs ou RXRs ont par la suite démontré que la perte de plus d'un isoforme accentue la sévérité des phénotypes, suggérant encore une fois qu'il y a redondance fonctionnelle entre les différents récepteurs et que la perte de plus d'un isoforme diminue la capacité de la cellule à compenser pour leur perte. Ces croisements suggèrent aussi que chaque isoforme a une spécificité qui lui est particulière puisque les anomalies observées varient selon les croisements effectués (Ghyselink et al., 1997; Grondona et al., 1996; Kastner et al., 1997; Lohnes et al., 1994; Mendelsohn et al., 1994b; Subbarayan et al., 1997). De plus, les croisements effectués avec les mutants RXR suggèrent que RXR α serait le principal partenaire des RARs lors du développement (Kastner et al., 1997).

Les études d'inactivation fonctionnelle (knock-out) des récepteurs de l'acide rétinoïque mettent en lumière leur importante contribution au développement mais surtout ont permis de démontrer que ces protéines ont une capacité de compenser pour la perte de certaines d'entre elles.

1.6.3 Quels sont les gènes régulés par les RARs?

On connaît aujourd'hui de nombreux gènes dont l'activité est régulée par l'acide rétinoïque et les rétinoïdes de synthèse. Les produits de ces gènes appartiennent à différents groupes fonctionnels de protéines parmi lesquels, des protéines de structure, des protéines associées à la croissance et la différenciation cellulaire, des

facteurs transcriptionnels ou des molécules de signalisation cellulaire. Il serait inutile d'en faire ici la liste exhaustive. Pour certains de ces gènes, on a pu caractériser un élément de réponse à l'acide rétinoïque et montrer que les récepteurs de l'acide rétinoïque lient ces éléments et modulent la transcription (e.g.: Alcool déshydrogénase (ADH) (Duester et al., 1991) , oxytocine (Richard et Zingg, 1991)). Cependant, pour plusieurs des gènes qui répondent à l'acide rétinoïque, de tels éléments n'ont pu être retrouvés ce qui suggère que la régulation se ferait alors de manière indirecte soit en interférant avec d'autres voies de régulation ou via un facteur intermédiaire qui serait lui-même régulé par les récepteurs de l'acide rétinoïque (activation en cascade).

Il faut cependant noter que des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) sont présents dans le promoteur des gènes $RAR\alpha 2$ et $RAR\beta 2$ et que ceux-ci répondent à l'acide rétinoïque par une forte induction transcriptionnelle dans certains tissus ou lignées cellulaires (de Thé et al., 1990b; Leroy et al., 1991b). Les gènes Hox, qui sont impliqués dans le développement sont eux aussi modulés par l'acide rétinoïque. Ces gènes sont responsables, via des gradients d'expression, de l'établissement du plan antéro-postérieur de développement chez les vertébrés et contrôlent l'expression d'autres gènes (Marshall et al., 1996). Il a été démontré que plusieurs gènes Hox contiennent des RAREs dans leur régions promotrices (Langston et Gudas, 1992; Marshall et al., 1994; Popperl et Featherstone, 1993). La modulation inappropriée des gènes Hox par les RARs expliquerait les anomalies développementales observées lors de l'administration de doses tératogènes d'acide rétinoïque. Lors de cette modulation le patron d'expression des gènes Hox est altéré et l'expression des gènes cibles des protéines Hox sera elle aussi altérée. Cette modulation transcriptionnelle illustre le contrôle en cascade décrit plus haut.

La majorité des études portant sur la régulation transcriptionnelle par les RARs ne font pas de différences entre les isoformes d'un récepteur et souvent ne tiennent même pas compte des différents gènes. Il est important de se rappeler que chaque gène a un patron d'expression qui lui est propre (voir section 1.6.2.4) et qu'à l'intérieur de ces zones d'expression, les différents isoformes auront eux aussi un profil d'expression particulier. Il est donc plausible que les différents récepteurs de l'acide rétinoïque aient chacun des cibles qui leurs sont propres en fonction des différents niveaux de régulations présents dans les cellules (isoformes, co-facteurs, compétiteurs, ligands, etc.). La recherche de gènes spécifiquement régulés par certains isoformes de RARs (RAR β 1, RAR γ 2 ou RAR α 1 par exemple) demeure cependant un domaine peu exploré et de tels rapports sont plutôt rares dans la littérature.

1.6.4 Les récepteurs de l'acide rétinoïque et le cancer

L'acide rétinoïque joue d'importants rôles dans la physiologie cellulaire normale et dans le développement embryonnaire et il a été depuis longtemps impliqué dans les processus de transformation maligne (Roberts et Sporn, 1984). Il a déjà été démontré que les rétinoïdes agissent directement sur les cellules néoplasiques pour supprimer le processus de transformation maligne induit par des agents chimiques, viraux ou physiques (Roberts et Sporn, 1984). La présence continue des rétinoïdes est toutefois nécessaire pour la répression du phénotype transformé puisque leur retrait en permet l'expression (Merriman et Bertram, 1979). Même si ces résultats peuvent être attribués à l'inhibition de croissance, à l'induction de la différenciation terminale et à la prévention de l'action des promoteurs tumoraux par les rétinoïdes, on connaissait peu de choses des mécanismes moléculaires impliqués (Talmage et Lackey, 1992). Depuis le clonage des RARs, il devenait de plus en plus évident

que ces récepteurs devaient jouer un rôle dans le développement des tumeurs humaines puisque ce sont les principaux médiateurs des effets de l'acide rétinoïque. Plus récemment, on a commencé à identifier un rôle plus direct pour ces récepteurs dans le développement des tumeurs humaines avec l'identification d'une translocation entre les chromosomes 15 et 17 (t(15:17)) qui fusionne RAR α avec une autre protéine nucléaire, PML, dans la plupart des leucémies promyélocytiques aiguës (de Thé et al., 1990a). Cette haute fréquence de translocation dans ces leucémies suggère que RAR α pourrait jouer un rôle important dans la formation de ce type de tumeurs. L'expression du produit de fusion PML-RAR α dans des souris transgéniques confirme que cette protéine est impliquée dans le développement des leucémies promyélocytiques aiguës. Ces souris développent en effet des désordres myéloprolifératifs très semblables à ceux observés chez des patients leucémiques, incluant une rémission en réponse à l'acide rétinoïque (Brown et al., 1997; He et al., 1997). Puisque les patients leucémiques répondent par une rémission à un traitement avec de l'acide rétinoïque, il a été postulé que RAR α était le médiateur de cette suppression tumorale; en effet, la surexpression d'un allèle normal de RAR α 1 dans des cellules leucémiques ayant la translocation t(15:17) cause une réduction de la vitesse de croissance et permet l'expression de plusieurs marqueurs de maturation myéloïde (Ahn et al., 1995).

Il a aussi été démontré que RAR α 1 peut supprimer la transformation cellulaire induite par le virus du polyome (Talmage et Lackey, 1992). Lorsque ce gène est surexprimé dans une lignée de fibroblastes et qu'on infecte les cellules avec le virus du polyome, il apparaît moins de foyers de transformation pour la lignée surexprimant le récepteur de l'acide rétinoïque que pour la lignée normale. La présence de RAR α 1 dans ces cellules augmente leur sensibilité à la suppression de la transformation, par l'acide rétinoïque, d'environ 100 fois. Il semblerait donc que

la surexpression de RAR α 1 dans les fibroblastes interfère avec la voie de transformation par le virus du polyome, probablement en régulant certains gènes qui interagissent avec ceux impliqués dans cette voie de transformation (Talmage et Lackey, 1992). De même, il a été démontré que l'expression de RAR α 1 pouvait supprimer la transformation cellulaire par l'oncogène v-MYB. Dans les cellules transformées par v-MYB, la surexpression de RAR α induit la différenciation des cellules en réponse à l'acide rétinoïque (Smarda et al., 1995).

D'autres études impliquent RAR α dans la suppression de la croissance dans les lignées de cancer du sein (Sheikh et al., 1994; van der Leede et al., 1995). Dans ce système, il a été démontré que la surexpression de RAR α 1 supprime la vitesse de croissance des cellules *in vitro*. Toutefois, des travaux ultérieurs suggèrent que cet effet serait médié par RAR β 2 (Liu et al., 1996). En effet, la surexpression de RAR α 1 causerait l'expression de RAR β 2 qui est un gène inductible par les récepteurs de l'acide rétinoïque (de Thé et al., 1990b). Le récepteur β 2 ainsi induit causerait l'entrée en apoptose des cellules transfectées avec RAR α 1 (Liu et al., 1996). D'autres travaux suggèrent que ce serait aussi le cas dans les lignées dérivées de tumeurs du col utérin (Geisen et al., 1997).

Plusieurs isoformes de RAR β ont aussi été associé avec la tumorigénèse. Chez la souris, on reconnaît quatre isoformes RAR β dont les isoformes RAR β 1 et β 3 sont formés à partir du promoteur P1, RAR β 3 étant formé par l'insertion d'un exon supplémentaire en 3' de la région spécifique à RAR β 1, soit juste avant le premier domaine commun (Zelent et al., 1991). Les isoformes RAR β 2 et RAR β 4 sont formées à partir du promoteur P2 où RAR β 4 est formé par épissage à l'intérieur de l'exon codant la région A de RAR β 2, laissant ainsi une région A tronquée pour RAR β 4 (Nagpal et al., 1992b). Chez l'humain la structure et les séquences sont

généralement bien conservées mais avec quelques exceptions (voir chapitre 2), entre autres on ne connaît que trois des quatre isoformes, soient RAR β 1, RAR β 2 et RAR β 4.

Plusieurs travaux suggèrent que RAR β 2 serait en fait l'isoforme important dans la médiation des effets antiprolifératifs de l'acide rétinoïque. Son expression est altérée dans plusieurs systèmes cellulaires dérivés de tumeurs: cancer mammaire (Jing et al., 1996; Roman et al., 1992; Swisshelm et al., 1994; van der Burg et al., 1993), cancer épidermoïde pulmonaire (Gebert et al., 1991; Geradts et al., 1993; Houle et al., 1991; Nervi et al., 1991), carcinome rénal (Hoffman et al., 1996) et cancer de la tête et du cou (Zou et al., 1994). Il est intéressant de noter que dans deux de ces systèmes, poumon et rein, ce sont les lignées qui ont perdu la capacité d'induire RAR β , suite à un traitement avec des doses pharmacologiques d'acide rétinoïque, qui sont résistantes aux effets antiprolifératifs de ce dernier (Geradts et al., 1993; Hoffman et al., 1996). Le gène RAR β est particulièrement intéressant dans la perspective du cancer pulmonaire puisque ce gène est localisé dans une région chromosomique, 3p24, qui est fréquemment altérée dans les tumeurs pulmonaires et qui pourrait abriter des gènes suppresseurs de tumeurs. De plus, les anomalies d'expression décrites ci-haut suggèrent fortement l'implication de ce gène dans ces tumeurs. Les travaux de Houle et ses collaborateurs ont montré que l'expression de l'isoforme RAR β 2 dans des lignées dérivées de tumeurs épidermoïdes du poumon permet d'en supprimer la croissance *in vitro* et la tumorigénèse *in vivo* (Houle et al., 1993). Par la suite, d'autres travaux dans plusieurs des systèmes décrits plus haut ont démontré que l'expression de RAR β 2 dans des cellules où son expression est altérée pouvait effectivement réduire leur taux de croissance en culture (Li et al., 1995; Seewaldt et al., 1995; Si et al., 1996) en plus de diminuer leur capacité à croître en absence d'ancrage (Li et al., 1995; Si

et al., 1996). De plus, l'expression de constructions antisens pour RAR β 2 dans des souris transgéniques contribue de façon significative à la formation de tumeurs pulmonaires (Bérard et al., 1996), ce qui suggère que l'inactivation fonctionnelle de RAR β 2 est importante pour la formation des tumeurs renforçant ainsi la notion que RAR β 2 soit un gène suppresseur de tumeurs.

Donc bien que plusieurs travaux pointent dans la direction de RAR β 2 comme étant le gène médiant les effets suppresseurs de l'acide rétinoïque, certains autres montrent que RAR α pourrait aussi jouer, au moins partiellement, un rôle semblable. Les travaux de Liu et al. (1996) et de Geisen et al. (1997) montrent que cet effet serait médié par l'induction de RAR β dans le cancer du sein et du col utérin. Par contre dans les autres systèmes et en particulier dans le cancer pulmonaire, aucun test direct de la capacité de suppression de RAR α n'a été rapporté.

Les autres isoformes de RAR β ont aussi été associés avec la tumorigénèse. L'isoforme tronqué RAR β 4, a été associé avec la formation de tumeurs de plusieurs organes (incluant le poumon) dans un système murin où cet isoforme est exprimé de façon constitutive (Bérard et al., 1994). L'expression de RAR β 4 a aussi été associée avec les lignées d'adénocarcinomes pulmonaires humains (Bérard et al., 1994). Il semble donc que l'expression de RAR β 4 contribuerait de façon positive à la formation de tumeurs.

Finalement, des travaux effectués par notre groupe ont montré que l'expression de l'isoforme RAR β 1 est anormale dans les tumeurs pulmonaires. Houle et al. ont démontré que cet isoforme est exclusivement exprimé dans les tissus fœtaux chez l'humain mais dans aucun des tissus adultes sains examinés (Houle et al., 1994).

Par contre, plusieurs tumeurs du groupe SCLC expriment aussi cet isoforme (Houle et al., 1994). Cela suggère que l'isoforme RAR β 1 pourrait être impliqué dans la formation de ces tumeurs. D'un autre côté, les travaux de Hoffmann et ses collaborateurs ont montré en utilisant des lignées de carcinome rénal que l'expression de RAR β 1 était liée à la suppression de la croissance (Hoffman et al., 1996). Dans leur étude de douze lignées cellulaires, une seule répondait aux effets antiprolifératifs de l'acide rétinoïque et cette lignée était la seule à exprimer RAR β 1. Par contre, ils ont aussi démontré que cette lignée était la seule où RAR β 2 est induit à de très hauts niveaux, ce qui évoque la possibilité que l'effet suppresseur puisse être modulé par RAR β 2. L'expression de RAR β 1 pourrait donc être associée avec une suppression de la croissance tumorale dans une lignée cellulaire de carcinome rénal mais dans le système des tumeurs pulmonaires, cette expression est plutôt associée avec les tumeurs SCLC qui ont une croissance rapide et agressive. Le rôle exact de cet isoforme dans la tumorigénèse reste donc indéterminé à ce jour.

Il est aussi intéressant de noter que dans les modèles murins d'inactivation des gènes des RARs, aucune tumeur n'a été rapportée à ce jour. À la lumière des études d'expression chez l'humain montrant que la perte d'expression d'un RAR est associée avec le développement de tumeurs (RAR α dans le cancer mammaire et RAR β dans d'autres), cette absence de tumeurs est surprenante. Dans ces souris, l'inactivation est présente depuis la fécondation à un moment où la cellule est très plastique, ce qui permet probablement la mise en place de certains mécanismes compensatoires (voir section 1.6.2.4). Par contre, chez l'humain l'inactivation se produit de façon somatique dans une cellule différenciée ayant probablement de moins grandes capacités de compensation. D'un autre côté, cette absence de tumeurs chez les souris mutantes pourrait être le reflet d'une différence fonctionnelle profonde des RARs entre les deux espèces.

1.6.5 L'acide rétinoïque et la différenciation cellulaire

Le cancer est reconnu comme étant une pathologie où il y a une prolifération excessive des cellules d'un tissu qui est accompagnée d'une différenciation anormale (Potten et Loeffler, 1990). Il semble que les phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaires soient inversement reliés, c'est-à-dire qu'au fur et à mesure qu'une cellule franchit les différentes étapes de sa différenciation, son potentiel de renouvellement et de prolifération est diminué (Potten et Loeffler, 1990).

Les rétinoïdes ont depuis longtemps été impliqués dans le contrôle de la différenciation et de la prolifération des cellules (Roberts et Sporn, 1984). Parmi ceux-ci, il semble que l'acide rétinoïque joue un rôle dans la médiation des signaux de différenciation de plusieurs systèmes cellulaires. Dans ces systèmes, il induirait un ensemble d'événements de différenciation, soit l'activation ou la répression d'un ensemble de gènes régulateurs qui vont diriger la cellule dans une voie de différenciation particulière (Gudas, 1992; Lanoix et al., 1991)

1.6.6 La différenciation de l'épithélium trachéobronchial et l'acide rétinoïque

L'épithélium trachéobronchial est un tissu en régénération constante. Dans ce processus de régénération, les cellules qui sont différenciées de façon terminale vont s'exfolier et être remplacées suite à la prolifération et à la différenciation de cellules progénitrices basales (Jetten et al., 1992). Pour maintenir une structure tissulaire normale, il doit y avoir un équilibre entre les taux de destruction des cellules et les taux de prolifération et de différenciation. Plusieurs facteurs

stimulant ou inhibant la prolifération et la différenciation ainsi que la mort cellulaire entrent en jeu dans l'établissement de cet équilibre (Jetten et al., 1992).

Il arrive parfois que cet équilibre soit rompu et que les cellules qui devaient se différencier soient stimulées pour recommencer le cycle de mitose et ainsi proliférer. Dans le cas de l'épithélium trachéobronchial, on peut induire une hyperplasie épidermoïde en causant un déficit en vitamine A (Hong et al., 1995). Dans cette hyperplasie, il semble que ce soient les cellules progénitrices basales qui sont appelées à rentrer dans le cycle cellulaire pour proliférer et ultimement s'engager dans une voie de différenciation épidermoïde anormale dans le poumon (Jetten et al., 1992). Puisque ceci survient lorsqu'il y a déficit d'acide rétinoïque, il semble que ce dernier soit fortement impliqué dans la régulation de la différenciation des cellules épithéliales trachéobronchiales (Jetten et al., 1992).

L'induction de RAR β 2 par l'acide rétinoïque dans les cellules épithéliales trachéobronchiales coïncide avec la suppression des marqueurs de différenciation épidermoïde (Jetten et al., 1992). Selon certains auteurs, RAR β 2 ne serait pas impliqué dans la suppression de la différenciation épidermoïde mais plutôt dans le maintien du phénotype mucocilié normal de l'épithélium bronchial (Jetten et al., 1992). Plusieurs études ont associé la perte d'expression du gène codant pour RAR β 2 avec le développement des tumeurs pulmonaires épidermoïdes (Gebert et al., 1991; Geradts et al., 1993; Houle et al., 1991; Nervi et al., 1991). Ces résultats suggèrent donc que RAR β 2 agit dans la voie de différenciation des cellules normales de l'épithélium bronchial en régulant l'expression de gènes associés à la différenciation et que l'altération de cette régulation permet le développement d'un phénotype squameux.

Encore une fois, ces processus physiologiques illustrent bien la complexité des phénomènes régulés par l'acide rétinoïque et l'importance de ses récepteurs dans les processus normaux et pathologiques.

1.7 Buts et raisons de cette thèse

Tous ces travaux pointent dans une direction unique, la compréhension de la tumorigénèse pulmonaire. Le cancer pulmonaire est actuellement le type de tumeurs le plus meurtrier. Nous croyons qu'une meilleure compréhension des phénomènes moléculaires impliqués permettra une meilleure gestion des efforts cliniques. Sachant que l'acide rétinoïque et certains rétinoïdes synthétiques sont des agents antinéoplasiques et antiprolifératifs potentiellement efficaces (résumé dans Lotan, 1996), il est important de chercher à en comprendre les mécanismes d'action et les cibles. Ayant acquis ces connaissances, peut-être nous sera-t-il possible, dans un proche avenir d'en moduler les effets et en améliorer les capacités thérapeutiques.

Les effets de l'acide rétinoïque sont médiés par des récepteurs nucléaires qui sont impliqués de diverses façons dans la carcinogénèse humaine, certains présentant un rôle suppresseur alors que d'autres auraient plutôt une fonction oncogénique (e.g.: PML-RAR α). Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse au rôle de ces récepteurs dans la carcinogénèse pulmonaire humaine. Nous nous intéressons plus particulièrement au rôle de RAR β qui est un gène localisé au chromosome 3p24 qui est fréquemment altéré dans les tumeurs pulmonaires. Il a été démontré que ce gène présente des anomalies d'expression dans plusieurs lignées et tumeurs pulmonaires. Il a ainsi été démontré que les tumeurs de type épidermoïde ou squameux subissent une perte d'expression de RAR β 2 en comparaison du poumon

normal (Gebert et al., 1991; Geradts et al., 1993; Houle et al., 1991; Nervi et al., 1991). L'introduction d'un ADNc codant pour ce récepteur dans des lignées cellulaires dérivées de tumeurs épidermoïdes a permis de démontrer que RAR β 2 pouvait supprimer la croissance des cellules et leur tumorigénèse (Houle et al., 1993). Les travaux de notre groupe ont aussi permis le clonage de l'ADNc codant la région A de l'isoforme RAR β 1, ces travaux ont montré que l'expression de cet isoforme est limitée aux tissus fœtaux et à certaines lignées tumorales de type SCLC (Houle et al., 1994). Finalement, l'expression de RAR β 4 a été associée avec la formation d'adénocarcinomes (Bérard et al., 1994).

Les travaux présentés dans cette thèse font suite aux résultats obtenus préalablement dans notre laboratoire. Possédant les clones d'ADNc codant la région A de RAR β 1, nous avons entrepris de cloner et caractériser les régions en amont, soient le 5'-UTR au niveau de l'ARNm et la structure génomique de cette région au niveau de l'ADN. Nous montrons que l'homologie entre le gène humain et le gène murin qui est très forte au niveau des séquences codantes et du promoteur P2 est à peu près inexistante dans les régions en amont de RAR β 1.

En deuxième partie de notre travail (Chapitre 3), nous nous attardons à la spécificité de l'effet suppresseur de RAR β 2 dans les lignées pulmonaires. Suite aux travaux de Houle et al. (1993), trois possibilités se présentaient pour expliquer l'effet suppresseur observé dans les lignées épidermoïdes. Sachant que ces lignées expriment d'autres RARs (RAR α et RAR γ), la perte d'expression de RAR β implique une diminution du niveau global de RARs. Afin de déterminer si l'effet suppresseur observé lors de la transfection de RAR β 2 était dû à un rétablissement du niveau des RARs à un certain seuil, nous avons surexprimé l'isoforme RAR α 1 dans une de ces lignées. D'un autre côté, l'effet observé peut être spécifique à

RAR β mais comme il existe plusieurs isoformes et que ceux-ci ont en commun la majorité des séquences protéiques, nous avons exprimé l'isoforme fœtal RAR β 1 afin de déterminer si l'expression de n'importe quel RAR β pouvait médier l'effet suppresseur de l'acide rétinoïque. Finalement, l'effet suppresseur peut être spécifique à RAR β 2. La détermination de cet effet suppresseur est importante dans le cadre d'études moléculaires de la cancérogénèse pulmonaire car comme nous l'avons expliqué, différents récepteurs auront différentes capacités transcriptionnelles en termes de gènes cibles et de niveaux d'activation de ces cibles. Nous démontrons ici que cet effet est spécifique à RAR β 2 et que l'expression d'autres isoformes RAR ne peut médier un tel effet.

Sachant que les RARs sont des facteurs transcriptionnels agissant sur plusieurs processus physiologiques, la détermination de la spécificité de l'effet suppresseur nous amène à nous questionner sur l'amplitude de l'effet transcriptionnel médié par RAR β 2 et sur les cibles de cet effet transcriptionnel. Au chapitre 4, nous apportons certains éléments de réponse à ces questions. En utilisant une technique appelée RAP-PCR (voir chapitre 4), nous avons quantifié les effets transcriptionnels médiés par l'acide rétinoïque et les récepteurs RAR α 1, RAR β 1 et RAR β 2. Par la suite, nous nous sommes attardés à la recherche de gènes spécifiquement sous contrôle de RAR β 2 et qui pourraient être impliqués dans la médiation de l'effet de suppression de tumeurs. Nous présentons certains de ces candidats et décrivons leur implication potentielle.

Chapitre 2

Article #1

Structure of the Human Retinoic Acid Receptor β 1 Gene.

Publié dans

Biochimica et Biophysica Acta

Gene Structure and Expression

vol. 1309, pp. 1-4 (1996)

Short Sequence Paper**Structure of the Human Retinoic Acid Receptor β 1 Gene**

André Toulouse^{1*}, Johane Morin¹, Manon Pelletier¹ and W.E.C. Bradley^{1,2}

¹Institut du Cancer de Montréal, Centre de Recherche Louis-Charles Simard, 1560 Sherbrooke E., Montréal, Qc, Canada, H2L 4M1 and ²Département de médecine, Université de Montréal.

Corresponding author:

André Toulouse
Institut du Cancer de Montréal
Centre de recherche L.-C. Simard
1560 rue Sherbrooke E.
Montréal, Qc
H2L 4M1 (Canada)

tel.: (514) 876-5617

fax: (514) 876-5476

e-mail: toulousa@ere.umontreal.ca

Keywords: Retinoic acid receptor, Gene structure, 5'-untranslated regions

We report the isolation and characterization of genomic sequences coding for the 5' end of human retinoic acid receptor $\beta 1$, a fetal RAR isoform which is also expressed in small cell lung cancers. Primer extension analysis revealed a principal transcription start site with a secondary site 23 bp further upstream in both SCLC and fetal tissues. The sequences isolated were CpG-rich between -60 and the 3' end of the first exon but there were no features like a TATA-box or an Inr element. In several important aspects, the human RAR $\beta 1$ differs from its mouse counterpart. The 5'-UTR is 823 bp long and is encoded by four exons (vs two in the mouse giving a 477 bp UTR). The 5' end of the mouse cDNA has been mapped to a 67 bp CT repeat which is absent in our sequences. We were also unable to find evidence for a human isoform RAR $\beta 3$ which is widely expressed in mouse tissues.

Vitamin A is known to exert profound effects on many biological processes. It has been implicated in development, cell differentiation, cell proliferation and homeostasis. The major biologically active derivative of vitamin A, retinoic acid (RA) acts by binding to members of two families of ligand-dependent nuclear receptors, RARs and RXRs [1], which are part of the thyroid-steroid hormone receptor superfamily of nuclear transcriptional regulators. For each of these families (RARs and RXRs), three genes have been described called α , β and γ . From these genes several isoforms are generated by alternative usage of two promoters and alternative splicing such that each isoform differs from the others in its N-terminal A region. Different isoforms of the same gene may have different transcriptional capacities with respect to cell or tissue specificity as well as a promoter context specificity [reviewed in ref. 2].

In mouse, four isoforms of RAR β have been identified, two (β 1 and β 3) being expressed from an upstream promoter, P1, and RAR β 2 and β 4 from P2. Sequences of the β 2/ β 4 isoforms share a high degree of identity between mouse and human both in the 5'-UTR and in the proximal promoter region [3, 4]. The expression patterns appear to be similar between the species as well [4, 5]. However, the human cDNA encoding the A region of the RAR β 1 isoform was shown to have no significant homology with mouse in its 5'-UTR [6]. Furthermore, the expression pattern reported was different from that for the mouse and suggested a role for this isoform in the control of some genetic events in fetal cells and, interestingly, in small cell lung cancer [6]. More recently, Mendelsohn et al. [7] reported the isolation of the mouse RAR β 1 promoter regions. They found the 5' end of the cDNA to be constituted of a 67 bp CT repeat. These results combined with those of Houle et al. [6] showing a remarkable pattern of tissue- and tumour-specificity of expression prompted us to further investigate the structure of

the 5' region of the human $\beta 1$ gene. Here we report the isolation of three additional exons encoding the 5'-UTR of hRAR $\beta 1$ and describe the genomic organization of the RAR β gene located on chromosome 3p24 [8]. Three main differences with the mouse RAR $\beta 1$ were seen, namely the lack of a CT repeat, more exons (4 vs 2 in the mouse), and the lack of an exon corresponding to the mouse RAR $\beta 3$ -specific sequences.

Using an oligonucleotide designed from the known hRAR $\beta 1$ sequence (BRA 245 in fig. 1), we performed a 5' RACE-PCR (5'-AmpliFINDER™ RACE Kit, Clontech Laboratories) to isolate 385 bp of additional cDNA sequence. This codes for additional 5'-UTR of RAR $\beta 1$ since Houle et al. had already described the start codon in their published sequence [6]. We then isolated the genomic fragment containing the most 5' sequences of the RAR $\beta 1$ cDNA. Using the hRAR $\beta 1$ specific cDNA (the 5' RACE-PCR product) as a probe, we screened a λ FIX II (Stratagene) human placental DNA phage library, using standard protocols [9], and isolated a clone, called $\Phi 2B1$, with a 16 kb insert containing the exons encoding the 5' end of the cDNA isolated by the RACE-PCR procedure. An Eco RI fragment of 7.5 kb carrying these exons was subcloned into the pBluescript™ vector according to standard procedures.

We then designed an oligonucleotide complementary to sequences near the 5' end of the RACE-PCR product, (BRA 356 in fig. 1) and we performed a primer extension to localize the CAP site of the mRNA. Two sites were reproducibly found, 23 bp apart, in the SCLC line MM1 and also in two human fetal tissues (indicated on figure 1). There is no Inr element located at the vicinity of the +1 nucleotide of the principal start site. The nucleotide sequence of the region upstream of the first nucleotide of either start site revealed no consensus TATA-box (figure 1).

The sequence of the genomic fragment determined using primers located as described in the legend to figure 2, also revealed the 5' RACE-PCR product to be encoded by three exons. Two of these were carried in the Φ 2B1 phage insert, separated by a 3.4 kb intron. The existence of the third exon was inferred from the fact that sequence discontinuity occurred at base 370 of figure 1, when sequencing downstream from exon 2. Exon 3 was not located within the same genomic clone Φ 2B1, and is as yet uncharacterized. Thus we cannot be certain that exon 3 is indeed only one exon. The lack of cloned genomic sequence continuity between the RACE-PCR sequence and the established sequence carrying the initiating codon raised the formal possibility that the sequence obtained by the RACE-PCR procedure represented a PCR rearrangement. To eliminate this possibility, we performed a RT-PCR reaction on the SCLC cell line MM-1 and two fetal tissues (lung and kidney, 11 wks) using a 5' oligonucleotide located in exon 2 and a 3' oligonucleotide located in exon 4. The reaction gave the expected fragment corresponding to that obtained from the RACE-PCR product so we conclude that the latter represents authentic RAR β 1 sequences. Houle et al. [6] reported no significant homology between mouse and human in the 5'-UTR. In figure 1 we show that the introduction of gaps in both sequences allows their alignment creating short regions of high homology in the 5'-UTR. The fact that the introduction of these gaps allows the perfect alignment of the splice sites suggests that these homologies are biologically relevant.

The mouse RAR β 3 isoform is formed by the inclusion of an 81 bp exon between the RAR β 1 specific region and the first exon coding for the domains common to all isoforms [4]. In order to find evidence for the existence of this exon in human we examined several SCLC cell lines and human fetal tissues known to

express hRAR β 1 by RT-PCR, using a pair of oligonucleotides that would have amplified RAR β 3 had it existed [6]. None of the seven SCLC lines nor the ten fetal tissues (adrenals 14 and 18 wks, CNS 14 wks, heart 18 wks, kidney 14 wks, liver 11 wks, lung 14 wks, muscle 14 wks, skin 14 wks, spleen 18 wks) showed expression of this gene.

In the original description of the isoforms of murine RAR β , Zelent et al. [4] probed a Southern blot of human DNA with the mouse sequence specific for RAR β 1 and RAR β 3 and reported hybridization with a single band for each restriction enzyme used to digest the genomic DNA. One of these, Hind III, generated a 2.0 kb band which corresponded to a sequence which we have previously isolated [6] which carried what we now call exon 4. If a conserved human equivalent of the mouse RAR β 3-specific exon existed, the sequence would very likely be within the 2.0 kb Hind III fragment, downstream of exon 4, since no other band was illuminated on the blot probed by Zelent et al. [4]. This region, which was described in a previous report [6], was sequenced and analysed by Southern blot using an oligonucleotide specific for murine RAR β 3. No evidence was found suggesting sequence similarity between mRAR β 3 and the 2.0 kb Hind III fragment. Given the high level of interspecies conservation of all the other coding exons of RAR β 1, this suggests that the sequence in question may be absent from the human genome. Our above-described failure to find any RT-PCR bands characteristic of an exon analogous to the mouse β 3 exon corroborates this and we conclude that the isoform β 3 does not exist in humans.

Thus with respect to exon organization, expression pattern and the number of different protein products, human RAR β 1 differs substantially from the RAR β 1/ β 3 pair of receptors in mouse. Considering the important roles that RARs

play in development and homeostasis, this difference is intriguing. It is possible that functionally, RAR β 3 has been replaced in human by another RAR, thereby rendering the β 3 isoform dispensable. Alternatively, the mouse may have acquired the RAR β 3 isoform during its own evolution to perform some specific function. Analysis of this gene in other species may provide some resolution to this puzzle.

In figure 2, we present the updated structure of the hRAR β gene covering more than 100 kb and propose a new numeration for its exons. This work, together with the sequencing of a further 400 base pairs upstream of those shown in figure 1, represents a first step towards the characterization of the functional promoter for hRAR β 1.

Aknowledgements

This work was supported by a grant from the MRC of Canada to W.E.C. Bradley. The authors would like to thank Nathalie Gaudreault, from the sequencing facility of the Institut du Cancer de Montréal for technical assistance.

References

1. Leid, M., Kastner, P. and Chambon, P. (1992) *Trends Biochem. Sci.* 17, 427-433.
2. Chambon, P. (1994) *Seminars in Cell Biol.* 5, 115-125.
3. Nagpal, S., Zelent, A. and Chambon, P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 2718-2722.
4. Zelent, A., Mendelsohn, C., Kastner, P., Krust, A., Garnier, J.-M., Ruffenach, F., Leroy, P. and Chambon, P. (1991) *EMBO J.* 10, 71-81.
5. de The, H., Marchio, A., Tiollais, P. and Dejean, A. (1989) *EMBO J.* 8, 429-433.
6. Houle, B., Pelletier, M., Wu, J., Goodyer, C., and Bradley, W.E.C. (1994) *Cancer Res.* 54, 365-369.
7. Mendelsohn, C., Larkin, S., Mark, M., LeMeur, M., Clifford, J., Zelent, A. and Chambon, P. (1994) *Mech. Dev.* 45, 227-241.
8. Mattei, M.-G., Rivière, M., Krust, A., Ingvarsson, S., Vennström, B., Quamrul Islam, M., Levan, G., Kastner, P., Zelent, A., Chambon, P., Szpirer, J., Szpirer, C. (1991) *Genomics* 10, 1061-1069

9. Sambrook, J., Fritsch, J. E. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York,.

10. van der Leede, B.M., Folkers, G.E., Kruyt, F.A.E., van der Saag, P.T. (1992) Biochem. Biophys. Res. Comm. 188, 695-702.

Footnote to title page

*Corresponding author: fax: (514) 876-5476, e-mail: toulousa@ere.umontreal.ca

Genbank accession numbers: U49855, U52075, U52076.

Abbreviations: RA: retinoic acid, RAR: retinoic acid receptor, RXR: retinoid X receptor.

Figure 1: Sequence comparison of the 5' ends of human (h) and mouse (m) RAR β 1 cDNAs. The filled arrow indicates the principal transcription start site (+1 nucleotide in bold), and the open arrow the secondary site as determined by primer extension using a complementary oligonucleotide (BRA 356). Upstream of the +1 nucleotide are the proximal bases of the putative P1 promoter (note the absence of consensus TATA box or Inr element in the promoter). BRA 245 was used to perform the 5' RACE-PCR described in the text. The open triangles indicate the splice sites deduced from the genomic fragment (see fig. 2) and the open circle indicates the junction of mouse exons 1 and 2 (from ref. 7). Exon 4 represents the sequences isolated by Houle et al. (the initiating codon is in bold) (6). Six short ORFs were found, beginning at nucleotides 259, 470, 516, 643, 661 and 778.

→

-50 AGGGGCAGCAACCAGAGCAGCAGCAGTGGCAGCAGTAGCAGGCGCCGGCC h

1 → **E1**
 1 GCCGCCGCGCTCCGGCTCAGCTCACGCGGAAACCCCACTGGGGCCCGTC h

51 GTGGCTCCGCGCGGTTGCGGGCCAGCGTGGAGAGGCTGGGACCGTGGCGC h

101 CCGGGGGCGGGGGCCTGGCGCCAGGGGGCGGGGCGCAGCGAGCCGGGCTC h

151 CCGCTGTCTGCTCTCAGCGGCGGCGGCAGGGGCTGAGGCACAGCCAGCGG h

BRA 356 ▽ **E2**

201 CGGCCCGCGCGGACTCCAAGGCAGCCCGCCAAAAGTGTGGCTTCTGCCTC h

251 CACCGCTTATGAAAACAACCTTCTCTTGACGTCAGCAGTGACTIONACTGAGCA h

301 GCGATCTGCACTCTTACTCAACTTCTTGAAGCATTGGACAGAGCTGACTC h
 t..ct... m

▽ **E3**

351 -GTCCTT-TTTCTGTCATAAGATTCTTGAACATC-ATCATAAAAAGACAG h
 9 tc..t..c.e...c..tctctc.ct..ctctc..tc..tctctctc.tc m

398 TCAC-CAGTCCTGCTCATCTGGAGGACTGTTCTCACAACTTTCAGCAAGG h
 59 ..t.t.tc....t.ctc...t.-cct....c.....g.g.-g..t-... m

447 AGATAAACAGAGTACTGCAGAGATGA-AGTAACTTGCC-CTAAGACCCA h
 106 --c.gtg.cc.-.....gt.tctcc.c..c-.t.....ag.tgt..a.. m

495 TACCTGAGTATAATTTTCTGAATGTGCAGTTCAACCACTTCATACTGAAG h
 152 -.t.--...c.ccgga.agc.c...t.cc..g.t.gcc.-.c.---. m

▽ **E4**

545 AATTAACAGCTCTGAAATTTGAAGGTG-CTAGTGTCTCACTGGTCTTAAA h
 194 |G.....c...g.....tg.a..a.c.c.c.c.-gaac.c...g m
 mouse E2

BRA 245

594 CTGCGAAGCTGG--A-C--GAC-GAA--AGCATCCTTCCTGTAATCAGTG h
 243 ..g.c.....gc.g.tg.c.a.c.cc.....t...t.aa m

636 TAGCAAATGACAGGCAGAGAAACCATGCTGGGAAGAAGCAAGGTCATCA h
 293 a.....gg..a.....gc..c.....g.....c.....tg m

686 GTTGAACCATCTTGACTTTGGCCCAGAACACAGCTCAGCCTCAACTCCTG h
 342 .a....tgtg....-.....-a...g..tttct.t.ttgagcctgtt.. m

736 CAGTGCATTTGCCTCCCTCACTTTGGTTTAAGACCTGGAGTGATGTGTTC h
 390 ..-ca..c.ca..a..t..tg.g..a..ctg.....t...a.....gt m

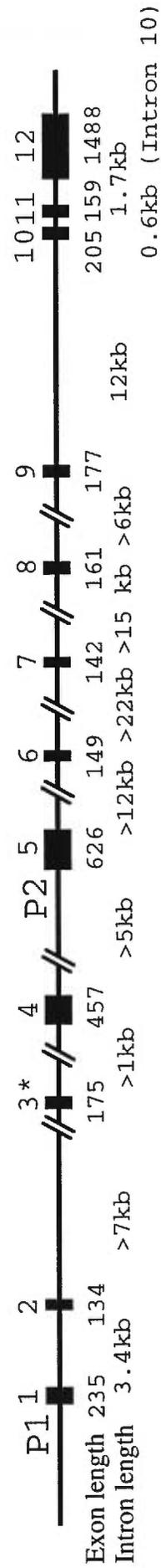
786 CTGCTCCAGAGCACCTTTCTTTCTGTGAGGCCCGAAAC**ATG**... h
 439 .ca.c.tg.....tgg..c...a...a...t...g..... m

Figure 2: Genomic structure of the hRAR β gene. A) The intron-exon boundaries are shown. Note the presence of consensus splice sites at each boundary (introns are in lower case and exons in uppercase). Boundaries were determined by sequencing subclones of F2B1 using as primers BRA 331 corresponding to nucleotides 183 to 201, BRA 309 corresponding to nucleotides 266 to 284, and BRA 355 which is complementary to BRA 309. Exon 3 was not present on the genomic fragment carried by F2B1. B) Schematic of the structure of the hRAR β gene. P1 indicates the RAR β 1 promoter and P2 is the RAR β 2/ β 4 promoter. Exons are represented by black boxes and lengths are shown in base pairs. Exons 1 to 4 encode the RAR β 1 specific sequences while exon 5 is the β 2/ β 4 A region and exons 6 to 12 are common to all RAR β isoforms. Intron lengths are approximate [Some data are from ref. 10]. Since genomic sequences carrying exon 3 have not been cloned, we cannot be sure that exon 3 is indeed a single exon. Intron lengths are to scale where information is known. Exon lengths are to a different scale from intron lengths.

A

ACCEPTOR SITE	EXON	DONOR SITE	INTRON
Promoter... GCCGCC	Exon 1	CAAAAGgtaaagcca	Intron 1
tgtctgtcctcctccagTGIGGC	Exon 2	CATAAGgtatatctt	Intron 2
ATTCTCT	Exon 3	CTGAAG	Intron 3
ttcatttttttcttacagAATTAA	Exon 4	CGGCAA	Intron 4

B



* Not unequivocally determined

Chapitre 3

Article #2

**RAR β 2 specificity in mediating RA inhibition of growth of
lung cancer-derived cells.**

soumis à

Cancer Research

RAR β 2 specificity in mediating RA inhibition of growth of lung cancer-derived cells.¹

André Toulouse, Johane Morin and W. Edward C. Bradley².

Institut du cancer de Montréal, Centre de Recherche du CHUM, Pavillon Notre-Dame, 1560 Sherbrooke E., Montréal, Canada, H2L 4M1 [A. T., J. M., W.E.C. B.] and Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada [W.E.C. B.].

Running Title: RARs in suppression of lung cancer cell line growth.

Keywords: lung cancer, growth suppression, retinoic acid, receptors, RAR β

Footnotes:

¹ This work was supported by funds from the Medical Research Council of Canada and Fondation Notre-Dame to W.E.C.B. A. T. was supported in part by the Défi Corporatif Canderel.

² To whom requests for reprints should be addressed, at Institut du cancer de Montréal, Centre de Recherche L.-C. Simard, 1560 Sherbrooke E., Montréal, Qc, Canada, H2L 4M1

³ The abbreviations used are: bp, base pair(s); FBS, fetal bovine serum; NSCLC, non-small cell lung carcinoma; RA, retinoic acid; RAR, retinoic acid receptor; SCLC, Small cell lung carcinoma.

⁴ J. Bérard, Personnel communication

Abstract

Retinoic acid receptor β has been repeatedly shown to be capable of mediating the growth suppressive effects of retinoic acid in several epithelial tumor-derived cell lines. In particular, it has been shown that transfection of RAR β 2 in epidermoid lung tumor cells could reduce their *in vitro* growth rate in the presence of retinoic acid and *in vivo* tumorigenicity. The question remained as to the isoform specificity of this effect. To investigate this, we transfected RAR α 1, RAR β 1 and RAR β 2 into the epidermoid lung cancer cell line Calu-1 and assessed the *in vitro* growth capacities of the transfected cells. Neither an augmentation of RAR α 1 levels or expression of the fetal RAR β 1 isoform could mimick the effect of RAR β 2. In addition we analyzed the expression of another RAR isoform, α 2, in many tumor-derived lines and conclude that RAR α 2 is not involved in retinoic acid growth suppression of lung cancer. Thus our data suggest that the suppressive effect of RAR β 2 is isoform specific.

Introduction

Retinoic acid (RA) is the major biologically active derivative of vitamin A (retinol). It exerts profound effects in the control of many vertebrate biological processes such as development, cell proliferation and differentiation as well as homeostasis (1). It has been shown that RA (or its absence) can play a role in several pathological processes, including cancer. The early experiments of Wolbach and Howe (2) showed that rats supplied with a vitamin A-deficient diet undergo epithelial metaplasia of the trachea which is reversible upon addition of vitamin A to the diet. More recently, it has been shown in several clinical trials that treatment of patients with retinoic acid and other retinoids could either induce a regression of the disease or prevent the appearance of second primary lesions in various carcinomas (for review see ref. 3). It has also been shown that RA can inhibit the growth of several tumor-derived cell lines in culture (4) and this phenomenon is often studied as an *in vitro* surrogate for the *in vivo* effect of tumor suppression.

Retinoic acid acts via two families of ligand-activated nuclear receptors, the retinoic acid receptors (RAR) and the retinoid X receptors (RXR) which have different affinities for the various natural and synthetic retinoids (5). These receptors are members of a superfamily of nuclear hormone receptors and are transcriptional activators which typically function as heterodimers following the binding to their ligand. Once dimerized, the receptors will bind to cognate DNA sequences called RA response elements (RARE), located in the promoter region of specific genes to modulate their transcription. Three genes have been cloned for each family, RAR α , β and γ as well as RXR α , β and γ , and various isoforms are generated from each gene by usage of two promoters (P1 and P2) and alternative splicing (5). These isoforms are highly conserved between mouse and human with the exception of RAR β 3 for which there is no evidence of its existence in human (6).

An important question is, of all these receptors and their isoforms which one is involved in mediating the tumor suppressive effect of RA, or do they all have this ability? The high degree of similarity of the RARs coupled with their apparent capacity to compensate for each other in knockout mice (7) suggests that promoters which are specifically activated by one RAR but not by the others are few in number. This is supported by the paucity of reports of such promoters (8).

Nevertheless, there have been considerable efforts made to assess the various roles of RA receptors by introducing these receptors into tumor-derived cell lines, and determining the effect on the phenotype. The parameter most frequently measured is the level of the antiproliferative effect of pharmacological concentrations of RA in culture medium. Other endpoints include the reduction in *in vivo* growth in nude mice or anchorage independent growth although some tumor-derived lines are unsuitable for these assays since they grow poorly in these respective conditions. Most reports conclude that RAR β is most closely involved in the suppression of the tumor-related phenotype; thus RAR β is not expressed in many epidermoid lung (9-12), breast (13-16), kidney (17) and head and neck (18) derived tumor lines. In 1993, Houle et al. first demonstrated that transfection of RAR β 2 into epidermoid tumor-derived cell lines (namely Calu-1 and NCI-H157) reduced their *in vitro* growth capacities and *in vivo* tumorigenicity (19). Expression of this receptor in the other systems described above has also been reported to reduce anchorage independence (20, 21) and to promote the antiproliferative effect of RA (20-22). In many, but not all of the tumor-derived cell lines which do not express RAR β , the gene can be reactivated by treatment with pharmacological concentrations of RA via a RARE in the P2 promoter. Interestingly, in both lung (10) and renal tumor lines (17) it is those lines which respond to RA by upregulation of RAR β which are

subject to growth inhibition by RA. It has also been shown in breast cancer derived cell lines that the antiproliferative effects of RA are mediated by inducing the RAR β 2 promoter (23).

It is apparent that RAR α is also involved in RA growth inhibition in at least some cases. Breast cancer-derived lines which are susceptible to RA antiproliferative effects express higher RAR α levels than those which are not susceptible (14, 16). Overexpressing RAR α in one of the latter lines converted it into a line sensitive to RA inhibition (24, 25), although Liu et al (23) subsequently showed that this growth suppression is very likely mediated by turn-on of endogenous RAR β expression by the transfected RAR α . No direct experiments have been reported to test the possible participation of RAR α in suppression in other tumor systems, so this question is unresolved.

Further complicating the issue is the existence of multiple isoforms of each gene. Among the four known RAR β isoforms, RAR β 2 is generally thought to be the key tumor suppressor in humans (13, 19, 21, 26, 27), but the possibility remains that RAR β 1 is also involved. For example, this isoform together with RAR β 3 has been implicated in lung tumorigenesis in mice since tumors developed in animals expressing antisense sequences to RAR β 1/ β 3⁴ as well as to RAR β 2 (28). RAR β 3 probably does not exist in the human genome (6), and the RAR β 1 expression pattern suggests it is a fetal isoform (29), but no direct tests of the effect of the latter on tumor cell phenotype have been published. The fourth known isoform, the truncated RAR β 4, is associated with tumorigenicity in humans and mice (30), so it is unlikely to have a tumor suppressor activity.

The situation is also unclear for the two isoforms of RAR α . It is not yet known what the respective patterns of expression are in human tissues and cancer-derived cell lines since studies have typically focused on detecting sequences common to both isoforms rather than the 5' sequences which are isoform-specific. In the absence of this information, it is difficult to eliminate or include either of these receptors when assessing potential tumor suppressor activity.

The results generated by different groups generally point to RAR β as being the key suppressor RAR but the possibility remains that other RARs could be involved. Specifically, we have focused on the lung epidermoid cancer cell line Calu-1 which has lost expression of RAR β but retained expression of RAR α and RAR γ when compared to normal lung (9). In the present work, we have asked whether altering the RAR status of the Calu-1 cell line by transfection with expression plasmids carrying either RAR α 1 or RAR β 1 has an effect on RA responsiveness. The suppressive effect observed in earlier work could have been mediated by any RAR such that overexpression of one of them (RAR α 1 in the present work) should mimic this effect. On the other hand, the effect could be RAR β specific, since the isoforms generated from one gene share most of their sequences with the exception of the amino-terminal domain; in this case the expression of RAR β 1 should have the same effect as RAR β 2. Here we show that only transfection of RAR β 2 could mediate the growth suppressive effect of RA on the Calu-1 cell line *in vitro*. Further, we present expression data on several cell lines and normal tissue which suggest that RAR α 1 and α 2 do not have markedly different roles in tumor suppression. Taken together, these results point to RAR β 2 as the principal RAR involved in mediating the growth suppressive effect of RA in these lung derived cells.

Materials and methods

Cell culture and transfection

The Calu-1 cell line and its transfected derivatives were maintained in alpha medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Burlington, Canada) and 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL, Burlington, Canada) at 37°C in a humid atmosphere provided with 5% CO₂.

Cells were cotransfected with the neomycin resistance gene carried in pAG-60 (33) and either RAR α 1, RAR β 1 or RAR β 2 cDNA expression plasmids (called pAT-101, pBH22 and pBH4 respectively). The pAT-101 construct was made by inserting a 2101 bp Eco RI-Bam HI RAR α 1 (34) fragment into the Sma I site of the pSVL vector (Pharmacia, Baie-d'Urfé, Canada) after blunting the cohesive ends using Klenow fragment (35). pBH-4 was made by inserting a blunted 1708 bp Bam HI-Hind III fragment from plasmid pBLhRAR β (36) in the Sma I site of pSVL. pBH22 was constructed by amplifying the isoform-specific 5' sequences of RAR β 1 with one oligonucleotide from the 5'-untranslated region (29) carrying a Hind III site (5'-ACTGACTAAGCTTAAGACCTGGAGTGATGTGT-3') and the second carrying the Xho I site in the domain common to all RAR β isoforms (5'-GCAGGGTTTGTACTCGAGG-3'). This was cleaved with Xho I and ligated with a Xho I-Hind III fragment from pBLhRAR β (36). It was then digested with Hind III and cloned into Hind III digested pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), sequenced to ensure that no mutations were introduced, and then cut out with Hind III, blunt-ended and cloned into Sma I-digested pSVL as above.

For transfection, 20 X 10⁶ cells were harvested by trypsinization and resuspended in 300 μ l of Opti-MEM serum-free medium (Gibco BRL, Burlington, Canada). In a separate tube, 10 μ g of the RAR expression plasmid and 5 μ g of pAG-60 were

pooled in 150 μ l of Opti-MEM while 100 μ g of cationic liposomes (Lipofectin, Gibco BRL, Burlington, Canada) were diluted in 150 μ l of Opti-MEM. The two fractions were mixed and incubated at room temperature for 15 minutes to allow for the formation of DNA-liposome complexes and then mixed with the cells. After 15 minutes the cells were plated in four 150 mm dishes. Two days after transfection, cells were placed in selection medium containing G418 (Gibco BRL, Burlington, Canada) at 800 μ g/ml.

Analysis of G418 resistant clones

G418-resistant clones were expanded and analysed for integration of the expression plasmid. Genomic DNA of the selected clones was extracted according to standard procedures (34). Using an oligonucleotide designed in the Vp1 intron of the pSVL vector (5'-AAGTGCTCCTCAGTGGATGT-3') and an oligonucleotide designed from either the RAR α 1 (5'-CTGGGCACTATCTCTTCAGAACTGCTGCTCTGGGTCTCAATGGT-3') or RAR β 1 (5'-CATGTGTCCGTTCACTGCTG-3') cDNAs, we performed a polymerase chain reaction on approximately 200 ng of the genomic DNA. Cytoplasmic RNA was extracted from the clones which had integrated the expression vectors, using the method described by Berk and Sharp (37). cDNAs were generated according to a standard protocol using random hexamers as primers (38). The transfected lines were subsequently analysed for RAR α 1 overexpression or RAR β 1 expression by ³²P-labelled PCR. Two oligonucleotides located in the cDNA were used to amplify a 328 bp RAR α 1 fragment (5' primer: 5'-CTTCTGACTGTGGCCGCT-3', 3' primer: 5'-GAGGACTTGCCTGACAGA-3'). For RAR β 1 transfectants, we used a 5' oligonucleotide located in the leader sequences of pSVL (5'-GTTAAGGTTTCGTAGGTCATG-3') and a 3' oligonucleotide specific to RAR β 1 (5'-CATGTGTCCGTTCACTGCTG-3') which

give a 317 bp fragment. A PCR internal control (human ribosomal S14 mRNA) giving a 143 bp fragment was amplified in the same reactions (5' primer: 5'-GGCAGACCGAGATGAATCCTCA-3', 3' primer: 5'-CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC-3'). The reaction products were run on a 5% denaturing polyacrylamide gel (35) and autoradiographed overnight on Kodak X-OMAT films. Relative expression levels were estimated by visually comparing band intensities. RAR β 2 transfectants were isolated in previous experiments and described by Houle et al. (19).

Cell growth assay

For growth experiments, the parental cell line Calu-1 and two independent clones from each transfection experiment were used. Briefly, 5×10^4 cells were seeded, in duplicate for each time point, in 60 mm culture dishes. The culture medium was as described above, supplemented or not with all-trans retinoic acid (Sigma, St-Louis, MO) at a final concentration of 100 nM (19). Every two days (at days 2, 4, 6 and 8), the cells were counted using a hemacytometer. Each experiment was repeated at least two times. To determine growth rates in medium with RA-depleted serum, FBS was treated with dextran-coated activated charcoal (Sigma, St-Louis, MO) as described by Aakvaag et al. (39).

Determination of the expression profile of RAR α

To differentiate between RAR α 1 and RAR α 2 isoforms, we performed a semi-quantitative PCR assay on previously generated cDNAs using an oligonucleotide in the RAR α 1 A region (5'-CTTCTGACTGTGGCCGCT-3'), one in the RAR α 2 A region (5'-TCGAGGGGAAAGATGTACG-3') and a third in the region common to both isoforms (5'-GAGGACTTGTCTGACAGA-3'). Amplifications were performed using the ribosomal S14 gene as control. The reaction product was

ethanol precipitated, electrophoresed on a denaturing polyacrylamide gel and autoradiographed overnight on Kodak X-OMAT X-ray films.

Results

Isolation of RAR α 1-overexpressing and RAR β 1-expressing derivatives of Calu-1 cells.

In order to investigate whether the suppressive effect of transfected RAR β 2 in Calu-1 cells was due to an isoform specific effect or simply due to higher levels of RARs, the RAR α 1 and RAR β 1 cDNAs were placed under the control of the SV40 late promoter in the pSVL vector (pAT-101 and pBH-22 constructs respectively, see Materials and Methods) and co-transfected with a neomycin resistance plasmid (pAG-60) into Calu-1 cells. The cells were placed under G418 selection for three weeks and colonies resistant to the drug were isolated.

Forty-eight G418-resistant colonies were isolated from the RAR α 1 transfection and analysed for integration of the transgene. By genomic PCR, we showed that 12 of these clones had integrated the RAR α 1 overexpression vector as demonstrated by the amplification of a 375 bp fragment using an oligonucleotide specific for the expression vector and an oligonucleotide specific to RAR α (results not shown). We then carried out a radioactive PCR to assess the levels of total RAR α 1 expression (endogenous and exogenous) in these cells and showed that three clones effectively overexpressed RAR α 1 by a factor of 2 compared to Calu-1 (results for C α 33 and C α 43 shown in Figure 1A).

Following a similar strategy, we isolated 28 G418 resistant clones from the RAR β 1 transfection, of which 19 had integrated the RAR β 1 expression plasmid (pBH-22) as demonstrated by genomic PCR using an oligonucleotide specific for intronic

sequences of the pSVL vector and a primer specific for RAR β 1. These transfected clones were screened by radioactive PCR for RAR β 1 expression using primers specific for the transgene (see Materials and Methods) and nine of them were found to express the transgene at different levels (Figure 1B), whereas they still had no detectable message of the endogenous RAR β isoforms as did the Calu-1 parental cells (not shown). Of these, clones C β 3, C β 10 and C β 38 were used for subsequent assays.

Cell Growth Assay

As previously mentioned, one of the hallmarks of the suppressive effects of RA is its capacity to reduce the *in vitro* growth rate of various cell lines. Thus, to determine if the transfection of the various cDNAs into Calu-1 cells had an effect on *in vitro* growth rate, we selected a few clones of each transfection (Cneo, C α 33, C α 43, C β 3 C β 10 and C β 38) and compared their *in vitro* growth rates to those of the parental cell line, Calu-1. Fifty thousand cells were seeded (in duplicate for each time point) in 60 mm culture dishes in the presence or absence of retinoic acid at 100 nM and counted every two days. Figure 2 shows mean results obtained from at least 2 experiments and in some cases up to 6 experiments.

In order to reproduce the results described earlier (summarized in Table 1) we used a previously described RAR β 2-expressing clone (C19) (described in ref. 19) and another not previously characterized (C59). The expression of RAR β 2 by itself had some inhibitory effect on the growth of the transfectants but addition of 100 nM RA resulted in a significant greater growth reduction (compare C19 to C19 RA in Table 1 and C59 to C59 RA in Figure 2 and Table 1). The addition of RA to the growth medium of Calu-1 cells did not have the marked effect observed with C19 and C59 indicating that the RA effects are mediated by the expression of RAR β 2. Similar

results were previously obtained with two of three other RAR β 2 transfectants isolated by Houle et al. (Table 1). The third, C57, exhibited less RA sensitivity but even here the effect was substantial, considering that in these experiments RA actually enhanced growth rates of Calu-1 and the control neo transfectant C30 (Table 1).

We also performed growth experiments on RAR α 1-transfected Calu-1 cells. Since these cells express the RAR α gene together with the RAR γ gene, the transfection resulted in overexpression of the α 1 isoform (Figure 1A). Although the two RAR α 1-transfected lines (C α 33 and C α 43) grew slower than the parental Calu-1 line, in every one of four independent experiments there was no effect on growth rate when 100 nM RA was added to the medium (Figure 2 and Table 1). It is noteworthy that in this series, a clone transfected with the neomycine resistance gene alone (Cneo in Table 1) also exhibited a growth rate slower than that of the Calu-1 cell line. These results suggest that the overexpression of RAR α 1 is not sufficient to elicit a growth response to retinoic acid in the Calu-1 cells. In another series of experiments RA-depleted serum was used, and although C α 43 growth rate was slightly faster than in normal medium, the addition of RA had an accelerating effect on the growth of this transfected derivative (Table 1). This accelerated growth rate further strengthens the argument against a role for RAR α 1 in the mediation of RA growth suppression. It is probable that clonal variation in growth rates explains, at least in part, the difference seen with C α 33 and C α 43 especially since one clone carrying the neomycin resistance gene only (Cneo in Table 1) has a slower growth rate than the parental cell line.

Using three RAR β 1-transfected derivatives of Calu-1, we compared their *in vitro* growth rates to the parental line in order to determine if any retinoic acid receptor β

isoform could have a tumor suppressive effect as RAR β 2 did. As shown in Figure 2 and Table 1, Calu-1 cells transfected with the RAR β 1 expression vector (C β 3, C β 10 and C β 38) showed no modification of their growth characteristics when compared to Calu-1 cells grown under the same experimental conditions. In Table 1, the C β 38 derivative has a slower growth than the others but this rate is comparable to what was obtained for Calu-1 in the same experiments. The addition of 100 nM RA into the medium had no effect on the growth rate of any of these RAR β 1-transfected cells (Figure 2 and Table 1).

RAR α isoforms expression pattern in human cancer cell lines

It has previously been demonstrated that epidermoid lung cancer cell lines show a preferential loss of expression of RAR β 2 rather than other RARs (9, 11, 12). Several groups reported RAR α to be almost ubiquitously expressed in human tissues and cell lines but made no attempts to differentiate between RAR α 1 and α 2 isoforms. In the absence of data differentiating the α 1 and α 2 isoform expression, no conclusion could be drawn to rule out (or in) either isoform in mediating the suppressive effect of RA. To approach this question, we examined the expression profile of RAR α 1 and α 2 in various cell lines and normal lung, using a RT-PCR assay similar to the one described by Bérard et al. (30) (some results shown in Figure 3). No obvious trend could be deduced from this experiment. Table 2 shows that RAR α 1 is expressed in all cell lines and tissues while RAR α 2 is present only in a subset (including normal lung) but this subset has no discernable properties in common. In particular, α 2 mRNA was detectable in some SCLC (MM-1) but not others (RG-1) and a similar lack of trend was seen with non-SCLC. It is noteworthy that although a retinoic acid responsive element (RARE) is present in the promoter of RAR α 2, no reproducible effect of RA was seen on α 2 message levels (Table 2, e.g. NCI-H125 and LC-T). To determine whether altering the RAR

status of Calu-1 cells would affect RAR α 2 expression, the latter was also measured in the transfectants described above as well as the RAR β 2 expressing clones C19 and C64 (Table 2). In the absence of supplementary RA added to the medium, RAR α 2 was not detectable above a trace level in the parental line or any of the derivatives, while the addition of 100 nM RA induced the promoter to low but easily detectable levels in all lines except for C α 43 and C β 10.

Discussion

The experiments described here were planned to test directly the possibility that RAR β 2 is unique among RA receptors with respect to mediating the growth suppressive effect of RA on tumor cells. Although RAR β 2 has been frequently implicated in this effect, no clear comparison of RAR α vs β , or other β isoforms vs β 2 has been reported, and the possibility that RAR α 2 is involved has not even been addressed.

The Calu-1 cell line in which the suppressive properties of RAR β were best demonstrated was transfected with varying degrees of success. RAR α 1 and RAR β 2 gave a low efficiency with approximately 7% of the G418 resistant cells expressing the transgene. On the other hand, the transfection of RAR β 1 into Calu-1 cells resulted in a higher efficiency with 32% of the G418 resistant clones expressing the transgene. Although these experiments were not designed to assess directly the ability of cells to tolerate these exogenous sequences, the numbers suggest that there may be a selection against the expression of RAR β 2 and overexpression of RAR α 1, which in turn suggests that these genes can exert a negative influence on growth. This may appear to be at odds with our conclusion that RAR β 2 is uniquely capable of RA-mediated growth regulation. It may be that RAR α 1 acts via a different inhibitory mechanism (not involving RA stimulation)

from that governed by RA-activated RAR β 2 involving different target genes and/or co-factors. An alternative explanation is suggested by the conclusions of other laboratories (23, 31) that RAR α transfection exerts its inhibitory effect through upregulation of RAR β 2 which would be the direct mediator of the growth inhibitory effects of RA. If this was the explanation for the reduced yield of RAR α transfectants in our experiments, then the limited number of such clones we did isolate would be those which had overcome this RAR β 2 upregulation. This conclusion is in agreement with our finding that none of these RAR α clones expressed RAR β (data not shown). This scenario is in agreement with our overall conclusion regarding the specificity of RAR β 2 as being the principal RAR involved in the mediation of the growth suppressive activity of RA.

Several experimental approaches have now confirmed the importance of RAR β 2 in growth control. Previous results from our laboratory showed that in epidermoid lung cancer cell lines this isoform conferred a slower growth rate and a reduced tumorigenesis in nude mice (19). Li et al. recently showed that overexpression of RAR β 2 in mammary cancer cell lines resulted in a diminution of the growth rate and of the anchorage independence (20). Furthermore, it has been shown that in oral premalignant lesions (leukoplakia), RAR β 2 expression is associated with reversal of the disease (26). Moreover, in the breast and cervix tumor systems, RAR β 2 is the key receptor in mediating the suppressive effects of RA (23, 31). In this report, we confirm, using two clones expressing the RAR β 2 transgene, that the growth suppressive effects of RA are mediated through RAR β 2 expression since no inhibitory effect of RA was seen in Calu-1 cells.

The 2-fold overexpression of RAR α 1 into the Calu-1 cell line resulted in a reduced growth rate as seen for C α 33 and C α 43. However, the addition of 100 nM RA had

no effect on the rate of growth which suggests that this effect is independent of the retinoic acid activated function of the RAR introduced in the cell line. If a retinoid receptor is involved in the mediation of the RA growth effect, this effect is expected to be amplified by the addition of pharmacological doses of RA (100 nM in this case). However the slower growth rate observed for the two derivatives could have been mediated by the residual RA present in the fetal bovine serum used in cell culture. To assess this, we grew the cells using Dextran-coated activated charcoal which depleted the serum of its free retinoic acid (32). The cells grown under these conditions had the same growth rate as the parental cell line Calu-1; the addition of RA had no inhibitory effect and in fact accelerated growth. We conclude from these growth experiments that RAR α 1 does not mediate the growth inhibitory effect of RA in the Calu-1 cells. Indeed it is possible that RAR α 1 has no direct suppressive effect given that in the one system where its overexpression had this effect (breast cancer cell lines), it has been shown subsequently to be mediated through induction of RAR β (23).

RAR β 1 has previously been described as a fetal isoform which is also expressed in small cell lung cancers; it is not expressed in Calu-1 cells (29). The introduction of an expression vector for this isoform into these cells had no effect on their growth capacities. The addition of 100 nM RA did not have any further effect, and we conclude that RAR β 1 does not have an effect on cell growth, at least in epidermoid lung cancer cell lines. Hoffman et al. recently showed that RAR β 1 expression correlates with the growth inhibitory effects of RA in renal cell carcinoma (17). In their analysis of twelve cell lines, they detected expression of RAR β 1 in the sole cell line which was responsive to RA and concluded that this was a cause-effect relationship. RAR β 2 was detected in all twelve lines but only by RT-PCR, indicating that the message level was very low. Importantly, the only line which

was growth inhibited by RA was also the only one in which RAR β 2 was induced to high levels, and this happened to be the RAR β 1 expressing line. We propose an alternative to their hypothesis (above) namely that RAR β 2 was the important receptor, and RAR β 1 may only be instrumental in turning-on RAR β 2 in the renal carcinoma system. To our knowledge, no demonstration of an inhibitory effect has yet been undertaken for the RAR β 1 isoform.

Since no previous studies attempted to differentiate between the α 1 and α 2 isoforms in light of their potential implication in tumor suppression, we determined their relative expression profile in lung cancer cell lines. As seen in Table 2, no obvious trend could be deduced from our experiments. RAR α 1 was ubiquitously expressed as reported in other experiments although at variable levels. RAR α 2 was expressed in some but not all cell lines. The RAR α 2-expressing cell lines have no properties in common, they are part of the SCLC or NSCLC classes, are from different histological types and most importantly show different growth properties. We therefore consider it unlikely that this isoform is involved in tumor suppression.

As we described above, the P2 promoter of each of the RAR genes contains a retinoic acid responsive element which is responsible for the induction of the α 2, β 2 and γ 2 isoforms respectively upon addition of RA to the cells. It is thus noteworthy that in our experiments with Calu-1 transfected cells we were able to detect the RAR α 2 message after RA treatment but not prior to it, suggesting the functionality of the RARE in the P2 promoter. On the other hand, a RT-PCR analysis on these transfectants treated or not with 100 nM RA did not allow us to detect RAR β 2 (not shown), suggesting that the RAR β promoter has lost its RA responsiveness. These results strongly point to a differential activation mechanism of the promoters for RAR α 2 and RAR β 2. Overexpression of any RAR (α 1, β 1 or β 2 in this case) is

sufficient to activate the RAR α 2 responsive element but the β 2 element may need some additional cofactors or may be occupied by some repressor which does not act on the α 2 promoter. This could also explain the apparent discrepancy between the renal carcinoma system and the lung system regarding RAR β 2 induction by RAR β 1 (17), as discussed above. In light of the established correlation between RA inducibility of RAR β 2 and RA growth suppression in a large collection of tumors (10), this discordance between inducibility of α 2 and β 2 further strengthens our conclusion that α 2 is not an important isoform for growth suppression.

Altogether, our results show that the suppressive effect of RA observed when transfecting RAR β 2 in epidermoid lung cancer cell lines cannot be mimicked by simply augmenting expression of a RAR which is already expressed nor by substituting RAR β 2 with another β isoform. The conclusion of this work that RAR β 2 is indeed the key RAR in mediating the suppressive effects of RA underline the importance of determining what genes it is specifically regulating.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr Rashmi Kothary and Dr Benoit Houle for critical comments and the Services audiovisuels of Notre-Dame Hospital. We also thank Benoit Houle for the gift of the pBH-22 plasmid.

REFERENCES

1. Gudas, L. J. Retinoids and vertebrate development. *J. Biol. Chem.*, 269: 15399-15402, 1994.
2. Wolbach, S. B., and Howe, P. R. Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin. *J. Exp. Medicine*, 42:753-777, 1925.
3. Lotan, R. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.*, 10: 1031-1039, 1996.
4. Lotan R. Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 605: 33-91, 1980.
5. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.*, 10: 940-954, 1996.
6. Toulouse, A., Morin, J., Pelletier M., and Bradley, W. E. C. Structure of the human retinoic acid receptor β 1 gene. *Biochim. Biophys. Acta*, 1309: 1-4, 1996.
7. Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their roles in real life? *Cell*, 83: 859-869, 1995.
8. Aoudjit, F., Brochu, N., Morin, N., Poulin, G., Stratowa, C., and Audette, M. Heterodimeric retinoic acid receptor- β and retinoid X receptor- α complexes stimulate expression of the intercellular adhesion molecule-1 gene. *Cell Growth & Differ.*, 6: 515-521, 1995.

9. Gebert, J. F., Moghal, N., Frangioni, J. V., Sugarbaker, D. J., and Neel, B. G. High frequency of retinoic acid receptor β abnormalities in human lung cancer. *Oncogene*, *6*: 1859-1868, 1991.
10. Gerardts, J., Chen, J.-Y., Russell, E. K., Yankaskas, J. R., Nieves, L., and Minna, J. D. Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. *Cell Growth & Differ.*, *4*: 799-809, 1993.
11. Houle, B., Leduc, F., and Bradley, W. E. C. Implication of RAR β in epidermoid (squamous) lung cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *3*: 358-366, 1991.
12. Nervi, C., Vollberg, T. M., George, M. D., Zelent, A., Chambon, P., and Jetten, A. M. Expression of nuclear retinoic acid receptors in normal tracheobronchial cells and lung carcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, *195*: 163-170, 1991.
13. Jing, Y., Zhang, J., Bleiweiss, I. J., Waxman, S., Zelent, A., and Mira-Y-Lopez, R. Defective expression of cellular retinol binding protein type I and retinoic acid receptors α 2, β 2, and γ 2 in human breast cancer cells. *FASEB J.*, *10*: 1064-1070, 1996.
14. Roman, S. D., Clarke, C. L., Hall, R. E., Alexander, I. E., and Sutherland, R. L. Expression and regulation of retinoic acid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, *52*: 2236-2242, 1992.

15. Swisshelm, K., Ryan, K., Lee, X., Tsou, H. C., Peacocke, M., and Sager, R. Down-regulation of retinoic acid receptor β in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell Growth & Differ.*, 5: 133-141, 1994.
16. van der Burg, B., van der Leede, B. M., Kwakkenboslbrüker, L., Salverda, S., de Laat, S. W., and van der Saag, P. T. Retinoic acid resistance of estradiol-independent breast cancer cell lines coincides with diminished expression of functional retinoic acid receptors. *Mol. Cell. Endo.*, 91: 149-157, 1993.
17. Hoffman, A. D., Engelstein, D., Bogenrieder, T., Pappandreou, C. N., Steckelman, E., Dave, A., Motzer, R. J., Dmitrovsky, E., Albino, A. P., and Nanus, D. M. Expression of retinoic acid receptor β in human renal cell carcinomas correlates with sensitivity to the antiproliferative effects of 13-*cis*-retinoic acid. *Clinical Cancer Res.*, 2: 1077-1082, 1996.
18. Zou, C.-P., Clifford, J. L., Xu, X.-C., Sacks, P. G., Chambon, P., Hong, W. K., and Lotan, R. Modulation by retinoic acid (RA) of squamous differentiation, cellular RA-binding proteins and nuclear RA receptors in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 54: 5479-5487, 1994.
19. Houle, B., Rochette-Egly, C., and Bradley, W. E. C. Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor β in human epidermoid lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 985-989, 1993.

20. Li, X.-S., Shao, Z.-M., Sheikh, M. S., Eiseman, J. L., Sentz, D., Jetten, A. M., Chen, J.-C., Dawson, M. I., Aisner, S., Rishi, A. K., Gutierrez, P., Schnapper, L., and Fontana, J. A. Retinoic acid receptor β inhibits breast carcinoma anchorage independent growth. *J. Cell. Phys.*, *165*: 449-458, 1995.
21. Si, S. P., Lee, X., Tsou, H. C., Buschbaum, R., Tibaduiza, E., and Peacocke, M. RAR β 2- mediated growth inhibition in HeLa cells. *Exp. Cell Res.*, *223*: 102-111, 1996.
22. Seewaldt, V. L., Johnson, B. S., Parker, M. B., Collins, S. J., and Swisshelm, K. Expression of retinoic acid receptor β mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cell Growth & Differ.*, *6*: 1077-1088, 1995.
23. Liu, Y., Lee, M-O., Wang, H.-G., Li, Y., Hashimoto, Y., Klaus, M., Reed, J. C., and Zhang, X.-K. Retinoic acid receptor β mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, *16*: 1138-1149, 1996.
24. Sheikh, M. S., Shao, Z.-M., Li, X.-S., Dawson, M., Jetten, A. M., Wu, S., Conley, B. A., Garcia, M., Rochefort, H., and Fontana, J. A. Retinoid-resistant estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells transfected with retinoic acid receptor- α acquire sensitivity to growth inhibition by retinoids. *J. Biol. Chem.*, *269*: 21440-21447, 1994.
25. van der Leede B. M., Folkers, G. E., van den Brink, C. E., van der Saag, P. T., and van der Burg, B. Retinoic acid receptor α 1 isoform is induced by estradiol

and confers retinoic acid sensitivity in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Endo.*, *109*: 77-86, 1995.

26. Lotan, R., Xu, X.-C., Lippman, S. M., Ro, J. Y., Lee, J. S., Lee, J. J., and Hong, W. K. Suppression of retinoic acid receptor- β in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *N. Engl. J. Med.*, *332*: 1405-1410, 1995.

27. Xu, X.-C., Sozzi, G., Lee, J. S., Lee, J. J., Pastorino, U., Pilotti, S., Kurie, J., M., Hong, W. K., and Lotan, R. Suppression of retinoic acid receptor β in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J. Natl Cancer Inst.*, *89*: 624-629, 1997.

28. Bérard, J., Laboune, F., Mukuna, M., Massé, M., Kothary, R., and Bradley, W. E. C. Lung tumors in mice expressing an antisense RAR β 2 transgene. *FASEB J.*, *10*: 1091-1097, 1996.

29. Houle, B., Pelletier, M., Wu, J., Goodyer, C., and Bradley, W. E. C. Fetal isoform of retinoic acid receptor β expressed in small cell lung cancer lines. *Cancer Res.*, *54*: 365-369, 1994.

30. Bérard, J., Gaboury, L., Landers, M., De Repentigny, Y., Houle, B., Kothary, R., and Bradley, W. E. C. Hyperplasia and tumours in lung, breast and other tissues in mice carrying a RAR β 4-like transgene. *EMBO J.*, *13*: 5570-5580, 1994.

31. Geisen, C., Denk, C., Gremm, B., Baust, C., Karger, A., Bollag, W., and Schwarz, E. High-level expression of the retinoic acid receptor β gene in normal

cells of the uterine cervix is regulated by the retinoic acid receptor α and is abnormally down-regulated in cervical carcinoma cells. *Cancer Res.*, *57*:1460-1467, 1997.

32. van der Burg, B., van der Leede, B. J. M., Kwakkenbos-Isbrüker, L., Salverda, S., de Laat, S. W. and van der Saag, P. T. Retinoic acid resistance of estradiol-independent breast cancer cells coincides with diminished retinoic acid receptor function. *Mol. Cell Endo.*, *91*: 149-157, 1993.

33. Colbère-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P., and Garapin, A. C. A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J. Mol. Biol.*, *150*: 1-14, 1981.

34. Giguère, V., Ong, E. S., Segui, P., and Evans, R. M. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, *330*: 624-629, 1987

35. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

36. Benbrook, D., Lernhardt, E., and Pfahl, M. A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature*, *333*: 669-672, 1988.

37. Berk, A. J., and Sharp, P. A. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell*, *12*: 721-732, 1977.

38. Witsell, A. L., and Schook, L. B. Utilization of polymerase chain reaction for clonal analysis of gene expression. *In*: B. E. White (ed.), PCR protocols; current methods and applications, pp.199-205. Totowa, NJ: Humana Press, 1993.

39. Aakvaag, A., Utaaker, E., Thorsen, T., Lea, O. A., and Lahooti, H. Growth control of human mammary cancer cells (MCF-7) in culture: effect of estradiol and growth factors in serum-containing medium. *Cancer Res.*, 50: 7806-7810, 1990.

Table 1: Effect of RA on growth of Calu-1 cells and transfected derivatives.

Cell line	Transgene expressed	Mean doubling time ^a (-RA) (d)	Mean doubling time ^a (+RA) (d)	-RA/+RA
Calu-1	none	1.2	1.15	1.04
C19	β 2	1.1	1.5	0.73
C59	β 2	1.8	2.5	0.72
Calu-1 ^b	none	1.25	1.20	1.04
C30 (neo) ^b	neo	1.4	1.25	1.12
C24 ^b	β 2	1.28	1.81	0.71
C57 ^b	β 2	1.53	1.55	0.99
C64 ^b	β 2	1.75	2.85	0.61
Calu-1	none	1.4	1.4	1
Cneo	neo	1.6	1.7	0.94
C α 33	α 1	2.0	2.05	0.98
C α 43	α 1	2.0	2.0	1
Calu-1	none	1.58	1.53	1.03
C β 3	β 1	1.6	1.6	1
C β 10	β 1	1.63	1.67	0.98
C β 38 ^d	β 1	1.4	1.4	1
Calu-1 ^c	none	1.4	1.5	0.93
C α 43 ^c	α 1	1.4	1.1	1.27

^a Mean doubling times were calculated from the growth curves and are expressed in days.

^b These results are from Houle et al. (19).

^c These results were obtained using FBS treated with Dextran-coated activated charcoal (see Materials and Methods).

^d Doubling time of Calu-1 cells grown in the same experiments was comparable.

Table 2: RAR α 1/ α 2 expression profile in lung cancer cell lines.

Cell line ^a	RAR α 1/ α 2 ^b	Origin ^c
Lung	2/1	Normal Tissue
LC-T	2/1	ADC
LC-T RA	2/1	ADC
NCI-H125	2/-	ADSQ
NCI-H125 RA	2/tr.	ADSQ
NCI-H596 RA	3/1	ADSQ
QU-DB	1/-	LCC
BK-T	tr./-	SCLC
MM-1	2/tr.	SCLC
NCI-H69	2/-	SCLC
NCI-H69 RA	1/-	SCLC
NCI-H82	2/-	SCLC
NCI-H209	1/-	SCLC
NCI-H446	1/-	SCLC
RG-1	2/-	SCLC
NCI-H157	2/tr.	SQC
NCI-H157 RA	2/tr.	SQC
NCI-H520	1/-	SQC
SKMES	tr./-	SQC
SKMES RA	tr./-	SQC
CALU-1	2/-	SQC
CALU-1 RA	2/-	SQC
C19	2/-	Calu-1 RAR β 2 T
C19 RA	2/tr.	Calu-1 RAR β 2 T
C64	2/-	Calu-1 RAR β 2 T
C64 RA	2/tr.	Calu-1 RAR β 2 T
C α 33	3/-	Calu-1 RAR α 1 T
C α 33 RA	3/tr.	Calu-1 RAR α 1 T
C α 43	3/tr.	Calu-1 RAR α 1 T
C α 43 RA	3/tr.	Calu-1 RAR α 1 T
C β 3	2/-	Calu-1 RAR β 1 T
C β 3 RA	2/1	Calu-1 RAR β 1 T
C β 10	2/-	Calu-1 RAR β 1 T
C β 10 RA	2/-	Calu-1 RAR β 1 T

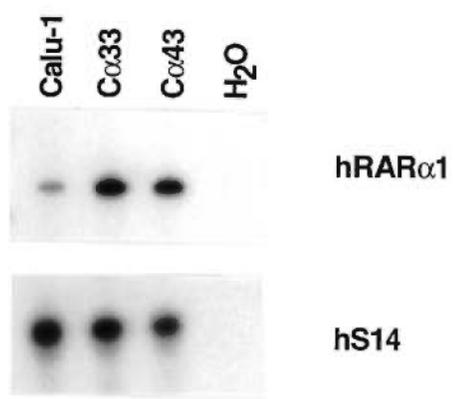
^a In some cases the cells have been treated with 100 nM RA (RA).

^b Expression levels are relative to the S14 PCR internal control with $-\text{tr.} < 1 < 2 < 3$. Examples of this semi-quantitation are shown in figure 3. Trace (tr.), MM-1 RAR α 2, is typically not visible on photographs but at limit of detection on original photographs and films.

^c Cell lines origins are ADC: adenocarcinoma, ADSQ: adenosquamous carcinoma, LCC: large cell carcinoma, SCLC: small cell lung carcinoma, SQC: squamous carcinoma. Calu-1 transfectants are also included Calu-1 RAR β 2T: RAR β 2 transfected cells, Calu-1 RAR α 1T: RAR α 1 transfected cells and Calu-1 RAR β 1T: RAR β 1 transfected cells.

Figure 1: RT-PCR analysis of Calu-1 transfected derivatives. A) RAR α 1-overexpressing clones. Relative levels were deduced by visual comparison of total RAR α 1 levels to S14 PCR control. B) Identification of RAR β 1-expressing cells by ^{32}P -labelled PCR using primers specific for the transgene.

A



B

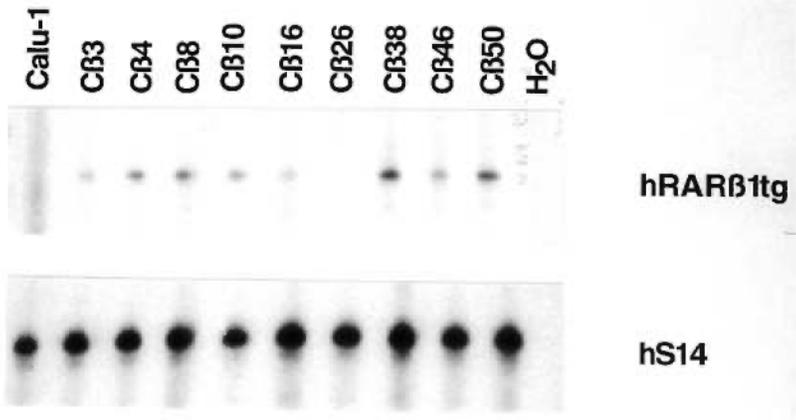


Figure 2: *In vitro* cell growth rates. Top panel: RAR β 2 transfectant C59, compared with the parental cell line Calu-1. Middle panel: RAR α 1-overexpressing cells. Bottom panel: RAR β 1 transfected cells C β 3 and C β 10. Each curve represents the mean of at least two experiments \pm S.E.. The cells were grown in absence or presence of 100 nM RA.

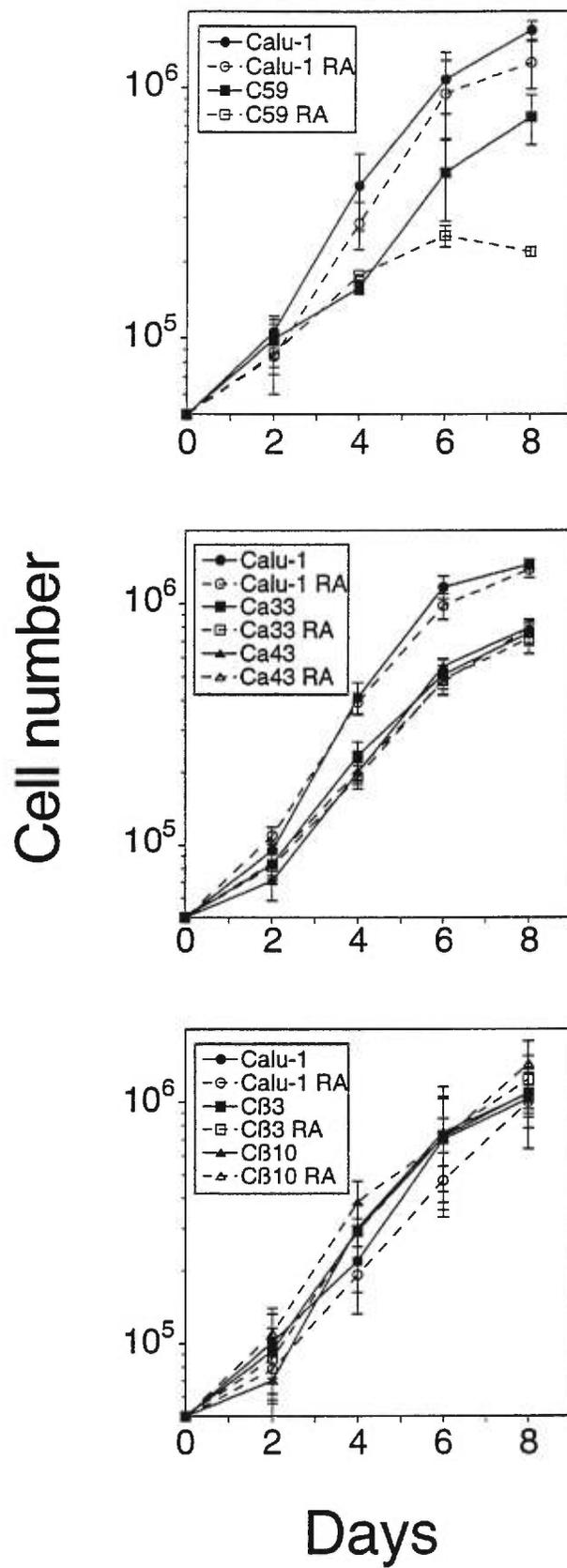
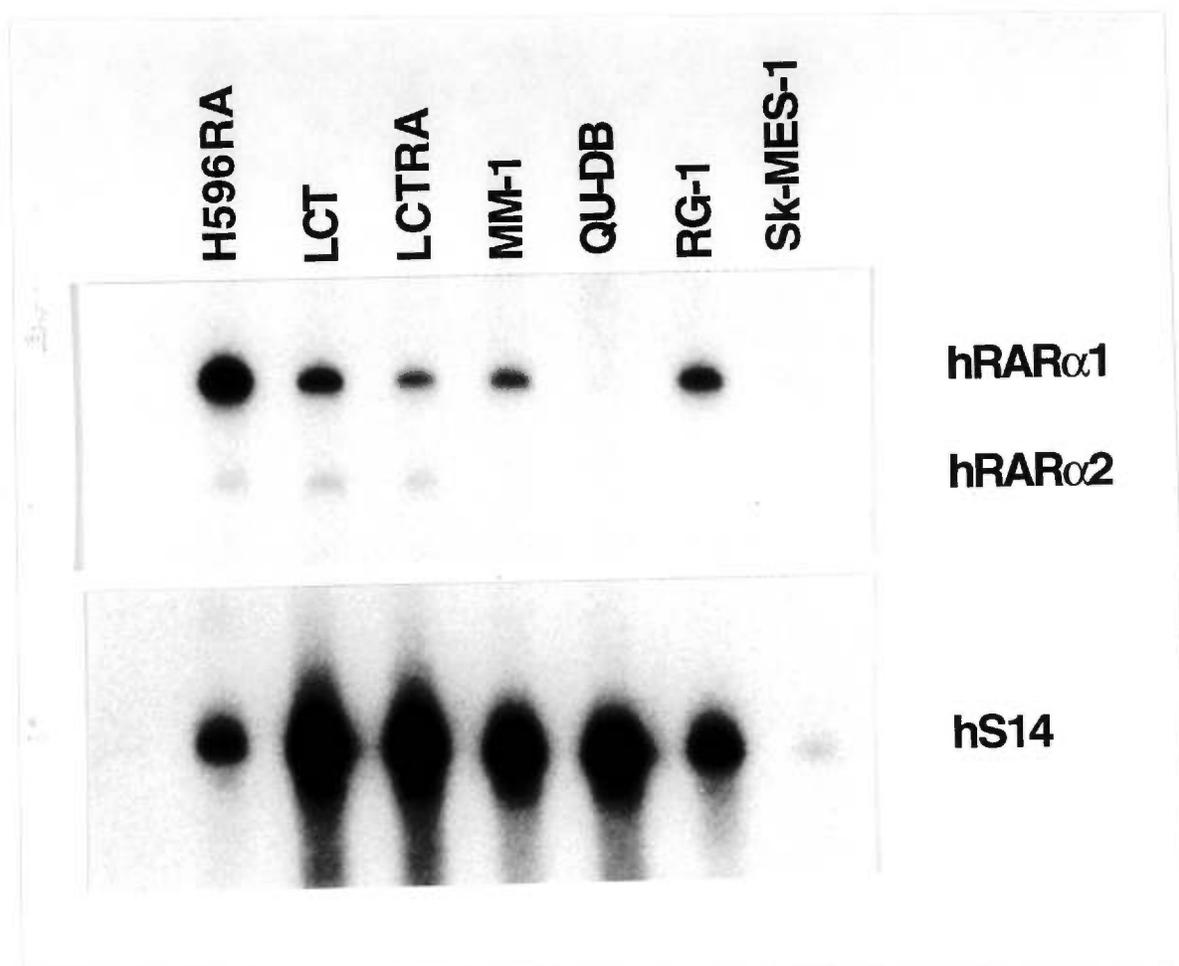


Figure 3: RAR α 1/ α 2 expression. The RAR α expression profile was analysed by PCR on cDNA generated from lung cancer cell lines. Using one primer specific for each isoform and a primer in the common region, we generated two fragments, the upper one being RAR α 1 and the lower being RAR α 2. The bottom part of the figure represents the S14 PCR control which was generated in the same reaction (see Materials and Methods). Relative signal strength were deduced by eye comparison from the gel and are reported in Table 3.



Chapitre 4

Article #3

**RAR β 2, a tumor suppressor gene, controls genes involved in immune
surveillance**

à soumettre

RAR β 2, a tumor suppressor gene, controls genes involved in immune surveillance

André Toulouse¹, Johane Morin, Martine Loubeau, Jiangping Wu and W. Edward C. Bradley

Centre de Recherche du CHUM, Pavillon Notre-Dame, 1560 Sherbrooke E.,
Montréal, Qc, H2L 4M1, Canada.

Abstract

The retinoic acid receptor $\beta 2$ (RAR $\beta 2$) isoform has been repeatedly shown to be the principal mediator of the growth suppressive effects of RA. Since it was demonstrated that this specific isoform but not RAR $\alpha 1$ or RAR $\beta 1$ is able to promote the growth suppressive effects of RA in the lung epidermoid cancer cell line Calu-1, we characterized the cells regarding the transcriptional control of RAR $\beta 2$. Using a RAP-PCR approach, we demonstrate that only a small number of genes (0.05%) is controlled by specific RARs in Calu-1-transfected cells when comparing Calu-1 cells with RAR transfectants. Using the Atlas human cDNA Array I, we identified specific genes that are regulated at the transcriptional level by RAR $\beta 2$. Of these genes, we confirmed ICAM-1, IL-1 β and MHC Class I genes to be upregulated in RAR $\beta 2$ -transfected Calu-1 cells using either Northern blot or RNase protection. We show that protein levels for ICAM-1 and MHC class I molecules are higher in transfectants and discuss the potential involvement of these genes in RAR $\beta 2$ mediated lung tumor suppression.

Retinoic acid receptors (RAR) are nuclear transcription factors mediating the effects of retinoic acid (RA). Three genes have been cloned for the two families of RA receptors (RAR α , β and γ as well as RXR α , β , and γ) (Chambon, 1996). Of these receptors, RAR β has been particularly implicated in epithelial cancers in the last few years. It has been shown that a majority of cell lines derived from these cancers have lost the expression of the gene (Chambon, 1996, Gebert et al., 1991, Geradts et al., 1993, Houle et al., 1991, Jing et al., 1996, Roman et al., 1992, Swisshelm et al., 1994, van der Burg et al., 1993, Zou et al., 1994). This gene is located on chromosome 3p24 (Mattei et al., 1991), a region which frequently undergoes loss of heterozygosity (LOH) in this type of cancer (Kok et al., 1997, Whang-Peng et al., 1982). The RAR β gene codes for several functional isoforms using two distinct promoters and alternative splicing (Leid et al., 1992). Of these isoforms, RAR β 2 has been repeatedly shown to be associated with tumor suppression. For example, in human epidermoid lung cancer, it has been shown that tumor cells have lost the expression of this isoform (Gebert et al., 1991, Geradts et al., 1993, Houle et al., 1991, Nervi et al., 1991) and that re-expressing it by transfection could trigger growth suppression *in vitro* and tumor suppression in nude mice (Houle et al., 1993). In other systems, RAR β 2 expression has also been associated with growth suppression in response to retinoic acid treatment (Geisen et al., 1997, Hoffman et al., 1996, Li et al., 1995, Seewaldt et al., 1995). In several of these systems, apoptosis is induced when RAR β 2 expressing cells are treated with RA (Geisen et al., 1997, Liu et al., 1996, Swisshelm et al., 1994).

We recently showed that the growth suppressive effects of RA are mediated by RAR β 2 in the epidermoid lung cancer cell line Calu-1 (Toulouse et al., submitted). This cell line had been shown to have no RAR β expression compared to normal lung tissue but retained the expression of the RAR α and γ genes (Gebert et al.,

1991, Houle et al., 1991). Neither overexpression of one of the expressed RARs (RAR α 1) nor expression of another RAR β isoform (RAR β 1) can mediate the growth suppressive effects of RA as seen with RAR β 2 transfected cells (Toulouse et al., submitted). Several other studies on transcriptional control suggest that RAR α activates the retinoic acid response element in the promoter of RAR β which in turn controls the expression of RA sensitive genes or induces apoptosis (Geisen et al., 1997, Lansink and Kooistra, 1996, Liu et al., 1996, Segars et al., 1993). In the breast cancer cells, reduced expression of RAR α was associated with estrogen receptor-negative cells which generally do not respond to the growth inhibitory effects of RA (Roman et al., 1992, van der Burg et al., 1993). It was also shown that vector-based expression of RAR α in these ER- cells could re-establish the sensitivity to RA (Sheikh et al., 1994, van der Leede et al., 1995). In this case, it was subsequently shown that the role of RAR α in the control of breast cancer cell growth was to turn on RAR β which in turn was inducing apoptosis and growth arrest (Liu et al., 1996). Similar results were obtained for cervical cancer cell lines where RAR α induced RAR β which in turn triggered apoptosis of the cells (Geisen et al., 1997). Thus most results point to RAR β 2 as the mediator of RA growth and tumor suppressive effects in epithelial cancers.

Having shown in the epidermoid lung cancer cell line Calu-1 that only RAR β 2 is able to mediate the growth suppressive effects of RA and knowing that RAR β 2 is a transcription factor controlling the expression of genes, we searched for genes downstream of RAR β 2 which could be implicated in growth control of tumor cells. Using a fluorescent modification of the differential display technique (Fluorescent RAP-PCR), we first quantified the degree of variation induced by different RA receptors. Less than one percent of the peaks vary as a function of the presence of exogenous RA receptors. We then searched for genes which are specifically altered

by the expression of RAR β 2 and could be involved in mediating the growth suppressive effects of RA. Using the RAP-PCR technique, we isolated 5 candidate messenger RNAs of which two were demonstrated to be under RAR β 2 transcriptional control. Next using a selection of genes from the Atlas human cDNA array I, we determined which of these genes are specifically under the control of RAR β 2. We found three of these genes to be highly induced by RAR β 2, ICAM-1, MHC Class I and IL-1 β . We propose here a model of action for RA-induced tumor suppression in cancer involving these genes. In addition, several other genes which are involved in different cellular processes were found to be differentially expressed under RAR β 2 control.

Materials and Methods

Cell culture and RNA preparation

The Calu-1 cell line and its transfected derivatives were maintained in alpha medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Burlington, Canada) and 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL, Burlington, Canada) at 37°C in a humid atmosphere provided with 5% CO₂. The RAR expression vectors and cell transfection were previously described (Houle et al, 1993, Toulouse et al., submitted). The clones used are C α 33 and C α 43: RAR α 1-overexpressing clones, C β 3 and C β 10: RAR β 1-transfected cells, C19, C24 and C64: RAR β 2-transfected clones and C30: a neomycin resistant-RAR β negative clone. Cells were, in certain cases, treated with pharmacological doses (100 nM) of retinoic acid (Sigma, St-Louis MO) for 48 hrs prior to collection. The cells were cultured to 70% confluency, pelleted and stored at -80°C for subsequent RNA extraction.

The RNA was extracted using the LiCl-Urea method (Auffray and Rougeon, 1980). Briefly, the cells were resuspended in 3 ml of a LiCl-urea solution (3M-6M), sonicated and stored at 4°C overnight. The next day, the samples were centrifuged at 4000 rpm in a superspeed centrifuge for 30 minutes, the pellets were resuspended in 1/2 volume of LiCl-Urea solution and centrifuged again. The pellets were then resuspended in 1 ml TES (TRIS 10 mM-EDTA 1 mM-SDS 0.5%) and 1 ml of Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol (25:24:1) was added. The samples were placed in a shaker for 1h at 37°C and the upper phase was then precipitated using Na-acetate and ethanol.

Fluorescent RAP-PCR

This method is a modification of the Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA described by Welsh et al. (Welsh et al., 1992). In this modification, we used a fluorescent dye-conjugated oligonucleotide (Cy-5) and ran the generated samples on a A.L.F. Express DNA sequencer (Pharmacia-LKB). Two concentrations of RNA from each cell line were used, 10 ng/μl and 20 ng/μl. First, we reverse transcribed the RNA into cDNA by mixing 10 μl of RNA, and 10 μl of a 2X reverse transcription mix (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 100 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 200 μM of each dNTP, 10 μM oligonucleotides and 10 U/μl of MMuLV-RT). The samples were heated in a thermal cycler using temperature ramping from 25°C to 37°C over a 5 min. period, maintained at 37°C for an additional 10 min. and denatured at 94°C. The tubes were briefly put on ice and 20 μl of a 2X PCR solution were added (10mM Tris-HCl pH 8.3, 25 mM KCl, 2 mM MgCl₂ and 0.1 U/μl Taq DNA polymerase). The samples were first incubated for second strand synthesis by one cycle in a thermal cycler (94°C, 40°C, 72°C 5 min. each) and then were cycled 40 times for PCR amplification (94°C 1min., 60°C 1 min., 72°C 2 min.). The samples were run on a sequencing gel on a A.L.F. Express DNA sequencer. We always

used the same fluorescent oligonucleotide alone or in pair with one of ten other oligonucleotides. The samples were analysed on the monitor screen for peak variations comparing the two concentrations of each sample.

Atlas Human cDNA Expression Array

Poly A+ mRNA was prepared from total RNA using Qiagen's Oligotex mRNA midi kit and following manufacturer's instructions. The Atlas human cDNA Array kit was purchased from Clontech Laboratories (Palo Alto, CA). All procedures for labelling and purifying the probe were accomplished following manufacturer's recommendations. We have found that the quality of the cDNA probe was of paramount importance.

Northern blot analysis

Northern blots were prepared using 40 µg of total RNA following standard procedures (Sambrook et al., 1989). The probes were prepared by random priming, using α -P³²-dCTP (Amersham, Oakville, ON) and following standard protocols (Sambrook et al., 1989). The IL-1 β probe was prepared by labelling a purified PCR fragment encompassing the whole coding sequence.

RNase protection assay

RNase protection assays were performed using Ambion's RPA II kit and the probe were synthesized following standard protocols using α -P³²-UTP. The actin probe used was described elsewhere (Houle et al., 1993). The ICAM-1 probe was made by inserting a Bgl II- Pst I ICAM-1 cDNA fragment into the Bam HI-Pst I sites of the pGEM-3Z plasmid (Promega, Madison, WI). The plasmid was linearized by Hind III and the probes were generated according to standard protocols using T7

RNA polymerase (Sambrook et al., 1989). This generated a 477 nucleotides probe giving a 443 bp protected fragment.

Flow cytometry

C64 and C30 cells were treated with RA at 100 nM for 7 days. To detect MHC Class I proteins 10^6 cells were incubated with 2 μ g of FITC-conjugated monoclonal antibody W6/32 against human HLA Class I antigen (Sigma St-Louis MO) for 30 minutes on ice. The cells were then washed with phosphate buffered saline (PBS) and fixed in 1% paraformaldehyde in PBS. To detect ICAM-1 protein expression, 10^6 cells were incubated with 1 μ g of monoclonal antibody 8.4A6 (BioSource International, Camarillo, CA) for 30 minutes on ice and washed with PBS-. These cells were then incubated with 600 ng of a goat anti-mouse IgG-1 (gamma) antibody conjugated to R-phycoerythrin (Cedarlane, Hornby, ON)), and processed as for MHC class I staining. The samples were then run on a EPICS cell sorter.

Results

Fluorescent RAP-PCR

Preceding experiments from several laboratories including ours had shown that RAR β 2 is a key mediator of the RA growth suppressive effects as well as a potential tumor suppressor in vivo. RAR β 2 is a transcriptional factor activated by retinoic acid and will bind to promoter regions of specific genes to modulate their expression. In order to screen the Calu-1 clones transfected with different RA receptors for variations in the expression profile induced by the RA receptors, we used a fluorescent modification of the arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA, the fluorescent RAP-PCR. Using a Cy5-linked oligonucleotide either alone or in conjunction with one of several different primers, we performed RT-PCR

ramped during the first cycle for reverse transcription as described (Welsh et al., 1992) and separated the fragments on a A.L.F. Express DNA sequencing apparatus. The amplified fragments appeared as peaks of fluorescence which were detected by the apparatus (Figure 1).

Using this approach, we screened for variations in the expression pattern of the Calu-1 cell line and its transfected derivatives either treated or not with RA at 100 nM. Each amplification was performed on two quantities of total RNA to correct for peak variations and RNA quality. This technique allowed us to monitor the variation on approximately 1200 peaks in the parental cell line Calu-1 and its transfected derivatives (RAR α 1-transfected: C α 33 and C α 43, RAR β 1-transfected: C β 3 and C β 10, RAR β 2-transfected: C19 and C64). The profile of variations led us to class the differences in four major categories (for some examples see Figure 1); Category 1 consists of differences that are transgene specific i.e. that the variations are observed when comparing Calu-1 \pm RA and one set of RAR-transfected cells \pm RA. Category 2 consists of peaks which are specific to a set of RAR-transfected clones but need the addition of exogenous RA (comparing RAR-transfected cells with their RA-treated counterparts). Category 3 is formed by those peaks which vary when RA is added to the culture medium but regardless of the RAR status (untreated cells compared RA treated cells). Finally Category 4 is constituted by those amplicons which do not represent changes consistent with either the RA or the RAR status.

The analysis of the fluorescent RAP-PCR showed little variation in the profile of the various RAR transfected clones. Most of the variations we observed were present in only one of the cell lines and were not consistently seen with either RA addition or the transfected RAR (see Table I). We concluded that these were clonal

(Category 4). Very few peaks fell in the 3rd category which suggests that the majority of peak variations are mediated through high levels of RA receptors. The majority of non-clonal variations were transgene specific either in the presence (Category 2) or absence (Category 1) of pharmacological doses of RA but these amounted to less than 0.5%.

Having previously established that the growth suppressive effects of RA are mediated through its $\beta 2$ receptor and that only a few genes vary following transfection of this gene, we focused our search on genes that are under the transcriptional control of RAR $\beta 2$. We first used the RAP-PCR technique using one set of primers which generated several differences under the fluorescent approach. This way, we isolated six clones which were sequenced and corresponded to five genes, two being different amplifications of the same cDNA. Of these five, two (hCRMP-2 and Cytochrome b) were found to be differentially expressed (Toulouse et al., 1998).

Atlas human cDNA array

In order to screen for differential expression of hundreds of genes, we used Clontech's Atlas human cDNA expression array I which allows for direct radioactive screening of 588 genes.

Using complex polyA⁺-derived cDNA probes from the Calu-1 cell line and its transfected derivatives treated with 100 nM RA (neo^r-transfectant: C30 RA and RAR $\beta 2$ -transfectants: C24 RA and C64 RA), we screened the membranes for genes under transcriptional control of RAR $\beta 2$. The membranes contain genes categorized in different classes in order to delineate genes potentially involved in important physiological processes. Figure 2 shows examples of differentially regulated genes

comparing the parental Calu-1 cells with clone C64 (RAR β 2⁺) cells treated with 100 nM RA. After prolonged culture periods of Calu-1 cells it appears that their sensitivity to RA has been modified and that they are now able to induce RAR β 2 expression to low levels under RA conditions (data not shown). In order to differentiate between RAR α or RAR γ and RAR β 2 induced genes in figure 2, we hybridized the membranes with complex cDNA probes generated from C30 (neo-transfectant) and C24 (RAR β 2-transfectant) cells both treated with RA at 100 nm for 48 hrs (not shown). This way, we were able to discriminate between RAR β 2 induced genes and genes induced either clonally or under RAR α or γ control. Table II summarizes those differences observed when comparing Calu-1 and C64 (RAR β 2⁺) cells which were confirmed using the other set of cDNA probes described above.

The cDNAs on the array are arranged as categories representing various classes of molecules (e.g. interleukines, hormones or transcription factors) or different cellular processes (e.g. stress response, cell cycle, apoptosis). As one could expect, none of these classes appears to be drastically under- or over-represented in the cell lines used. We observe variations within the different classes but none of them encompasses the whole cDNA category. For example, the cDNAs for cell cycle regulators located in the A5, A6 and A7 columns vary from no expression to strong expression (Figure 2). Thus these genes showed cell-specific expression levels which are consistent from one Calu-1 derivative to another with the exception of the clonal and RAR β 2 modulated genes.

Of the 588 genes and 9 housekeeping controls (597 total), we found 428 to be expressed from trace levels to very strong expression (including the 9 housekeeping controls) using C64 RA probed membrane exposed for 4 days. Of these 428, 51

(11.9%) were found to be influenced either by retinoic acid or RAR β 2 (comparing Calu-1 with C64 RA). The transcription levels of 32 genes were augmented in C64 RA treated cells while 7 were expressed only at slightly higher levels. Eight genes were diminished and 4 were slightly lower in C64RA than in Calu-1 cells. Of these 51 cDNAs, 24 were confirmed to be differentially expressed using C24RA and/or C30RA hybridized arrays, for the remaining 27 we were not able to draw any confirmation from the C24RA and C30RA probes due to their low levels of ³²P-incorporation. Of the 24 cDNAs confirmed to be differentially expressed, 21 were augmented while 3 were diminished under RAR β 2 control.

Three genes were strongly upregulated from undetectable expression in Calu-1 cells to high levels in C64RA cells, IL-1 β , ICAM-1 and MHC Class I. These genes were reported to be regulated by RA (IL-1 β) (Jarrous and Kaempfer, 1994, Matikainen et al., 1994, Ross, 1996) and particularly by RAR β 2 for two of them, ICAM-1 (Aoudjit et al., 1995, Wang et al., 1992) and MHC class I (Segars et al., 1993). Using either RNase protection assay or Northern blots, we confirmed these genes to be regulated by RAR β 2 in Calu-1 transfectant cells (results not shown). In addition to these three genes, several others were shown to be differentially regulated between RAR β - and RAR β 2+ cells on the array (Figure 2) but were not confirmed by RNase protection assays or Northern blots.

It was previously shown in NTera/2 cells that RAR β 2 mediated induction of MHC I mRNA was detectable 2 days after RA treatment but that protein levels showed modification only after 5 days (Segars et al., 1993). Since ICAM-1 and MHC class I molecules are cell surface proteins, we used fluorescence-activated cell sorting to confirm that RAR β 2 induced expression of ICAM-1 and MHC I mRNAs was reflected at the protein level. We treated C30 (neo^r-transfectant) and C64

(RAR β 2⁺) cells for 7 days with 100 nM RA. Using antibodies 8.4A6 against ICAM-1 and W6/32 against a non-polymorphic epitope of MHC class I molecules, RA-treated and untreated cells were labelled as described and analysed on an EPICS FACS apparatus. The results in Figure 3A show that ICAM-1 protein is expressed at higher levels at the cell surface of the RAR β 2-transfected C64 cells than that of the C30 cells. Treating the cells with 100 nM RA for 7 days increased the expression in the two cell lines but C64 cells show a much stronger expression of ICAM-1 than C30 cells as demonstrated in Figure 3A. Figure 3B shows results obtained with antibody W6/32 against HLA class I proteins. As seen for the ICAM-1 protein, the RAR β 2-transfected C64 cells show slightly higher protein levels than C30 cells prior to RA treatment. The 7 days incubation in the presence of retinoic acid resulted in the induction of HLA class I molecules in C64 cells but no augmentation was seen with C30 cells after the treatment (Figure 3B).

Discussion

Over the years, several papers have shown the importance of RAR β in mediating the antiproliferative effects of RA. In lung cancer, RAR β 2 was shown to suppress growth of epidermoid cell lines and to suppress the growth of tumors in nude mice (Houle et al., 1993) and it was shown in some breast and cervical carcinoma cells to induce apoptosis (Geisen et al., 1997, Liu et al., 1996, Si et al., 1996, Swisshelm et al., 1994). Several reports suggested that RAR α could have a similar role (Sheikh et al., 1994, van der Leede et al., 1995) but it was later shown that the growth suppressive effects of RA were specifically mediated by RAR β 2 in epidermoid lung cancer cell lines (Toulouse et al., submitted) and that in breast and cervix cancer cell lines the effects of RAR α were in inducing the expression of RAR β 2 and that RAR β was in turn inducing cells to enter the apoptotic pathway

(Geisen et al., 1997, Liu et al., 1996). In fact even transcriptional control studies point to RAR β 2 as being the gene primarily involved in controlling the expression of RA-responsive downstream genes. The expression of the MHC class I gene is augmented upon RA treatment of NTera/2 cells concomitant with RAR β induction. Segars and his colleagues suggested that other RARs (RAR α and RAR γ) which are expressed in these cells are involved in the transcriptional control of the MHC I gene only by turning on the expression of RAR β 2 which in turn was the sole isoform to bind the MHC I retinoic acid response element (RARE) (Segars et al., 1993). Similar results suggesting a two-step activation mode were obtained for the tissue-type plasminogen activator (t-PA). Lansink and Kooistra showed that the t-PA promoter is specifically activated by RAR β 2 in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) but that prior to this activation, RAR β 2 RA-responsive promoter was activated by the binding of RAR α to its RARE (Lansink and Kooistra, 1996).

Having determined that RAR β 2 is strongly implicated in the control of Calu-1 cell proliferation by retinoic acid, we sought to determine if there were transcriptional variations induced by the different retinoic acid receptors. Using a fluorescent derivation of the RAP-PCR protocol, we analyzed the transcriptional pattern of the different RAR transfectants we generated in previous experiments (Houle et al, 1993, Toulouse et al., submitted). This technique has the important advantage of allowing the screening of several hundreds of peaks in a short number of runs. The amplification pattern using the same set of oligonucleotides on different RNA pools was reproducible, indicating that the cell lines are highly similar in their expression pattern. The results presented in Table I show that most variations are clonal and that only very few vary according to the RAR status. This strongly suggests that RARs exert transcriptional control on a restricted number of genes and that searching for such genes would necessitate some way of enrichment. However, we

used one of the pairs of primers to amplify RNA from the various RAR β 2 transfected cell lines using ^{32}P -dCTP. This led us to isolate 5 different sequences of which two, corresponding to hCRMP-2 and cytochrome b, were shown to be differentially expressed but with very low levels of activation (Toulouse et al., 1998). The slight augmentation or reduction of a specific gene in the RAR β 2 transfectants might have strong effects on the proliferation of these cells by either altering the expression of other genes, cooperating with other dysregulated genes thereby amplifying the dysregulation of a specific pathway or by blocking a specific pathway where it is involved. This might be the case for hCRMP-2 which is involved in a signalling pathway involving the collapsin/semaphorin family of axon guidance molecules of which several members are located in the chromosome 3p region frequently deleted in lung cancer (discussed in Toulouse et al., 1998).

We next used the Atlas array from Clontech laboratories which allows for a quick and large scale evaluation of transcriptional differences between two cell lines. The number of genes is limited but the cDNAs present on the membrane have been shown to be involved in key regulatory cellular processes. Our hybridizations showed the Calu-1 cells and their transfected derivatives to express a high proportion of the genes (71%). The high percentage of genes varying according to RAR β 2 status (11.9%) in the array compared to the fluorescent RAP-PCR (0.05%) suggests that RAR β 2 might be involved in the control of some of the processes represented on the array such as growth control, cell signalling, apoptosis or immune response since the majority of the anonymous sequences amplified by arbitrarily-primed PCR probably represent genes not involved in regulation.

Of the genes differentially expressed between RAR β 2- and RAR β 2+ Calu-1 clones, some are of particular interest. First, RAR β 2 is detected only in the transfected

lines, which validates the method since we used RAR β 2-transfected clones to probe against RAR β 2⁻ cells. Several genes are strongly induced in RAR β 2 positive cells, and among them, we especially note ICAM-1, IL-1 β and MHC class I.

The intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene codes for a cell surface ligand for the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1) (Staunton et al., 1988). This molecule has been shown to be essential to T-cell dependent cytotoxicity, antigen presentation and leukocyte trafficking (Aoudjit et al., 1994). ICAM-1 is expressed in various cancers where it has been implicated in recognition of tumor cells by natural killer cells (Pandolfi et al., 1992), autologous T lymphocytes (Vanky et al., 1990) and monocytes (Webb et al., 1991). The expression of this gene can be stimulated by proinflammatory cytokines and retinoic acid. It has been shown that the RA induction is mediated by a RAR β -RXR α heterodimer in Cos-1 cells (Aoudjit et al., 1995).

The class I MHC proteins are glycoproteins involved in the presentation of processed antigens to cytotoxic cells (Davidson et al., 1985, Parham et al., 1988). These genes are highly polymorphic and are expressed on all nucleated cells where they bind noncovalently with β 2-microglobulin (Davidson et al., 1985). These two genes are concomitantly upregulated in NTera/2 teratocarcinoma cells after differentiation with retinoic acid or by treatment with cytokines (Segars et al., 1993). The augmentation in the levels of MHC molecules in the NTera/2 cells has been shown to be under the transcriptional control of RAR β 2-RXR β heterodimers which bind to a response element (RARE) in the promoter of the gene (Segars et al., 1993).

The strong modulation of the ICAM-1 and MHC Class I genes is of high importance if we regard it in light of the theory of immune surveillance. In a normal organism, the immune system screens the whole organism for self recognition. The MHC I and ICAM-1 molecules are involved in the presentation of cellular antigens to cytotoxic cells at the cell surface (Aoudjit et al., 1994, Davidson et al., 1985, Parham et al., 1988). If the tumor cells can downregulate these molecules, they will have a better chance to escape the immune system by not being able to present their modified antigens at the cell surface. The loss of MHC class I molecules at the surface of the antigen presenting cell (tumor cell) is a signal for natural killer cells, but the NK cells still require ICAM-1 for adhesion to its target. Thus these tumor cells which succeed in downregulating ICAM-1 as well as MHC class I expression can weaken the adhesion of NK cells and thereby escape NK mediated cytotoxicity. The role of RAR β 2 in controlling these two genes is in agreement with nude mice experiments previously published (Houle et al., 1993). In these experiments, Houle and his colleagues showed RAR β 2 transfectant cells to generate fewer tumors and when tumors appeared, they were shown to have lost the expression of the transgene. Thus, if we assume that RAR β 2 upregulates genes involved in cellular interactions with cytotoxic cells and that nude mice have high levels of natural killer cells (Budzynski and Radzikowski, 1994), the low levels of RAR β 2-positive tumor formation in nude mice can be explained by augmented recognition of RAR β 2-transfected cells by natural killer cells.

The upregulation of IL-1 β in the RAR β 2 transfected cells is of particular interest since it is a cytokine which has been shown to be involved in the regulation of ICAM-1 (Aoudjit et al., 1994) and MHC class I gene expression (Segars et al., 1993). IL-1 lacks a signal sequence for its secretion but it has been shown that several ICE-like proteins can cleave the immature form to a mature form which is

released by the producing cell (Bjorkdahl et al., 1997). Several ICE-like cysteine proteases are expressed in Calu-1 cells and its transfectants which can cleave the precursor to mature IL-1 β . Since IL-1 β has previously been shown to be one of the potential mediators of RA-induced lung cancer cell growth suppression (Ross, 1996) and that we now show that its expression is in fact induced by RAR β 2, the data strongly suggest involvement this gene in the control of growth suppression and suggest a role for it in tumor suppression as a regulator of immune molecules such as ICAM-1 and MHC class I.

In addition to the two cell surface molecules, several other molecules potentially implicated in the regulation of the immune system are upregulated in RAR β 2-transfected cells (MIP2, IL-8, IL-4 STAT, M-CSF) but to a lesser degree, underlining the potential implication of RAR β 2 in normal immune surveillance. Changes associated with cancer are incremental, and come about over a period of years. Thus as we mentioned, it is reasonable to think that little modifications in the amount of certain important gene products could in the long term have drastic effects on the growth capacity and ultimate behavior of cancer cells.

The upregulation of several genes implicated in immune recognition by RAR β 2 might explain tumor suppression in nude mice, but as we mentioned, it has also been showed that RAR β 2 is specifically inducing Calu-1 cell growth inhibition (Toulouse et al., submitted). Thus several other genes might be involved in this inhibition process, and several of the genes represented on the Array may be good candidates. We have shown that several genes involved in the control of cell cycling or apoptosis are differentially regulated between RAR β - and RAR β 2+ cells. These two mechanisms either alone or in combination could control the *in vitro* growth of Calu-1 cells.

Some of the genes differentially regulated are located in regions known to show loss of heterozygosity in certain cancers. For example, RAB-5A is a member of a family of RAS-related proteins involved in endocytosis (Bucci et al., 1995, Bucci et al., 1992, Bucci et al., 1994, de Hoop et al., 1994) and is differentially regulated under RAR β 2 control (Figure 2, Table II). This gene is located on chromosome 3p24-22 (Rousseau-Merck et al., 1991) and its expression may be altered by LOH in epithelial cancers (Kok et al., 1997). Its upregulation by RAR β 2 and its chromosomal location make it a good candidate as a gene potentially involved in the control of Calu-1 cell growth and perhaps other epithelial cancers by controlling membrane trafficking and thereby secretion of important proteins. Another such candidate is the protein ID-3 of the family of DNA-binding inhibitory proteins. This gene is strongly upregulated in RAR β 2 transfectants, as are the two other members of its family, ID-1 and ID-2. These proteins are HLH proteins lacking a DNA binding domain but retaining the capacity to form heterodimers with other HLH proteins thereby inhibiting their binding to DNA (Deed et al., 1994a, Deed et al., 1994b, Deed et al., 1996). The ID-3 gene is located on chromosome 1p36, a region implicated by LOH in cancers (Deed et al., 1994a). Thus even though several of the candidate genes have not been confirmed to be regulated by RAR β 2 in Northern blot or RNase protection analysis, their chromosomal locations and functions suggest a possible involvement in cancer suppression and increase the need for further analysis.

Our results show that genes involved in the immune surveillance are upregulated in RAR β 2 transfectant cells, suggesting that tumor cells have evolved a way to escape the immune system by repressing RAR β 2. This provides a strong link between lung cancer suppression and immune surveillance and might have strong therapeutic

benefits if by administrating RA we can upregulate the ICAM-1 and MHC class I molecules in cancer cells to provide better antigen presentation and in turn stimulate the immune system of the patient against the cancer.

Acknowledgements

This work was supported by funds from the Medical Research Council of Canada and Fondation Notre-Dame to W.E.C.B. A. T. was supported in part by the Défi Corporatif Canderel.

References

Aoudjit, F., Bossé, M., Stratowa, C., Voraberger, G. and Audette, M. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by retinoic acid: Analysis of the 5' regulatory region of the gene. *Int. J. Cancer*, 58: 543-549, 1994.

Aoudjit, F., Brochu, N., Morin, N., Poulin, G., Stratowa, C. and Audette, M. Heterodimeric retinoic acid receptor- β and retinoid X receptor- α complexes stimulate expression of the intercellular adhesion molecule-1 gene. *Cell Growth and Differentiation*, 6: 515-521, 1995.

Auffray, C. and Rougeon, F. Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain mRNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur. J. Biochem.*, 107: 303-314, 1980.

Bjorkdahl, O., Wingren, A.G., Hedlund, G., Ohlsson, L. and Dohlsten, M. Gene transfer of a hybrid interleukin-1-beta gene to B16 mouse melanoma recruits leucocyte subsets and reduces tumour growth in vivo. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 44: 273-281, 1997.

Bucci, C., Lutcke, A., Steele-Mortimer, O., Olkkonen, V.M., Dupree, P., Chiariello, M., Bruni, C.B., Simons, K. and Zerial, M. Co-operative regulation of endocytosis by three Rab5 isoforms. *FEBS Letters*, 366: 65-71, 1995.

Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B. and Zerial, M. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, 70: 715-28, 1992.

Bucci, C., Wandinger-Ness, A., Lutcke, A., Chiariello, M., Bruni, C.B. and Zerial, M. Rab5a is a common component of the apical and basolateral endocytic machinery in polarized epithelial cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, *91*: 5061-5, 1994.

Budzynski, W. and Radzikowski, C. Cytotoxic cells in immunodeficient athymic mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, *16*: 319-346, 1994.

Chambon, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB Journal*, *10*: 940-954, 1996.

Davidson, W.F., Kress, M., Khoury, G. and Jay, G. Comparison of HLA class I gene sequences. *J. Biol. Chem.*, *260*: 13414-13423, 1985.

de Hoop, M.J., Huber, L.A., Stenmark, H., Williamson, E., Zerial, M., Parton, R.G. and Dotti, C.G. The involvement of the small GTP-binding protein Rab5a in neuronal endocytosis. *Neuron*, *13*: 11-22, 1994.

Deed, R.W., Hirose, T., Mitchell, E.L., Santibanez-Koref, M.F. and Norton, J.D. Structural organisation and chromosomal mapping of the human Id-3 gene. *Gene*, *151*: 309-14, 1994a.

Deed, R.W., Jasiok, M. and Norton, J.D. Nucleotide sequence of the cDNA encoding human helix-loop-helix Id-1 protein: identification of functionally conserved residues common to Id proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1219*: 160-2, 1994b.

Deed, R.W., Jasiok, M. and Norton, J.D. Attenuated function of a variant form of the helix-loop-helix protein, Id-3, generated by an alternative splicing mechanism. *FEBS Letters*, 393: 113-6, 1996.

Gebert, J.F., Moghal, N., Frangioni, J.V., Sugarbaker, D.J. and Neel, B.G. High frequency of retinoic acid receptor β abnormalities in human lung cancer. *Oncogene*, 6: 1859-1868, 1991.

Geisen, C., Denk, C., Gremm, B., Baust, C., Karger, C., Bollag, W. and Schwarz, E. High-level expression of retinoic acid receptor β gene in normal cell of the uterine cervix is regulated by the retinoic acid receptor α and is abnormally down regulated in cervical carcinoma cells. *Cancer Research*, 57: 1460-1467, 1997.

Geradts, J., Chen, J.-Y., Russell, E.K., Yankaskas, J.R., Nieves, L. and Minna, J.D. Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. *Cell Growth and Differentiation*, 4: 799-809, 1993.

Hoffman, A.D., Engelstein, D., Bogenrieder, T., Papandreou, C.N., Steckelman, E., Dave, A., Motzer, R.J., Dmitrovsky, E., Albino, A.P. and Nanus, D.M. Expression of retinoic acid receptor β in human renal cell carcinomas correlates with sensitivity to the antiproliferative effects of 13-cis-retinoic acid. *Clinical Cancer Research*, 2: 1077-1082, 1996.

Houle, B., Leduc, F. and Bradley, W.E.C. Implication of RAR β in epidermoid (squamous) lung cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 3: 358-366, 1991.

Houle, B., Rochette-Egly, C. and Bradley, W.E.C. Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor β in human epidermoid lung cancer cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, *90*: 985-989, 1993.

Jarrous, N. and Kaempfer, R. Induction of human interleukin 1 gene expression by retinoic acid and its regulation at processing of precursor transcripts. *J. Biol. Chem.*, *269*: 23141-23149, 1994.

Jing, Y., Zhang, J., Bleiweiss, I.J., Waxman, S., Zelent, A. and Mira-Y-Lopez, R. Defective expression of cellular retinol binding protein type i and retinoic acid receptors $\alpha 2$, $\beta 2$ and $\gamma 2$ in human breast cancer cells. *FASEB Journal*, *10*: 1064-1070, 1996.

Kok, K., Naylor, S.L. and Buys, C.H.C.M. Deletion of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv. in Cancer Res.*, *27-92*, 1997.

Lansink, M. and Kooistra, T. Stimulation of tissue-type plasminogen activator expression by retinoic acid in human endothelial cells requires retinoic acid receptor $\beta 2$ induction. *Blood*, *88*: 531-541, 1996.

Leid, M., Kastner, P. and Chambon, P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends in Biological Sciences*, *17*: 427-433, 1992.

Li, X.-S., Shao, Z.-M., Sheikh, M.S., Eiseman, J.L., Sentz, D., Jetten, A.M., Chen, J.-C., Dawson, M.I., Aisner, S., Rishi, A.K., Gutierrez, P., Schnappel, L.

and Fontana, J.A. Retinoic acid nuclear receptor β inhibits breast carcinoma anchorage independent growth. *Journal of Cellular Physiology*, *165*: 449-458, 1995.

Liu, Y., Lee, M.-O., Wang, H.-G., Li, Y., Hashimoto, Y., Klaus, M., Reed, J.C. and Zhang, X.K. Retinoic acid receptor β mediates the growth inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, *16*: 1138-1149, 1996.

Matikainen, S., Tapiovaara, H., Vaheri, A. and Hurme, M. Activation of interleukin-1 β gene expression during retinoic acid-induced granulocytic differentiation of promyeloid leukemia cells. *Cell Growth and Differentiation*, *5*: 975-982, 1994.

Mattei, M.-G., Rivière, M., Krust, A., Ingvarsson, S., Vennström, B., Quamrul Islam, M., Levan, G., Kastner, P., Zelent, A., Chambon, P., Szpirer, J. and Szpirer, C. Chromosomal assignment of retinoic acid receptor (RAR) genes in the human, mouse and rat genomes. *Genomics*, *10*: 1061-1069, 1991.

Nervi, C., Vollberg, T.M., George, M.D., Zelent, A., Chambon, P. and Jetten, A.M. Expression of nuclear retinoic acid receptors in normal tracheobronchial cells and in lung carcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, *195*: 163-170, 1991.

Pandolfi, F., Trentin, L., Boyle, L.A., Stamenkovic, I., Byers, H.R., Colvin, R.B. and Kurnick, J.T. Expression of cell adhesion molecules in human melanoma cell lines and their role in cytotoxicity mediated by tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer*, *69*: 1165-1173, 1992.

Parham, P., Lomen, C.E., Lawlor, D.A., Ways, J.P., Holmes, N., Coppin, H.L., Salter, R.D., Wan, A.M. and Ennis, P.D. Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4005-4009, 1988.

Roman, S.D., Clarke, C.L., Hall, R.E., Alexander, I.E. and Sutherland, R.L. Expression and regulation of retinoic acid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 52: 2236-2242, 1992.

Ross, H.J. The antiproliferative effect of trans-retinoic acid is associated with selective induction of interleukin-1 beta, a cytokine that directly inhibits growth of lung cancer. *Oncology Research*, 8: 171-178, 1996.

Rousseau-Merck, M.F., Zahraoui, A., Touchot, N., Tavitian, A. and Berger, R. Chromosome assignment of four RAS-related RAB genes. *Human Genetics*, 86: 350-4, 1991.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.

Seewaldt, V.L., Johnson, B.S., Parker, M.B., Collins, S.J. and Swisshelm, K. Expression of retinoic acid receptor β mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cell Growth and Differ.*, 6: 1077-1088, 1995.

Segars, J.H., Nagata, T., Bours, V., Medin, J.A., Franzoso, G., Blanco, J.C.G., Drew, P.D., Becker, K.G., An, J., Tang, T., Stephany, D.A., Neel, B., Siebenlist, U. and Ozato, K. Retinoic acid induction of major histocompatibility

complex class I gene in NTera/2 embryonal carcinoma cells involves induction of NF-kB (p50-p65) and retinoic acid receptor β -retinoid X receptor β heterodimers. *Mol Cell Biol*, 13: 6157-6169, 1993.

Sheikh, M.S., Shao, Z.M., Li, X.S., Dawson, M., Jetten, A.M., Wu, S., Conley, B.A., Garcia, M., Rochefort, H. and Fontana, J.A. Retinoid-resistant estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells transfected with retinoic acid receptor α acquire sensitivity to growth inhibition by retinoids. *J. Biol Chem.*, 269: 21440-21447, 1994.

Si, S.P., Lee, X., Tsou, H.C., Buschblaum, R., Tibaduiza, E. and Peacocke, M. RAR β 2-mediated growth inhibition in HeLa cells. *Exp. Cell Res.*, 223: 102-111, 1996.

Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L. and Springer, T.A. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*, 52: 925-933, 1988.

Swisshelm, K., Ryan, K., Lee, X., Tsou, H.C., Peacocke, M. and Sager, R. Down-regulation of retinoic acid receptor β in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell Growth and Differentiation*, 5: 133-141, 1994.

Toulouse, A., Morin, J., Ying, Y., Ayoub, J. and Bradley, W.E.C. Retinoic acid receptor β : An exploration of its role in lung cancer suppression and its potential in cancer prevention. *In: Clinical and biological basis of lung cancer prevention*, ed.,

Martinet, Y., Hirsch, F.R., Martinet, N., Vignaud, J.-M. and Mulshine, J.L. eds. Birkhäuser-Verlag, Basel. 1998.

van der Burg, B., van der Leede, B.J.M., Kwakkenbos-Isbrüker, L., Salverda, S., de Laat, S.W. and van der Saag, P.T. Retinoic acid resistance of estradiol-independent breast cancer cells coincides with diminished retinoic acid receptor function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *91*: 149-147, 1993.

van der Leede, B.J.M., Folkers, G.E., van den Brink, C.E., van der Saag, P.T. and van der Burg, B. Retinoic acid receptor $\alpha 1$ isoform is induced by estradiol and confers retinoic acid sensitivity in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, *109*: 77-86, 1995.

Vanky, F., Wang, P., Patarroyo, M. and Klein, E. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 and major histocompatibility complex class I antigens on human tumor cells is required for their interaction with autologous lymphocytes *in vitro*. *Cancer Immunol. Immunother.*, *31*: 19-27, 1990.

Wang, Z., Cao, Y., D'Urso, C.M. and Ferrone, S. Differential susceptibility of cultured human melanoma cell lines to enhancement by retinoic acid if intercellular adhesion molecule 1 expression. *Cancer Res.*, *52*: 4766-4772, 1992.

Webb, D.S.A., Mostowski, H.S. and Gerrard, T.L. Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J. Immunol.*, *146*: 3682-3686, 1991.

Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D. and McClelland, M. Arbitrarily Primed PCR Fingerprint of RNA. *Nucleic Acids Research*, 20: 4965-4970, 1992.

Whang-Peng, J., Kao-Shan, C.S., Lee, E.C., Bunn, P.A., Carney, D.N., Gazdar, A.F. and Minna, J.D. Specific Chromosome Defect Associated with Human Small Cell Lung Cancer: Deletion 3p(14-23). *Science*, 215: 181-182, 1982.

Zou, C.P., Clifford, J.L., Xu, X.C., Sacks, P.G., Chambon, P., Hong, W.K. and Lotan, R. Modulation by retinoic acid (RA) of squamous differentiation, cellular RA-binding proteins and nuclear RA receptors in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Reserach*, 54: 5479-5487, 1994.

Footnotes to title page

¹Corresponding author: CRLCS, Centre de recherche du CHUM, 1560 rue Sherbrooke E., Montréal, Canada, H2L 4M1.

²Abbreviations: RA: retinoic acid, RAR: retinoic acid receptor, Tg: transgene, bp: base pair, LOH: loss of heterozygosity

Table I: Variations in fingerprint profiles

Transgene expressed (# of peaks analyzed)	Category^a	Augmented # of peaks (%)	Diminished # of peaks (%)
RARβ2 (1463)	1	1 (0.07)	2 (0.14)
	2	0 (0)	0 (0)
	3	0 (0)	0 (0)
	4	21 (1.4)	16 (1.1)
RARβ1 (1131)	1	3 (0.26)	5 (0.44)
	2	4 (0.35)	6 (0.53)
	3	3 (0.26)	0 (0)
	4	28 (2.5)	20 (1.8)
RARα1 (1120)	1	3 (0.27)	3 (0.27)
	2	3 (0.27)	5 (0.45)
	3	0 (0)	0 (0)
	4	21 (1.88)	13 (1.16)

^aCategories: 1: Transgene specific: Calu \pm RA vs Transfected cells \pm RA
2: RA-activated transgene specific: RAR-transfected cells +RA vs untreated cells
3: RA specific: Calu-1 +RA similar to RAR-transfected cells +RA
Calu-1 -RA similar to RAR-transfected cells -RA
4: Clonal: Inconsistent variations

Table II: Genes differentially expressed on Atlas human cDNA Array I

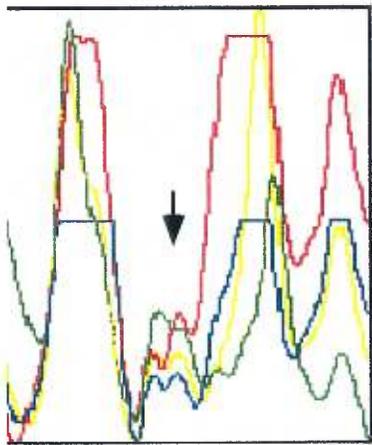
cDNA ^a	Effect ^b	Position ^a	Confirmation ^c
Inhibitor of DNA binding ID-1	A	A5e	Yes
Cyclin A	A	A6f	Yes
Cyclin G1	A	A7a	No
Cyclin A1	A	A7c	No
TOB	A	A7e	No
p14 CDK-inhibitor	A	A7n	No
ETA	D	B3d	No
RAB-5A RAS-related protein	A	B4b	Yes
CREBP1	A	B4c	No
IL-4 STAT	A	B5a	Yes
MKK3 (MAP Kinase)	D	B5g	Yes
Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1)	A	B6j	Yes
MAPKAP Kinase	D	B6m	No
CIP2	A	B7g	Yes
RAR β 2	A	C1k	Yes
CD40 ligand	A	C1n	Yes
ICH-2 Protease	A	C4g	Yes
A1 Protein (Bcl-2 related)	A	C4h	Yes
Apoptosis inhibitor IAP1	A	C4i	Yes
FAS Ligand	A	C4m	Yes
Cysteine Protease ICE-LAP3	A	C5f	Yes
Placental Thrombin Inhibitor	A	C5h	No
XRCC1 DNA Repair Protein	A	C6d	No
ERCC2 DNA Excision Repair Protein	D	C6n	No
Superoxide Dismutase 1	A	C7b	No
RAD23 UV-Excision Repair Protein	A	C7d	No
GADD45	A	C7f	Yes
Inhibitor of DNA-binding ID-3	A	D1d	Yes
Inhibitor of DNA-binding ID-2	A	D1g	No
CACCC-box Binding Protein	D	D1k	No
Transcription Factor ZFM1	D	D2m	Yes
Kruppel related zinc finger protein	A	D3e	No
colorectal mutant cancer protein	A	D4d	No
DNA-binding protein SATB1	A	D5h	Yes
Nuclear Factor NF90	D	D6h	No
HDLG1	A	D6k	Yes
Integrin alpha V	A	E5d	Yes
Intercellular adhesion molecule-1	A	E5h	Yes
CD44 antigen	D	E6d	No
Integrin alpha I	A	E7i	No
Beta-Catenin	D	E7m	No
M-CSF-1	A	F1m	No
Heparin-binding Growth Factor-1	D	F4n	No
Macrophage Inflammatory Protein 2-alpha	A	F5b	Yes
Interleukin-8	A	F5f	Yes
Insulin-like Growth Factor 1A	A	F5g	No
Interleukin-1 β	A	F5m	Yes
Placental Ribonuclease Inhibitor	D	F7a	No
Inhibin Beta	D	F7b	No
Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3	A	F7i	Yes

^aRefer to Clontech's Atlas Array Homepage for Genbank Accession Numbers (<http://www.clontech.com/clontech/APR97UPD/Atlaslist.html>).

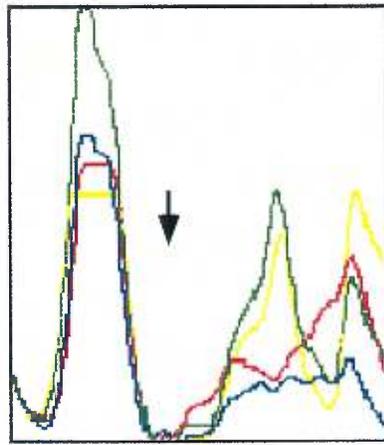
^bA: augmented or D: diminished expression in C64 RA compared to Calu-1.

^cConfirmation of RAR β 2 specific transcriptional regulation is obtained by comparing C24 RA with C30 RA (see text).

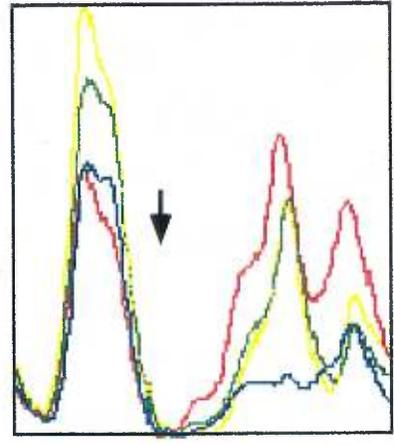
Figure 1: Fluorescent RAP-PCR results. Examples of the various categories of differentially represented cDNAs are shown. Top panel: Category I: transgene specific variations (observed when comparing Calu-1±RA and one set of RAR-transfected cells±RA) Middle panel: Category II: peaks which are specific to a set of RAR-transfected clones but need the addition of exogenous RA (comparing cells with and without RA). Bottom panel: Category IV represents changes that are not consistent with either the RA or the RAR status. Red and blue plots are RA treated samples, Yellow and green are untreated ones.



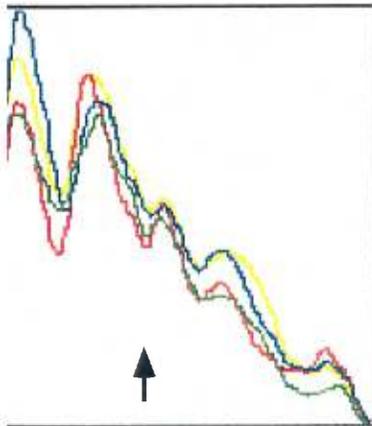
Calu-1



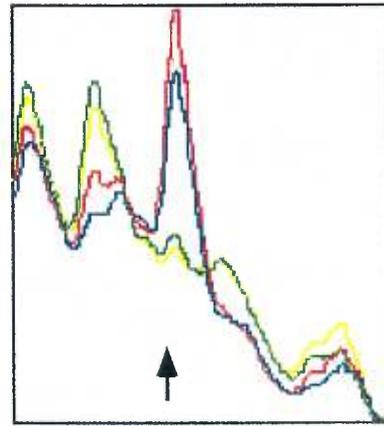
Cβ3



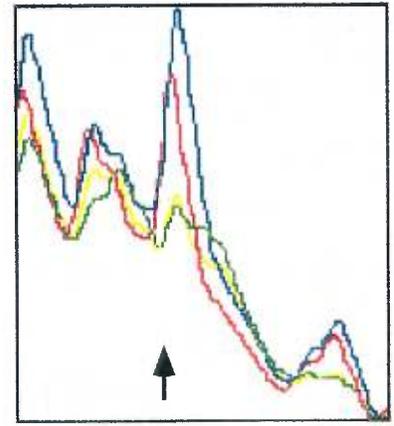
Cβ10



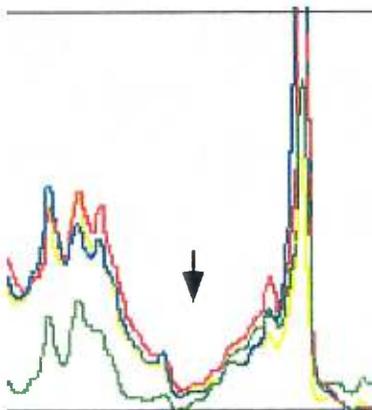
Calu-1



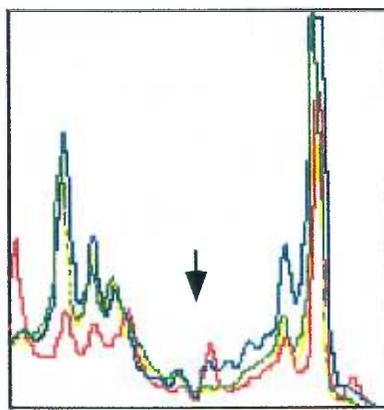
Cα33



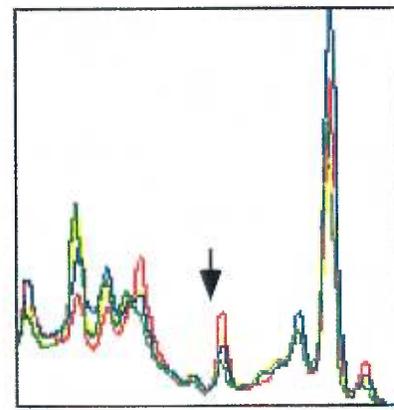
Cα43



Calu-1



Cβ3



Cβ10

Figure2: Autoradiograms of the Atlas human cDNA Array I. The membranes were hybridized either with C64 RA (RAR β 2-transfected) (Top panel) or Calu-1 (RAR β 2-) (Bottom panel) cDNA probes. For cDNAs identification consult Clontech's www page (www.clontech.com/clontech/APR97UPD/Atlaslist.html). Capital letters indicate arrays position. Small letters indicate row positions while numbers designate columns. Section G refers to the 9 housekeeping controls.

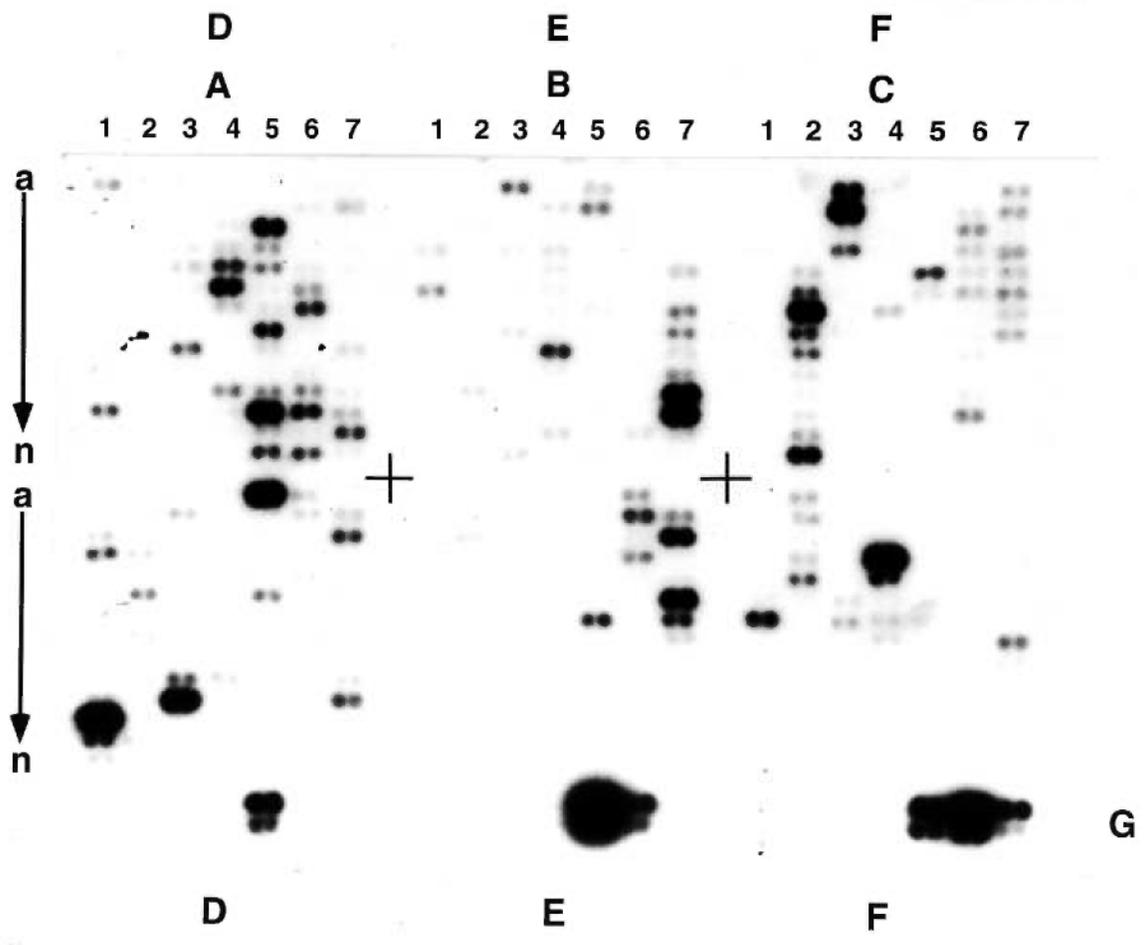
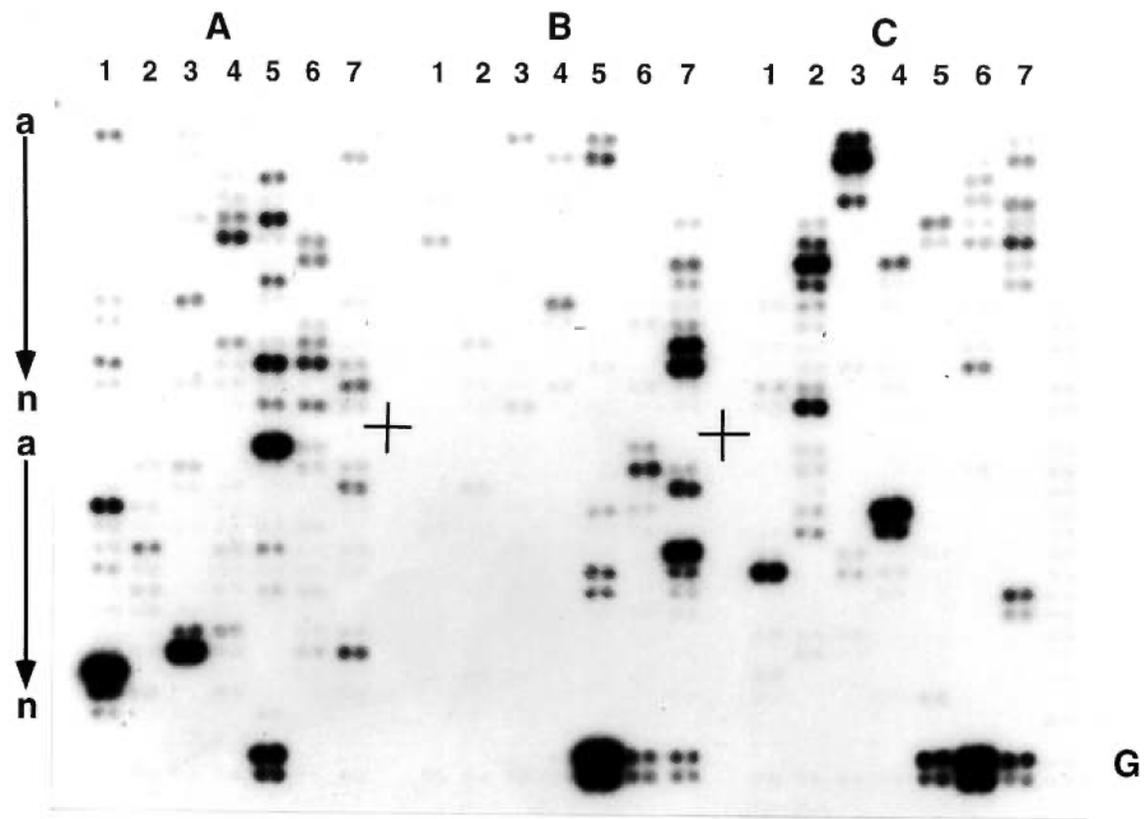
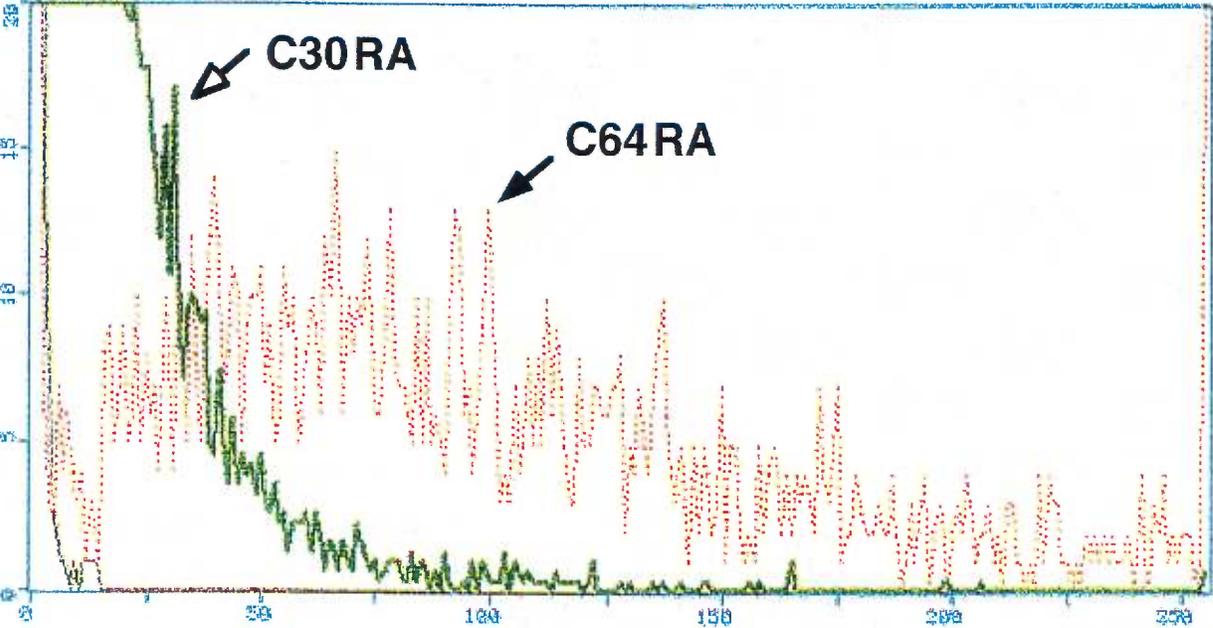
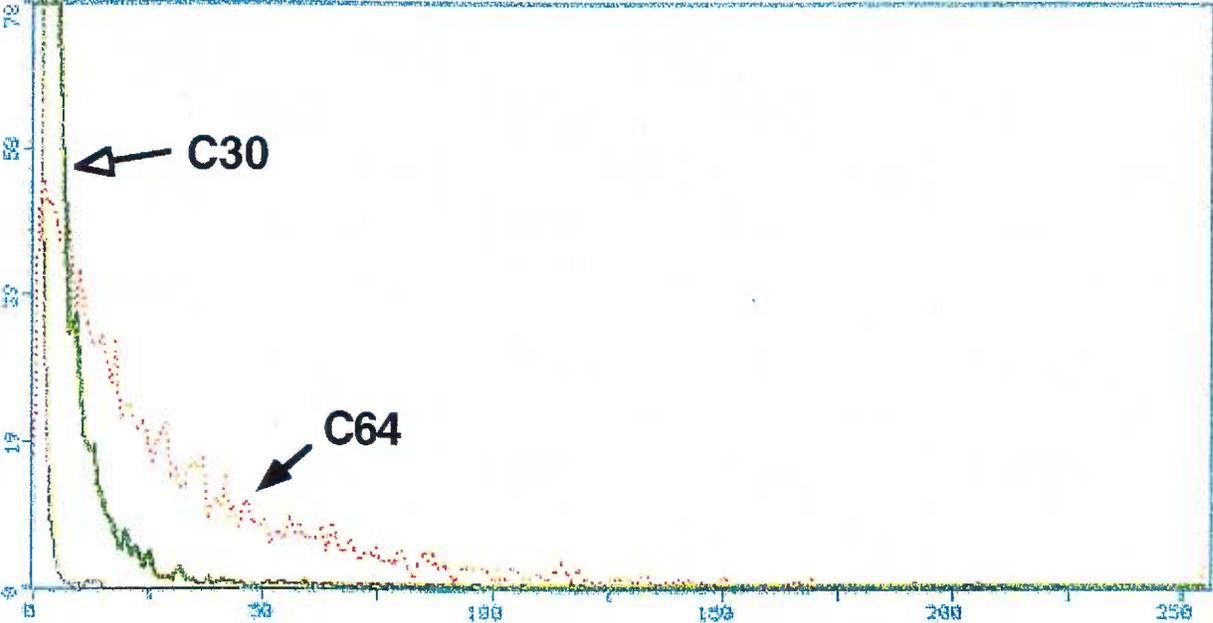
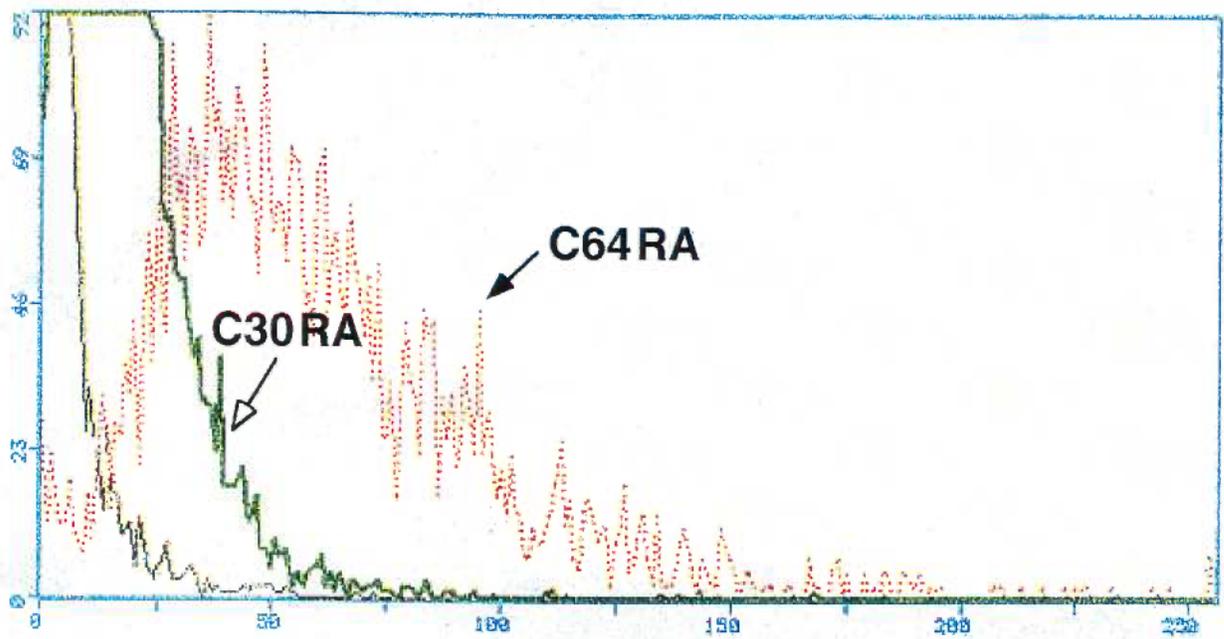
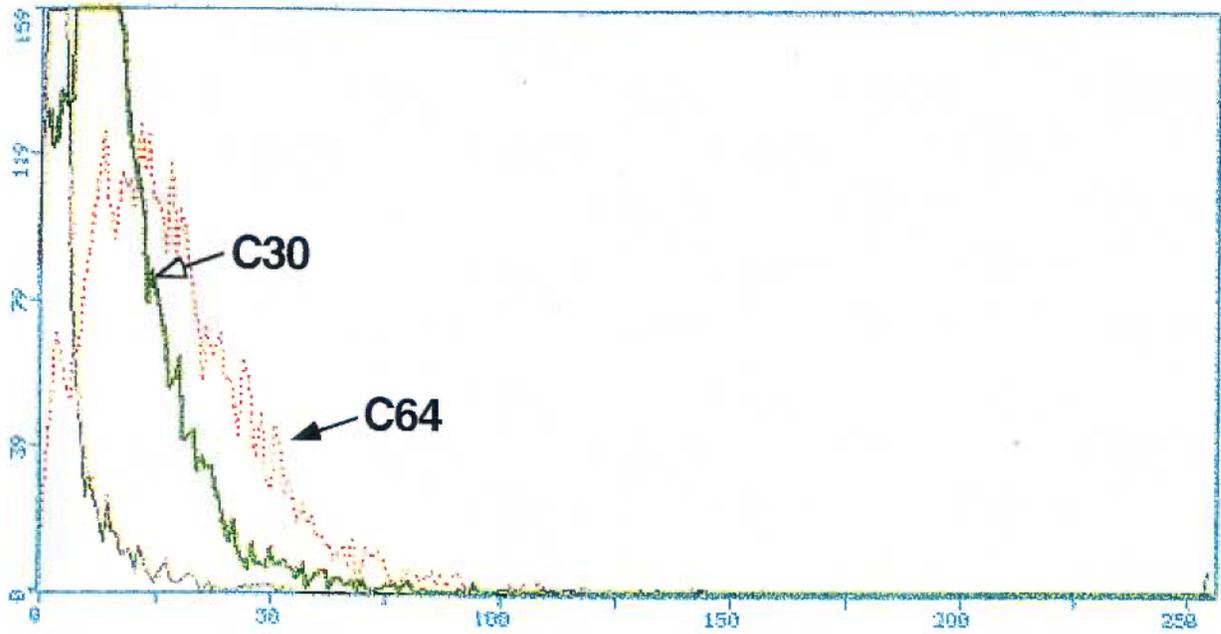


Figure 3: Expression of ICAM-1 and MHC class I molecules at the cell surface of C30 and C64 Calu-1 derivatives prior to and after treatment with 100 nM RA for 7 days. A) Binding of anti-ICAM antibody 8.4A6 was monitored with mouse anti-human IgG coupled to phycoerythrin. B) Binding of FITC-conjugated antibody W6/32 against MHC class I molecules. In both sections, the top panels present untreated cells while bottom panels show RA treated cell lines.



Fluorescence intensity



Fluorescence intensity

Chapitre 5

Discussion et conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse pourraient être séparés en deux grands thèmes, la structure du gène RAR β humain et sa comparaison avec le gène murin et l'étude de son implication dans la tumorigénèse humaine.

5.1 Structure du gène RAR β humain et implications fonctionnelles

Au chapitre 2, nous avons présenté le clonage et la caractérisation des régions 5' du gène RAR β humain. La structure établie chez la souris a permis la caractérisation de 4 isoformes dont β 1 et β 3 sont générés à partir d'un promoteur en 5' du gène (P1) et β 2- β 4 à partir d'un promoteur inductible par l'acide rétinoïque (P2) (Nagpal et al., 1992b; Zelent et al., 1991). Les exons codant les régions B à F de la protéine (exons 5 à 11) sont communs à tous les ARNs messagers (Zelent et al., 1991). On connaissait donc la structure de tout le gène, incluant le premier promoteur et un exon codant une partie des régions 5' non-traduites de RAR β 1 et β 3 (Mendelsohn et al., 1994a; Zelent et al., 1991). Chez l'humain, la structure du gène était connue à partir du deuxième promoteur et incluait les séquences en aval; cette structure présentait 8 exons codant les récepteurs dont un exon spécifique à RAR β 2 (van der Leede et al., 1992). A partir de l'exon codant la région A de RAR β 1, nous avons pu cloner et séquencer les régions 5'-UTR de cet isoforme et les séquences correspondantes aux régions promotrices P1. Nous avons établi la structure de ces régions et avons relevé des différences majeures en comparaison du gène murin.

Ces différences sont particulièrement étonnantes si l'on tient compte du fait que le promoteur et les régions codant les isoformes RAR β 2 et β 4 (promoteur P2 et exons 5 à 12, figure 2 du chapitre 2) sont remarquablement bien conservés tant dans les parties codantes que non-traduites. La région codante de RAR β 1 (exon 4, figure 2 du chapitre 2) est elle aussi conservée entre les isoformes murin et humain (Houle et al., 1994; Shen et al., 1991; Zelent et al., 1991). Par contre, ici, nous avons relevé

des différences marquées quant à la séquence des régions 5' non-codantes de RAR β 1 et au nombre d'exons, 4 chez l'humain contre 2 chez la souris. La localisation des séquences d'initiation de la transcription est fort différente entre l'humain et la souris. Chez l'humain, nous avons localisé une séquence précise par contre, Mendelsohn et ses collègues (1994) ont décrit une répétition CT de 67 nucléotides chez la souris comme site d'initiation. Le patron d'expression est très différent entre l'humain et la souris, les isoformes β 1 et β 3 murins sont générés par épissage alternatif et présents dans différents tissus tant adultes que fœtaux alors que chez l'humain le patron d'expression est principalement fœtal. Finalement, nous n'avons trouvé aucune évidence pour l'existence de l'isoforme RAR β 3 chez l'humain. Chez la souris, cet isoforme est généré par l'insertion d'un exon de 81 nucléotides entre la région spécifique à RAR β 1 (domaine A) et les régions communes à tous les isoformes (régions B-F) générant un domaine A plus long de 27 acides aminés pour RAR β 3. Chez l'humain, nous n'avons pu détecter RAR β 3 ni par buvardage Southern pour détecter l'exon spécifique, ni par RT-PCR sur un groupe d'une trentaine de lignées et de tissus humains où le promoteur P1 est actif.

Les différences de séquence et de structure pourraient refléter les différences observées dans le patron d'expression. Zimmer et al. ont démontré que les courts cadres de lecture (ORF) en 5' non-codant de RAR β 2 pouvaient influencer la distribution des ARN messagers dans certains tissus (Zimmer et al., 1994). Zelent et al. ont montré que RAR β 1 et RAR β 3, chez la souris, ont un patron d'expression spécifique à certains tissus (Zelent et al., 1991) alors que chez l'humain l'expression de RAR β 1 est surtout limitée aux tissus fœtaux à l'exception de certaines lignées de carcinomes SCLC (Houle et al., 1994) et rénaux (Hoffman et al., 1996). Dans le contexte du profil d'expression, les différences entre les régions promotrices putatives et 5'-non-traduites humaines et murines ne sont guère surprenantes

puisqu'elles sont probablement le reflet d'une divergence de rôle s'étant établie au cours de l'évolution. Les différences relevées entre le gène murin et le gène humain suggèrent donc un rôle différent pour les isoformes RAR β 1 mais un mode de fonctionnement similaire. Les régions régulatrices de l'expression (promoteur et 5' non-traduit) et le patron d'expression étant différents, il est peu probable que les isoformes humains et murins jouent un rôle semblable puisqu'ils ne sont exprimés ni au même moment ni au même endroit. Il y aurait donc eu spécialisation du rôle par différenciation du profil d'expression. Par contre, la conservation des régions codantes démontre que le fonctionnement du récepteur est le même chez les deux organismes et est similaire à celui de tous les autres membres de la famille des RARs.

5.2 La recherche des mécanismes de suppression tumorale

Comme nous l'avons mentionné, les tumeurs pulmonaires subissent des pertes d'hétérozygotie à haute fréquence du chromosome 3p (Kok et al., 1997; Whang-Peng et al., 1982). Il a été démontré qu'il s'agit d'un des événements les plus précoces au cours du développement de tumeurs pulmonaires. Certains travaux montrent que les pertes de matériel en 3p sont détectables dans les lésions pré-néoplasiques, ce qui suggère fortement que l'inactivation de gènes suppresseurs situés dans ces régions sont des événements essentiels à la formation de carcinomes pulmonaires (Chung et al., 1995; Hung et al., 1995; Sundaresan et al., 1992). Plusieurs groupes se sont attardés au fil des ans à la recherche de gènes situés principalement dans la région 3p21 qui est altérée dans pratiquement 100% des carcinomes pulmonaires SCLC. Les travaux du groupe de Naylor ont permis de définir un fragment de 2 mégabases capable de suppression tumorale dans la région

3p21.3-p22 (Killary et al., 1992). Par contre, aucun gène de cette région n'a encore été établi clairement comme gène suppresseur dans les tumeurs pulmonaires.

Le patron de perte d'hétérozygotie au chromosome 3p est particulièrement intéressant en ce qui concerne les carcinomes épidermoïdes puisque cette perte inclut généralement les régions en 3p24-26 où RAR β est localisé (Houle et al., 1991; Mattei et al., 1991; Yokoyama et al., 1992) Cette délétion combinée à des études d'expression des différents gènes localisés dans cette région ont permis de démontrer que RAR β est un gène dont l'expression est altérée dans plusieurs lignées et tumeurs pulmonaires mais particulièrement dans celles de type épidermoïde (voir le chapitre 1) (Gebert et al., 1991; Houle et al., 1991; Nervi et al., 1991).

5.2.1 Implication des RARs dans le contrôle de la tumorigénèse pulmonaire

5.2.1.1 Modèles de culture cellulaire

Plusieurs groupes ont déjà montré qu'il existait une forte association entre la perte d'expression de RAR β et les cancers épithéliaux. Certains travaux ont montré que l'introduction de ce gène dans des cellules qui en ont perdu l'expression cause une diminution de leur capacités de croissance *in vitro* en réponse à l'acide rétinoïque. De même, plusieurs lignées cellulaires répondent aux effets inhibiteurs de l'acide rétinoïque en induisant l'expression de RAR β via son RARE. Toutefois, d'autres groupes ont aussi montré que le gène RAR α pouvait jouer un rôle similaire de suppression de la croissance en réponse à l'acide rétinoïque dans le cancer mammaire. Dans ce système, les expériences de Liu et ses collaborateurs ont par la

suite démontré que l'expression de RAR α induisait celle de RAR β 2 qui à son tour induisait l'apoptose des cellules cancéreuses transfectées (Liu et al., 1996). Des résultats obtenus sur des lignées de cancer du col utérin suggèrent un mécanisme similaire où RAR α induirait RAR β 2 qui contrôle l'entrée en apoptose des cellules (Geisen et al., 1997).

Suite à ces travaux, la question de la spécificité de l'effet suppresseur de RAR β 2 se posait pour le système de carcinomes épidermoïdes. Les études de pertes d'hétérozygotie ne montrent pas d'altération fréquente des chromosomes 17q21 et 12q13 qui hébergent les gènes pour RAR α et RAR γ (Mattei et al., 1991; Minna et al., 1997). Ainsi, les études d'expression des RARs dans les différents carcinomes épithéliaux ne montrent pas d'altération spécifique de ces gènes sinon dans le cas de RAR β pour lequel on note fréquemment une diminution des niveaux d'expression dans les tumeurs épithéliales et RAR α qui a été associé avec le statut des récepteurs d'estrogène dans les tumeurs mammaires (Roman et al., 1992; van der Burg et al., 1993).

Comme les cellules de cancers épidermoïdes expriment les gènes RAR α et RAR γ , trois possibilités pourraient expliquer l'effet suppresseur observé en transfectant RAR β 2 dans ces lignées cellulaires. La première explication plausible serait que l'effet observé est causé par la hausse des niveaux de RARs. Puisque les cellules de lignées épidermoïdes ont perdu l'expression du gène RAR β , elles ont des niveaux de RARs (incluant RAR α et RAR γ) plus faibles que ceux observés dans le poumon normal. La transfection de RAR β 2 et l'expression de ce transgène rétablirait les niveaux de RARs au-delà d'un certain seuil et seulement une fois ce seuil franchit les récepteurs pourraient moduler les effets suppresseurs de l'acide rétinoïque.

La deuxième possibilité invoque une certaine spécificité. Comme nous l'avons mentionné, les isoformes générés à partir d'un même gène partagent environ 85% des domaines protéiques (domaines B à F), il est donc concevable qu'un autre isoforme de RAR β puisse posséder des fonctions similaires à celles de RAR β 2. La différence entre les divers isoformes d'un même gène étant localisée au niveau de la région A qui abrite une fonction d'activation de la transcription (AF-1); il est probable que deux isoformes d'un même gène auront des cibles transcriptionnelles communes (activées par l'AF-2) en plus d'en avoir plusieurs qui leur sont spécifiques (activées par l'AF-1 ou dépendantes de la conformation spécifique du récepteur).

Troisièmement, il reste l'option d'un effet suppresseur spécifique à RAR β 2. La séquence et la structure de RAR β 2 en feraient un isoforme qui activerait spécifiquement certains gènes qui à leur tour seraient impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire et de la tumorigénèse. Au chapitre 3 nous avons démontré que ce mécanisme est celui prévalant dans la lignée de tumeur épidermoïde Calu-1.

Comme nous l'avons montré, les cellules transfectées par RAR α 1 croissent à une vitesse réduite par rapport à la lignée mère (C α 33 et C α 43 *vs* Calu-1). Il est important de noter que malgré ce ralentissement, l'ajout d'acide rétinoïque au milieu de culture n'a pas eu d'effets additionnels sur la vitesse de croissance des transfectants. Ceci suggère que RAR α 1 est effectivement incapable de moduler les effets antiprolifératifs de l'acide rétinoïque. La comparaison des taux de croissance des transfectants RAR α 1 avec un clone exprimant le gène de résistance à la néomycine suggère que cet effet serait, en partie, clonal. Le tableau I du chapitre 3 montre que le transfectant Cneo a un taux de croissance intermédiaire entre ceux des

transfectants RAR α 1 (C α 33 et C α 43) et Calu-1. Ceci laisse croire que lors de la sélection des clones, ceux ayant une vitesse de croissance réduite ont été favorisés.

Sachant que les RARs peuvent être des régulateurs négatifs de la transcription même en absence d'acide rétinoïque, il est plausible que les hauts niveaux de RAR α 1 et RAR β 2 soient responsables de la répression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire. Comme nous venons de le mentionner, les transfectants RAR α 1 ont une vitesse de croissance ralentie par rapport aux cellules Calu-1 et l'ajout d'acide rétinoïque au milieu de culture n'affecte pas ce taux de croissance suggérant un mécanisme indépendant de l'acide rétinoïque. De même, les transfectants RAR β 2 ont une vitesse de croissance ralentie en absence d'acide rétinoïque et cette différence est accentuée par l'ajout d'acide rétinoïque au milieu de croissance. Ces résultats suggèrent deux mécanismes distincts de suppression de la croissance. Le premier serait indépendant de l'acide rétinoïque et impliquerait la répression de certains gènes par RAR α 1 ou RAR β 2. Par contre, la médiation des effets antiprolifératifs induits par l'acide rétinoïque nécessiterait la présence spécifique de RAR β 2 qui activerait alors la transcription de gènes impliqués dans la suppression de la croissance cellulaire.

Nos expériences de transfection et de croissance montrent donc que ni RAR α 1 ni RAR β 1 ne sont capables de faire la médiation des effets suppresseurs de l'acide rétinoïque et que seul RAR β 2 peut le faire. Nous écartons donc les deux premières hypothèses puisque l'augmentation des niveaux globaux de RARs (via la surexpression de RAR α 1 ou l'expression de RAR β 1) ne suffit pas à causer la suppression de la croissance cellulaire par l'acide rétinoïque. De la même façon, un autre isoforme de RAR β (RAR β 1 dans le cas présent) ne peut contrôler la

croissance des cellules Calu-1 que ce soit en présence ou en absence de concentrations pharmacologiques d'acide rétinoïque.

A prime abord, cela peut sembler surprenant si l'on considère que dans certains autres systèmes $RAR\alpha1$ est impliqué dans la modulation de certains des effets antiprolifératifs de l'acide rétinoïque. Les cellules de cancers épithéliaux qui répondent aux effets antiprolifératifs de l'acide réinoïque sont généralement celles capables d'induire l'expression à hauts niveaux de $RAR\beta2$. Certains travaux ont cependant montré qu'il y avait perte d'inductibilité de $RAR\beta2$ dans les cellules de cancer pulmonaire (Geradts et al., 1993). Cette perte d'inductibilité pourrait expliquer l'impossibilité de $RAR\alpha1$ à moduler les effets supresseurs de l'acide rétinoïque si l'on considère qu'il est impliqué dans cette modulation en induisant $RAR\beta2$ comme dans les carcinomes mammaires et du col utérin.

D'un autre côté, la spécificité de $RAR\beta2$ par rapport à $RAR\beta1$ s'explique probablement par le choix des gènes cibles que ceux-ci vont activer. Bien que les deux isoformes partagent 85 % des séquences protéiques, ils sont suffisamment différents dans leurs régions A pour que la spécificité des gènes cibles soit aussi différente. Parmi les gènes contrôlés par $RAR\beta2$ plusieurs sont probablement impliqués dans le contrôle de la croissance et la suppression tumorale.

Les travaux que nous avons présenté au chapitre 3 montrent que dans les cellules Calu-1 transfectées avec différents isoformes de RAR, il y a une induction de $RAR\alpha2$. Le promoteur de cet isoforme, comme celui de $RAR\beta2$, est inductible par les récepteurs de l'acide rétinoïque et possède un RARE. Dans ces mêmes cellules où $RAR\alpha2$ est induit, nous n'avons pas observé d'induction de $RAR\beta2$. La différence d'inductibilité par rapport à $RAR\alpha2$ suggère fortement que les cellules de

cancer pulmonaire ont évolué de façon à bloquer l'expression et l'inductibilité de RAR β 2 spécifiquement. Ce blocage pourrait être de différentes natures par exemple, hyper-méthylation ou mutation des régions promotrices ou encore absence de co-facteurs essentiels à l'induction de RAR β 2. Les travaux de différents groupes suggèrent qu'il y aurait effectivement absence de co-facteurs essentiels dans les lignées pulmonaires ayant perdu la capacité d'induire RAR β 2 en réponse à l'acide rétinoïque (Moghal et Neel, 1995; Zhang et al., 1994). Il faut cependant noter que toutes les voies de régulation par l'acide rétinoïque ne sont pas altérées puisque RAR α 2 demeure inductible. Cette capacité des cellules Calu-1 à induire l'expression de RAR α 2 mais non celle de RAR β 2 en absence d'effets antiprolifératifs de l'acide rétinoïque (i.e. dans les transfectants α 1 et β 1) écarte d'autant la possibilité d'un rôle potentiel de RAR α 2 dans la médiation des effets suppresseurs de l'acide rétinoïque.

Ces derniers résultats, couplés avec nos expériences de croissance et les résultats des autres groupes pointent tous dans une seule et unique direction en termes de suppression tumorale, RAR β 2. Il semble en effet que RAR β 2 soit le seul RAR capable de suppression tumorale en réponse à l'acide rétinoïque dans les carcinomes pulmonaires. Dans les autres systèmes où son rôle a été analysé, la fonction suppressive de RAR α 1 semble consister principalement à stimuler l'expression de RAR β 2 qui à son tour induira les gènes en aval impliqués dans le contrôle de la tumorigénèse.

5.2.1.2 Modèles murins, tumorigénèse pulmonaire et RAR β 2

Des travaux effectués par notre groupe avec un modèle murin soutiennent l'hypothèse d'un rôle majeur de RAR β 2 dans la carcinogénèse. L'expression

constitutive d'un RAR β tronqué de son domaine A en N-terminal cause chez la souris une forte augmentation de la fréquence de tumeurs de type épithélial (Bérard et al., 1994). Cet isoforme tronqué est similaire à l'isoforme RAR β 4 à l'exception des quatre premiers acides aminés et est dépourvu de la fonction d'activation de la transcription AF-1. Bérard et ses collaborateurs ont montré que l'expression de cet isoforme est associée avec une diminution de l'expression de RAR β 2 dans certains des tissus qui expriment fortement le RAR β tronqué. L'hypothèse la plus plausible à ce stade est que ce RAR β tronqué cause une diminution de l'expression en compétitionnant pour la liaison des RXRs et des RARE avec les autres isoformes normalement capables de stimuler l'expression de RAR β 2. Cette compétition pour le RARE de RAR β 2 causerait une diminution de l'expression de cet isoforme et cette diminution pourrait être impliquée dans la formation des tumeurs.

D'autres travaux, toujours avec un modèle murin appuient la thèse qu'une diminution d'expression de RAR β 2 est associée avec la formation de tumeurs. Bérard et al. ont montré que l'expression de constructions antisens dirigées contre RAR β 2 provoquait la formation de tumeurs pulmonaires à haute fréquence (21/36 souris pour un total de 43 tumeurs) avec une incidence deux fois plus élevée chez les souris homozygotes que chez les souris hémizygotés (Bérard et al., 1996). Ils ont montré que le tissu pulmonaire des souris transgéniques présentait une diminution de 30% de l'expression de RAR β 2 et que cette diminution était accentuée dans les tumeurs. Par contre, les soeurs de couche non-transgéniques ont des niveaux normaux de RAR β 2 et présentent des tumeurs à une fréquence très faible (1 tumeur pour 23 souris) ce qui suggère qu'une diminution des niveaux de RAR β 2 peut être associée à une augmentation du risque de développer des tumeurs.

Dans la perspective de ces modèles murins, il est intéressant de noter qu'aucun rapport ne fait état de tumeurs pulmonaires chez les souris ayant subi une inactivation fonctionnelle (knock-out) du gène RAR β ou de l'isoforme β 2 en particulier. Chez ces souris, la plupart des travaux font état d'un mécanisme de compensation, au moins partiel, par les autres récepteurs de l'acide rétinoïque pour palier à la perte de RAR β . Chez les souris transgéniques mentionnées ici, les travaux de Bérard et al. (1994, 1996) ont fait état d'une diminution des niveaux de RAR β 2 mais pas d'une inactivation complète. Cette expression résiduelle à faible niveau pourrait expliquer l'absence d'apparition de mécanismes compensatoires lors des premiers stades de développement comme chez les souris ayant subi l'inactivation du gène.

Les travaux tant chez l'humain que chez la souris pointent donc vers la diminution d'expression de RAR β 2 comme étant un événement important dans la formation des tumeurs pulmonaires. Les expériences dans différents types de cancers épithéliaux suggèrent que la ré-expression de cet isoforme est associée avec la diminution de croissance, la mort cellulaire et la suppression tumorale.

5.2.2 RAR β et le contrôle transcriptionnel

Sachant que les RARs sont des modulateurs transcriptionnels et que RAR β 2 a des capacités uniques vis-à-vis la médiation des effets suppresseurs de l'acide rétinoïque, il devenait important de rechercher quels sont les gènes qui sont spécifiquement sous son contrôle. Au chapitre 4 de cette thèse, nous avons décrit notre recherche de tels gènes susceptibles d'être impliqués dans la suppression de la tumorigénèse. Plusieurs approches sont disponibles pour identifier ces gènes mais

nous avons privilégié deux méthodes que nous aborderons au cours des prochains paragraphes.

5.2.2.1 Caractérisation par RAP-PCR des lignées dérivées de Calu-1

La première étape de cette recherche de gènes consistait à caractériser les différentes lignées obtenues dans les expériences précédentes d'un point de vue transcriptionnel. Depuis plusieurs années, les recherches de gènes exprimés de façon différentielle entre deux lignées ou tissus reposaient sur des techniques d'hybridation différentielle ou soustractive de bibliothèques d'ADNc; ces techniques sont cependant fastidieuses. Depuis quelques années, des techniques tirant profit de la réaction en chaîne de polymérase ont été développées simplifiant de beaucoup la recherche de gènes exprimés de façon différentielle.

La technique de représentation différentielle a été mise au point en 1992 par Liang et Pardee (Liang et Pardee, 1992). Cette technique fait appel à l'amplification différentielle de fragments d'ADNc générés par transcription inverse. Ainsi, à partir d'ARNm dérivé de tissus ou lignées cellulaires que l'on veut comparer, on génère un ADNc. Pour ce faire, on utilise une amorce d'oligo(dT) qui porte deux nucléotides spécifiques à son extrémité 3'. Cette ancre de deux nucléotides forcera la sélection des ARNm comportant ces nucléotides juste en amont de la queue polyadénylée ainsi 1 ARNm sur 12 sera transcrit en ADN. L'ADNc généré sera par la suite soumis à une amplification par PCR à l'aide d'amorces contenant généralement des permutations de nucléotides à certaines bases. Ces permutations permettent à l'amorce de s'hybrider à différentes séquences et d'amplifier des fragments divers. Ces fragments sont ensuite résolus sur gel de polyacrylamide et

le patron des différentes populations de départ est évalué. Les "différences" i.e. les bandes qui apparaissent ou disparaissent dans une population particulière peuvent être isolées et clonées. Cette technique crée une sélection dès l'étape initiale par l'utilisation d'un oligo(dT) ancré. Seule une fraction de l'ARNm initial pourra donc être étudiée et plusieurs gènes importants ne seront pas représentés.

D'autres techniques ont été dérivées de celle-ci, parmi lesquelles, la technique de RAP-PCR (Arbitrarily-primed PCR fingerprinting of RNA) décrite par Welsh et ses collaborateurs (Welsh et al., 1992). Cette technique est basée sur l'utilisation de la même amorce pour la transcription réverse et l'amplification des ADNc générés. L'étape de transcription réverse et la première étape de PCR se font à faible stringence, permettant l'hybridation des amorces en plusieurs points et sur quelques nucléotides seulement. Cette hybridation à faible stringence permet donc l'initiation de la transcription en n'importe quel point de l'ARNm (pour autant qu'il y ait hybridation de l'amorce) contrairement à la méthode décrite plus haut qui utilise la queue polyadénylée comme site d'initiation (McLelland et al., 1995). Les produits d'ADNc générés possèdent donc un oligonucléotide aux deux extrémités et peuvent ainsi être amplifiés par PCR. Cette méthode permet l'utilisation d'amorces variées seules ou en combinaison, ce qui permet de générer encore plus de différences.

Toutefois, il faut être conscient que ces techniques font appel à l'amplification par PCR; un gène peu exprimé a donc très peu de chances d'être représenté dans le produit final. Il est important lors de l'utilisation de techniques comme celles-ci de contrôler la qualité des amplifications en utilisant différentes concentrations d'ARN du même échantillon. Cela permet d'éliminer certaines différences qui seraient dues à une différence d'abondance de matériel initial ou à une dégradation partielle de

l'ARN. Ces techniques permettent généralement la production d'une quarantaine de différences lors de la résolution sur gel.

Afin de comparer les lignées cellulaires établies au chapitre 3, nous avons modifié la technique de RAP-PCR pour tirer profit de l'utilisation d'un séquenceur automatique. L'utilisation d'un oligonucléotide marqué d'un fluorochrome permet la détection des produits d'amplification par l'appareil. Ceci permet donc une détection plus fine et nous permet de prolonger les périodes de migration si bien que nous détectons en moyenne 120 produits par migration. Les résultats obtenus sont généralement reproductibles si l'on tient compte des variations introduites par la migration (étirement et compression des pics).

L'utilisation de la technique de RAP-PCR en fluorescence nous a permis d'analyser rapidement les effets de l'acide rétinoïque et des différents récepteurs au niveau transcriptionnel dans les cellules Calu-1. En utilisant 10 combinaisons d'oligonucléotides, nous avons pu analyser environ 1200 pics pour chaque ensemble de transfectants. Nous avons ainsi comparé Calu-1 avec les transfectants RAR β 1, RAR β 2 et RAR α 1 que nous avons généré au chapitre 3, traités ou non avec de l'acide rétinoïque.

Nous avons d'abord comparé chaque lignée avec et sans traitement à l'acide rétinoïque puis chacun des transfectants par rapport à Calu-1. Les variations observées ont été regroupées en 4 classes. Le premier groupe consiste en ces différences qui sont spécifiques à la présence du transgène, on compare Calu-1 \pm RA avec les transfectants \pm RA. Le second groupe consiste en des différences qui sont spécifiques aux transgènes mais nécessitent l'addition d'acide rétinoïque. La troisième catégorie représente les différences dues à l'addition d'acide rétinoïque,

i.e. que certains pics observés dans Calu-1 et les transfectants sont comparables en absence ou en présence d'acide rétinoïque. Le dernier groupe est constitué de différences clonales donc de variations qui apparaissent dans une lignée mais ne sont pas reproductibles dans les autres lignées exprimant le même transgène. Les différences observées lorsque les deux concentrations d'ARN d'un même échantillon différaient n'ont pas été comptabilisées car elles représentent des variations aléatoires dues au matériel initial ou à la méthodologie employée.

Les niveaux de variations sont relativement faibles pour les trois premières catégories (de 0.21% à 0.88%) alors que les variations clonales représentent de 2.5 à 4.3% du nombre de pics observés. Tel qu'attendu, les variations clonales représentent la majorité des différences peu importe le transgène présent. Les niveaux de variations présents dans les clones RAR β 1 pourraient être le reflet de son activité. Cet isoforme est surtout exprimé dans les tissus fœtaux, il est alors plausible que son expression dans une lignée dérivée d'un tissu adulte tel la lignée Calu-1 puisse amener l'expression de gènes qui ne sont pas normalement exprimés dans ces cellules ce que représenteraient la majorité des variations observées. Les plus faibles taux de variations ont été observés pour les pics spécifiques à RAR β 2 (0.07% d'augmentation et 0.14% de diminution), ce qui suggère qu'un faible nombre de gènes est spécifiquement contrôlé par RAR β 2. Cette proportion représente probablement le fait, comme nous l'avons expliqué, qu'un gène peu exprimé sera faiblement représenté dans le produit de PCR mais nous croyons que les faibles taux de variations d'expression induits par RAR β 2 sont suffisants pour causer l'effet suppresseur de l'acide rétinoïque.

L'altération légère des niveaux de transcription de quelques gènes qui coopèrent dans une voie métabolique peut produire un effet cumulatif marqué selon un

processus additif et d'autant plus si ce processus est synergique. Les niveaux d'altérations dus à RAR β 2 sont faibles mais nous croyons que l'altération de quelques gènes importants sera suffisante pour causer les effets suppresseurs. Les résultats obtenus ici montrent que la surexpression de RAR α 1 ou l'expression de RAR β 1 dans les cellules Calu-1 ont des effets marqués sur la transcription des gènes mais les expériences de croissance montrent que ces variations ont peu d'effets sur la croissance des cellules. Les récepteurs RAR α 1 et RAR β 1 pourraient donc être impliqués dans le contrôle d'autres processus cellulaires.

5.2.2.2 Isolement de gènes différentiellement exprimés

L'utilisation de la technique d'hybridation différentielle de l'Atlas human cDNA Array I nous a permis d'identifier plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la suppression tumorale par RAR β 2. Les membranes contiennent 588 ADNc connus dont le rôle est assez bien défini dans différents processus cellulaires. A ces 588 gènes s'ajoutent les ADNc de 9 contrôles exprimés de façon quasi ubiquitaire.

L'utilisation de cette technique nous a permis la comparaison des lignées déficientes en RAR β 2 (Calu-1 et C30) et celles transfectées avec ce même gène (C24 et C64). Afin de discriminer parmi les gènes induits par l'acide rétinoïque de façon générale et ceux spécifiquement contrôlés par RAR β 2, nous avons traité les transfectants C30 (RAR β -), C24 et C64 avec 100 nM d'acide rétinoïque et les avons comparés entre eux et avec la lignée Calu-1. Les résultats présentés au chapitre 4 montrent que 51 gènes voient leur expression varier en fonction de RAR β 2 ce qui représente 11,9% des 428 gènes de l'Array exprimés dans les cellules Calu-1. Cette variation est très forte comparativement aux 0.21% observés lors des expériences de RAP-PCR et reflète probablement la sélection des ADNc qui a été faite au moment de la conception des membranes.

Les gènes présents sur les membranes sont regroupés en catégories fonctionnelles: oncogènes, gènes suppresseurs, régulateurs du cycle cellulaire, gènes impliqués dans l'apoptose, facteurs transcriptionnels, etc. Tel que nous nous y attendions, aucune de ces catégories ne subit de variation globale, quelques gènes seulement à l'intérieur d'une catégorie varient en fonction de l'expression RAR β 2. De même, tous les gènes d'une même catégorie ne sont pas exprimés dans les cellules Calu-1; lorsqu'il y a expression les niveaux d'expression varient de très faibles à très forts.

Certains gènes présents sont des candidats particulièrement intéressants du fait de leurs fonctions. Par exemple, les gènes faisant partie de la famille des "Inhibitors of DNA-binding" (ID-1, ID-2, ID-3) sont tous les trois exprimés dans les cellules Calu-1 et régulés de façon positive par RAR β 2. Ces protéines font partie de la famille des protéines HLH. Ces protéines sont des facteurs de transcription capables de dimériser avec les protéines ID mais il faut noter que les ID n'ont pas de domaine de liaison à l'ADN. Leur dimérisation avec un autre facteur HLH empêchera la liaison de ce dernier à l'ADN et inhibera ses fonctions régulatrices de la transcription (Deed et al., 1994; Deed et al., 1996). Des gènes codant pour des facteurs transcriptionnels de la famille HLH tel MYC ont été caractérisés comme conférant un avantage prolifératif aux cellules lorsqu'ils sont surexprimés (Bergh, 1990; Little et al., 1983; Nau et al., 1985; Richardson et Johnson, 1993). Ainsi, les protéines ID pourraient contrebalancer le rôle des protéines HLH dans la prolifération cellulaire en inhibant leur liaison à l'ADN.

Dans le même ordre d'idée, l'expression du gène IRF-1 (interferon regulatory factor-1) est stimulée dans les cellules transfectées par RAR β 2. Cette protéine lie les régions régulatrices de certains gènes pour en contrôler les niveaux d'expression

(Miyamoto et al., 1988). Tout comme les protéines ID-1, ID-2 et ID-3, IRF-1 pourrait donc réguler le comportement cellulaire en modulant l'expression de gènes qui possèdent un élément de liaison de ce facteur. Bien entendu, l'expression différentielle de ces gènes doit être confirmée mais leur fonction en fait des candidats intéressants pour le contrôle de la croissance cellulaire et de la tumorigénèse.

D'autres gènes dont l'expression est modulée par RAR β 2 pourraient être impliqués dans le contrôle de la croissance, par exemple, certaines cyclines, des inhibiteurs de cyclines, des protéines impliquées dans l'apoptose ou dans l'arrêt de croissance sont exprimées différemment lorsque l'on compare les cellules RAR β 2- et les cellules RAR β 2+.

Nous avons déjà discuté au chapitre 4, de l'implication potentielle de protéines du système immunitaire dans le contrôle de la tumorigénèse. Nous avons montré que les ARNm ICAM-1, MHC classe I et IL-1 β sont surexprimés dans les cellules transfectées par RAR β 2. Nos expériences de cytométrie de flux ont par la suite confirmé que les protéines ICAM-1 et MHC classe I sont effectivement exprimées plus fortement à la surface des cellules C64 traitées avec 100 nM d'acide rétinoïque qu'à la surface des cellules C30 traitées de la même façon. En plus de ces molécules, les résultats obtenus de l'hybridation de l'Atlas human cDNA array I montrent que d'autres molécules impliquées dans le contrôle du système immunitaire et dans les interactions intercellulaires sont régulées par RAR β 2 (voir ci-dessous).

Les molécules MHC classe I sont nécessaires à la présentation des antigènes à la surface des cellules. Ces antigènes sont par la suite reconnus par les cellules cytotoxiques qui pourront réagir contre la cellule présentatrice si l'antigène est

étranger à l'organisme (Benjamini et Leskowitz, 1991). Dans ce processus, ICAM-1 est nécessaire à l'interaction des cellules cytotoxiques avec la cellule présentatrice d'antigène. Si la molécule MHC classe I n'est pas exprimée à la surface d'une cellule, en présence d'ICAM-1 à cette surface les cellules NK vont réagir contre la cellule et la tuer. Par contre, si la cellule cible n'a ni ICAM-1 ni MHC classe I, elle augmente ses chances d'échapper aux cellules cytotoxiques (Benjamini et Leskowitz, 1991). Les cellules tumorales ont subi des mutations dans de nombreux gènes et expriment donc plusieurs protéines anormales, une cellule tumorale exprimant ces deux molécules à sa surface présentera donc des signaux de reconnaissance pour l'activité cytotoxique. Les cellules tumorales se verront donc conférer un avantage sélectif si elles parviennent à échapper aux cellules cytotoxiques.

Nos résultats suggèrent que la diminution de l'expression des molécules MHC classe I et ICAM-1 est une des voies d'échappement qui ont été développées dans les cellules Calu-1. Nos études montrent que les cellules RAR β - expriment peu de ICAM-1 et de MHC classe I et que la transfection de RAR β 2 permet l'expression de ces deux protéines à des niveaux plus élevés. Ces résultats combinés avec les expériences précédentes de Houle et al. où des souris nues injectées avec des cellules Calu-1 RAR β 2+ ne développaient pas de tumeurs (Houle et al., 1993), suggèrent que la présence des molécules MHC classe I et ICAM-1 à la surface des cellules est effectivement impliquée dans la suppression du développement tumoral. Les souris nues utilisées sont athymiques et ne possèdent donc pas de lymphocytes T par contre il a été démontré que leurs niveaux de cellules NK et de macrophages sont supérieurs à ceux d'une souris de type sauvage de la même souche (Budzynski et Radzikowski, 1994). Ces niveaux élevés de cellules NK combinés avec la forte

expression des deux molécules reconnues par celles-ci à la surface des cellules tumorales pourrait expliquer la suppression observée.

Il a été précédemment démontré que les gènes MHC I et ICAM-1 répondent à l'acide rétinoïque en augmentant leur transcription et que cette augmentation est contrôlée par RAR β 2 dans deux systèmes spécifiques, soient les cellules NTera/2 (MHC classe I) et Cos-1 (ICAM-1) (Aoudjit et al., 1995; Segars et al., 1993). La perte d'expression de RAR β 2 dans les cellules épidermoïdes entraînerait donc une diminution des niveaux d'expression des molécules reconnues par les cellules cytotoxiques et permettrait ainsi aux cellules tumorales d'échapper à la surveillance du système immunitaire

D'autres molécules impliquées dans le contrôle du système immunitaire sont aussi régulées de façon positive dans les cellules transfectées par RAR β 2. On retrouve ainsi le Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF), Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2) et l'interleukine-8 (IL-8) qui sont des molécules impliquées dans la différenciation et la chimio-attraction des macrophages. La surexpression de ces molécules dans des cellules RAR β 2+ pourrait, tout comme pour ICAM-1 et MHC classe I, stimuler une réponse immunitaire contre les cellules les exprimant.

Finalement, nous avons montré que l'expression de l'interleukine-1 β (IL-1 β) est stimulée par RAR β 2. Cette interleukine est un promoteur de la prolifération des lymphocytes T et stimule la production de protéines de phase aigüe (dont ICAM-1 et MHC classe I) (Benjamini et Leskowitz, 1991). L'IL-1 β est produite sous forme d'un précurseur inactif qui doit être clivé pour générer la forme active qui sera sécrétée hors de la cellule. Ce clivage est produit par des enzymes faisant partie de

la famille ICE (Interleukin Converting Enzyme) de cystéine protéases. Sur les membranes hybridées plusieurs membres de cette famille sont exprimés. L'augmentation des niveaux de pro-IL-1 β pourrait donc s'accompagner d'une conversion efficace en IL-1 β active par ces protéines. Il a été démontré par Ross que l'IL-1 β est un médiateur des effets de l'acide rétinoïque sur la croissance des cellules Lu-CSF (Ross, 1996). Il a montré que suite au traitement de ces cellules avec de l'acide rétinoïque, il y avait induction de la transcription de l'IL-1 β et que cette augmentation du messenger est reflétée au niveau protéique (Ross, 1996). Il a aussi démontré que le traitement des cellules avec l'IL-1 β seulement pouvait reproduire les effets d'inhibition de croissance observés avec l'acide rétinoïque (Ross, 1996). Nos résultats montrent que l'expression de l'IL-1 β est modulée par RAR β 2. Les résultats de Ross combinés aux nôtres suggèrent donc que certains gènes modulés par l'IL-1 β pourraient être impliqués dans la suppression de la croissance des cellules pulmonaires. Nous serions donc en présence des premières étapes d'une cascade de contrôle où RAR β 2 activerait l'IL-1 β qui à son tour pourrait stimuler l'expression d'autres gènes par divers mécanismes.

Pour parvenir à une implication ferme de toutes ces molécules dans la suppression, nous devons démontrer qu'elles sont spécifiquement régulées par RAR β et devons pousser plus à fond l'étude de leur rôle potentiel dans les divers mécanismes de suppression tumorale par exemple en transfectant les cellules tumorales avec certains des messagers et observer s'il y a des effets de suppression tumorale.

5.3 Conclusion

Le développement de tumeurs cancéreuses est le résultat d'un processus mutationnel complexe qui s'étend sur une période prolongée. Dans les tumeurs pulmonaires, plusieurs auteurs ont décrit l'altération du bras court du chromosome 3 comme étant une des étapes les plus précoces du processus de cancérisation. Les diverses études de perte d'hétérozygotie suggèrent la présence de plusieurs gènes suppresseurs dans cette région chromosomique. Comme nous l'avons mentionné, RAR β est un gène particulièrement intéressant dans les tumeurs épidermoïdes puisqu'il est situé en 3p24, région fréquemment altérée dans les tumeurs de ce type histologique. De plus, la majorité des lignées cellulaires dérivées de ces tumeurs montrent une perte d'expression de RAR β 2 en comparaison du poumon normal.

Des études antérieures avaient montré que RAR β 2 est capable de supprimer la croissance cellulaire *in vitro* et la formation de tumeurs *in vivo* lorsqu'il est introduit dans une lignée épidermoïde. Il semble toutefois que ce gène échappe à la définition classique de gène suppresseur de tumeurs puisqu'aucune étude n'a pu démontrer la présence de mutations ou de délétions dans les séquences codantes et promotrices comme c'est souvent le cas pour d'autres gènes suppresseurs. La possibilité demeure cependant que d'autres mécanismes d'inactivation puissent jouer tels la méthylation ou la répression du promoteur. De tels mécanismes expliqueraient la perte d'inductibilité du RARE observée dans les cellules des cancers épithéliaux.

La protéine RAR β 2 possède des fonctions uniques vis-à-vis des autres RARs. Elle est la seule capable de transmettre les effets suppresseurs de l'acide rétinoïque dans les cellules de carcinomes pulmonaires. D'autres études ont montré dans les carcinomes mammaires et du col utérin que RAR α pouvait aussi jouer un rôle

suppresseur en stimulant l'expression de RAR β 2. Nous avons montré que ce n'est pas le cas dans le cancer pulmonaire. L'introduction de RAR α 1 ou RAR β 1 ne résulte pas en la stimulation de RAR β 2 mais par contre, le promoteur de RAR α 2 demeure inductible ce qui suggère une différence dans l'inductibilité des promoteurs et renforce l'idée que certains mécanismes transcriptionnels répresseurs ou stimulateurs sont particuliers au promoteur de RAR β 2.

Le contrôle transcriptionnel exercé par RAR β 2 sur d'autres gènes semble aussi être unique, nous avons identifié plusieurs gènes cibles de RAR β 2 qui pourraient être impliqués dans la médiation des effets suppresseurs de celui-ci. Parmi les plus intéressants, nous avons déjà discuté de ceux potentiellement impliqués dans le contrôle de la surveillance immunitaire par les cellules cytotoxiques et les macrophages. Il est à noter que la perte de l'expression de RAR β 2 serait alors un mécanisme développé par les cellules tumorales pour échapper à cette surveillance. Cette perte d'expression conférerait alors un avantage sélectif aux cellules tumorales qui pourraient échapper au système immunitaire.

Plusieurs études restent cependant à effectuer pour déterminer les mécanismes exacts de la suppression tumorale. Suite à nos travaux, nous possédons aujourd'hui une meilleure idée des mécanismes potentiellement impliqués dans la suppression de la tumorigénèse pulmonaire. Ces travaux pourraient avoir un impact important du point de vue clinique, si nous pouvons envisager des moyens de stimuler la surveillance immunitaire contre les cellules tumorales.

Bibliographie

Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkannen, L., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., Hamilton, S.R., Petersen, G.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and de la Chapelle, A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, *260*: 812-816, 1993.

Adachi, J.I., Shisheki, M., Okazaki, T., Ishimuru, G., Noguchi, M., Hirohashi, S. and Yokata, Y. Microsatellite instability in primary and metastatic lung carcinomas. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *14*: 301-306, 1995.

Ahn, M.-J., Langenfeld, J., Moasser, M.M., Rusch, V. and Dmitrovsky, E. Growth suppression of transformed human bronchial epithelial cells by *all-trans*-retinoic acid occurs through specific retinoid receptors. *Oncogene*, *11*: 2357-2364, 1995.

Albanes, D., Heinonen, O.P., Taylor, P.R., Virtamo, J., Edwards, B.K., Rautalahti, M., Hartman, A.M., Palmgren, J., Freedman, L.S., Haapakoski, J., Barrett, M.J., Pietinen, P., Malila, N., Tala, E., Liippo, K., Salomaa, E.R., Tangrea, J.A., Teppo, L., Askin, F.B., Taskinen, E., Erozan, Y., Greenwald, P. and Huttunen, J.K. Alpha-tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the ATBC cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *J. Natl. Cancer Inst.*, *88*: 1560-1570, 1996.

Allegretto, E.A., McClurg, M.R., Lazarchik, S.B., Clemm, D.L., Kerner, S.A., Elgort, M.G., Boehm, M.F., White, S.K., Pike, J.W. and Heyman, R.A. Transactivation properties of retinoic acid and retinoid x receptors in mammalian cells and yeast. *J. Biol. Chem.*, *268*: 26625-26633, 1993.

Allenby, G., Bocquel, M.-T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J.F., Chambon, P. and Levin, A.A. Retinoic acid receptors and retinoid x receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *90*: 30-34, 1993.

Aoudjit, F., Brochu, N., Morin, N., Poulin, G., Stratowa, C. and Audette, M. Heterodimeric retinoic acid receptor- β and retinoid X receptor- α complexes stimulate expression of the intercellular adhesion molecule-1 gene. *Cell Growth & Differentiation*, *6*: 515-521, 1995.

ATBC Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and β -carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New Engl. J. Med.*, *330*: 1029-1035, 1994.

Avruch, J., Zhang, X.-F. and Kyriakis, J.M. Raf meets Ras: Completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, *19*: 279-283, 1994.

Ayer, D.E., Kretzner, L. and Eisenman, R.N. MAD: a heterodimeric partner for MAX that antagonizes MYC transcriptional activity. *Cell*, *72*: 211-222, 1993.

Bansal, A., Ramirez, R.D. and Minna, J.D. Mutation analysis of the coding sequences of MEK-1 and MEK-2 genes in human lung cancer cell lines. *Oncogene*, *14*: 1231-1234, 1997.

Benahmou, S. and Bonaïti-Pellié, C. Cytochrome P450 polymorphisms: Risk factors for lung cancer? *In: Clinical and Biological Basis of Lung Cancer Prevention*, Martinet, Y., Hirsch, F.R., Martinet, N., Vignaud, J.-M. and Mulshine, J.L. eds. Birkhäuser-Verlag, Basel. 1998.

Benedict, W.F., Murphree, A.L., Banerjee, A., Spina, C.A., Sparkes, M.C. and Sparkes, R.S. Patient with chromosome 13 deletion: evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene. *Science*, *219*: 973-975, 1983.

Benjamini, E. and Leskowitz, S. *Immunology: A short course*. 2nd ed. Wiley-Liss, New-York. 1991.

Bérard, J., Gaboury, L., Landers, M., De Repentigny, Y., Houle, B., Kothary, R. and Bradley, W.E.C. Hyperplasia and tumours in lung, breast and other tissues in mice carrying a RAR β 4-like transgene. *EMBO J.*, *13*: 5570-5580, 1994.

Bérard, J., Laboune, F., Mukuna, M., Massé, S., Kothary, R. and Bradley, W.E.C. Lung tumors in mice expressing an antisense RAR β 2 transgene. *FASEB J.*, *10*: 1091-1097, 1996.

Bergh, J.C.S. Gene Amplification in Human Lung Cancer. *Am. Rev. Resp. Dis.*, *142*: S20-S26, 1990.

Bishop, J.M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, *64*: 235-248, 1991.

Blasco, M.A., Lee, H.-W., Handa, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A. and Greider, C.W. Telomere shortening and tumor formation by mouse lacking telomerase RNA. *Cell*, 91: 25-34, 1997.

Bos, J.L. RAS oncogene in human cancer: A review. *Cancer Res.*, 49: 4682-4689, 1989.

Brambilla, E. Early lung cancer detection. *In: Clinical and Biological Basis of Lung Cancer Prevention*, Martinet, Y., Hirsch, F.R., Martinet, N., Vignaud, J.-M. and Mulshine, J.L. eds. Birkhäuser-Verlag, Basel. 1998.

Brand, N., Petkovich, M., Krust, A., Chambon, P., de Thé, H., Marchio, A., Thiollais, P. and Dejean, A. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature*, 332: 850-853, 1988.

Brown, D., Kogan, S., Lagasse, E., Weissman, I., Alcalay, M., Pelicci, P.G., Atwater, S. and Bishop, J.M. A PML-RAR α transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 2551-2556, 1997.

Buchkovich, K., Duffy, L.A. and Harlow, E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*, 58: 1097-1105, 1989.

Budzynski, W. and Radzikowski, C. Cytotoxic cells in immunodeficient athymic mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 16: 319-346, 1994.

Caporaso, N.E., Tucker, M.A., Hoover, R.N., Hayes, R.B., Pickle, L.W., Issaq, H.J., Muschik, G.M., Green-Gallo, L., Buivys, D., Aisner, S., Resau, J.H., Trump, B.F., Tollerud, D., Weston, A. and Harris, C.C. Lung cancer and the debrisoquinone metabolic phenotype. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 1264-1272, 1990.

Carney, D.N., Gazdar, A.F., Bepler, G., Guccion, J.G., Marangos, P.J., Moody, T.W., Zweig, M.H. and Minna, J.D. Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res.*, 45: 2913-2923, 1985.

Carney, D.N. and De Leij, L. Lung cancer biology. *Seminars in Oncology*, 15: 199-214, 1988.

Carney, D.N. and Sikora, K. Introduction. *In: Genes and Cancer*, Carney, D. and Sikora, K. eds. Wiley and sons, Chichester. 1990.

Carney, D.N. Lung cancer biology. *Eur. J. Cancer*, 27: 366-369, 1991.

Cavaillès, V., Dauvois, S., L'Horsset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P.J. and Parker, M.C. Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.*, 14: 3741-3751, 1995.

Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Murphree, A.L., Strong, L.C. and White, R.L. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, 305: 779-784, 1983.

Center, R., Lukeis, R., Dietzsch, E., Gillespie, M. and Garson, O.M. Molecular deletion of 9p sequences in non-small cell lung cancer and malignant mesothelioma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 7: 47-53, 1993.

Cerny, T., Barnes, D.M., Hasleton, P., Barber, P.V., Healy, K., Gullick, W. and Thatcher, N. Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human lung tumours. *Br. J. Cancer*, 54: 265-269, 1986.

Chambon, P. The retinoid signaling pathway:molecular and genetic analyses. *Seminars in Cell Biology*, 5: 115-125, 1994.

Chambon, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10: 940-954, 1996.

Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M. and Nevins, J.R. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, 65: 1053-1061, 1991.

Chen, J.D. and Evans, R.M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 377: 454-457, 1995.

Chiba, I., Takahashi, T., Nau, M.M., d'Amico, D., Curiel, D.T., Mitsudomi, T., Buchhagen, D.L., Carbone, D., Piantadosi, S., Koga, H., Reissman, P.T., Slamon, D.J., Holmes, E.C. and Minna, J.D. Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 5: 1603-1610, 1990.

Chung, G.T.Y., Sundaresan, V., Hasleton, P., Rudd, R., Taylor, R. and Rabbits, P.H. Sequential molecular genetic changes in lung cancer development. *Oncogene*, 11: 2591-2598, 1995.

Cohen, B. Hypothesis: Is pulmonary dysfunction the common denominator for the multiple effects of cigarette smoking? *Lancet*, 2: 1024-1028, 1978.

Coleman, M.P., Estève, J., Damiecki, P., Arslan, A. and Renard, H. Trends in cancer incidence and mortality. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 1993.

Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W. and Harley, C.B. Telomere shortening associated with chromosome instability is associated in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.*, 11: 1921-1929, 1992.

Counts, J.L. and Goodman, J.I. Alterations in dna methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell*, 83: 13-15, 1995.

Davila, D.G. and Williams, D.E. The etiology of lung cancer. *Mayo Clinic Proc.*, 68: 170-182, 1993.

de Thé, H., Marchio, A., Thiollais, P. and Dejean, A. Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor α and β genes. *EMBO J.*, 8: 429-433, 1989.

de Thé, H., Chomienne, C., Lanotte, M., Degos, L. and Dejean, A. The t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. *Nature*, 347: 558-561, 1990a.

de Thé, H., del Mar Vivanco-Ruiz, M., Tiollais, P., Stunnenberg, H. and Dejean, A. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor β gene. *Nature*, 343: 177-180, 1990b.

Deed, R.W., Jasiok, M. and Norton, J.D. Nucleotide sequence of the cDNA encoding human helix-loop-helix Id-1 protein: identification of functionally conserved residues common to Id proteins. *Biochim.Biophys. Acta*, 1219: 160-2, 1994.

Deed, R.W., Jasiok, M. and Norton, J.D. Attenuated function of a variant form of the helix-loop-helix protein, Id-3, generated by an alternative splicing mechanism. *FEBS Letters*, 393: 113-6, 1996.

Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M. and Pfeifer, G.P. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53. *Science*, 274: 430-432, 1996.

Doll, R. and Peto, R. Cigarette smoking and bronchial carcinoma: dose and time relationship among regular smokers and lifelong non-smokers. *J. Epidemiol. Community Health*, 32: 303-313, 1978.

Doll, R. and Peto, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, *66*: 1192-1308, 1981.

Dollé, P., Ruberte, E., Leroy, P., Morris-Kay, G. and Chambon, P. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systemic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development*, *110*: 1133-1151, 1990.

Duester, G., Shean, M.L., McBride, M.S. and Stewart, M.J. Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: implication for regulation of retinoic acid synthesis. *Mol. Cell. Biol.*, *11*: 1638-1646, 1991.

Evans, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, *240*: 889-895, 1988.

Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M. and Kolodner, R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, *75*: 1027-1038, 1993.

Fishel, R. Genomic instability, mutators and the development of cancer: is there a role for p53? *J. Natl. Cancer Inst.*, *88*: 1608-1609, 1996.

Folkers, G.E., van der Leede, B.M. and van der Saag, P.T. The retinoic acid receptor- β 2 contains two separate cell-specific transactivation domains, at the n-terminus and in the ligand-binding domain. *Mol. Endo.*, *7*: 616-627, 1993.

Fong, K.M., Zimmerman, P.V. and Smith, P.J. Microsatellite instability and other molecular abnormalities in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 55: 28-30, 1995.

Frank, A.L. Epidemiology of lung cancer. *In: Thoracic Oncology*, Roth, J.A., Ruckdeschel, J.C. and Weisenburger, T.H. eds. W. B. Saunders Co., Philadelphia. 1989.

Gazdar, A.F., Carney, D.N., Nau, M.M. and Minna, J.D. Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res.*, 45: 2924-2930, 1985.

Gazdar, A.F., Helman, L.J., Israel, M.A., Russel, E.K., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., Schuller, H.M. and Park, J.-G. Expression of neuroendocrine cell markers L-Dopa Decarboxylase, Chromogranin A and dense core granules in human tumors of endocrine and nonendocrine origin. *Cancer Res.*, 48: 4078-4082, 1988.

Gazdar, A.F. Molecular changes preceding the onset of invasive lung cancers. *Lung Cancer*, 11: 16-17, 1994.

Gebert, J.F., Moghal, N., Frangioni, J.V., Sugarbaker, D.J. and Neel, B.G. High frequency of retinoic acid receptor β abnormalities in human lung cancer. *Oncogene*, 6: 1859-1868, 1991.

Geisen, C., Denk, C., Gremm, B., Baust, C., Karger, C., Bollag, W. and Schwarz, E. High-level expression of retinoic acid receptor β gene in normal cell of the uterine cervix is regulated by the retinoic acid receptor α and is abnormally down regulated in cervical carcinoma cells. *Cancer Res.*, 57: 1460-1467, 1997.

Geradts, J., Chen, J.-Y., Russell, E.K., Yankaskas, J.R., Nieves, L. and Minna, J.D. Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. *Cell Growth & Differentiation*, 4: 799-809, 1993.

Ghyselink, N.B., Dupe, V., Dierich, A., Messadeq, N., Garnier, J.M., Rochette-Egly, C., Chambon, P. and Mark, M. Role of the retinoic acid receptor β during mouse development. *Intl. J. Dev. Biol.*, 41: 425-447, 1997.

Giguère, V., Ong, E.S., Segui, P. and Evans, R.M. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, 330: 624-629, 1987.

Ginsberg, R.J., Vokes, E.E. and Raben, A. Non-small cell lung cancer. *In: Cancer: principles & practice of oncology*, 5th ed., DeVita, V.T., Hellman, S. and Rosenberg, S.A. eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1997.

Goodman, G.E., Thornquist, M., Kestin, M., Metch, B., Anderson, G. and Omenn, G.S. The association between participant characteristics and serum concentrations of beta-carotene, retinol, retinyl palmitate, and alpha-tocopherol among participants in the Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET) for prevention of lung cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 5: 815-821, 1996.

Gould, V.E. and Warren, W.H. Epithelial neoplasms of the lung. *In: Thoracic Oncology*, Roth, J.A., Ruckdeschel, J.C. and Weisenburger, T.H. eds. W. B. Saunders company, Philadelphia. 1989.

Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M. and Harris, C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 54: 4855-4878, 1994.

Greider, C.W. Telomere length regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, 65: 337-365, 1996.

Grondona, J.M., Kastner, P., Gansmuller, A., Décimo, A., Chambon, P. and Mark, M. Retinal dysplasia and degeneration in RAR β 2/RAR γ 2 compound mutant mice. *Development*, 122: 2173-2188, 1996.

Gudas, L.J. Retinoids, retinoid-responsive genes, cell differentiation, and cancer. *Cell Growth & Differentiation*, 3: 655-662, 1992.

Gudas, L.J. Retinoids and vertebrate development. *J. Biol. Chem.*, 269: 15399-15402, 1994.

Harris, C.C. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J. Natl. Cancer Inst.*, 88: 1442-1455, 1996.

Hayashi, S., Watanabe, J., Nakashi, K. and Kawajiri, K. Genetic linkage of lung cancer-associated Msp I polymorphism with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P4501A1. *J. Biochem.*, *110*: 407-411, 1991.

He, L.Z., Tribioli, C., Rivi, R., Peruzzi, D., Pelicci, P.G., Soares, V., Cattoretti, G. and Pandolfi, P.P. Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RAR α transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *94*: 5302-5307, 1997.

Hennekens, C.H., Burny, J.E., Manson, J.E., Stampfer, M., Rosner, B., Cock, N.R., Bélanger, C., LaMotte, R., Gaziano, J.M., Ridker, P.M., Willett, W. and Peto, R. Lack of effect of long-term supplementation with β -carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular diseases. *New Engl. J. Med.*, *334*: 1145-1149, 1996.

Hibi, K., Takahashi, T., Yamakawa, K., Ueda, R., Sekido, Y., Ariyoshi, Y., Suyama, M., Takagi, H., Nakamura, Y. and Takahashi, T. Three distinct regions involved in 3p deletions in human lung cancer. *Oncogene*, *7*: 445-449, 1992.

Hoffman, A.D., Engelstein, D., Bogenrieder, T., Papandreou, C.N., Steckelman, E., Dave, A., Motzer, R.J., Dmitrovsky, E., Albino, A.P. and Nanus, D.M. Expression of retinoic acid receptor β in human renal cell carcinomas correlates with sensitivity to the antiproliferative effects of *13-cis*-retinoic acid. *Clin. Cancer Res.*, *2*: 1077-1082, 1996.

Hong, W.K., Lippman, S.M., Hittelman, W.N. and Lotan, R. Retinoid chemoprevention of aerodigestive cancer: from basic research to the clinic. *Clin.Cancer Res.*, 1: 677-686, 1995.

Hörlein, A.J., Näär, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Söderström, M., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 377: 397-404, 1995.

Houle, B., Leduc, F. and Bradley, W.E.C. Implication of RAR β in epidermoid (squamous) lung cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 3: 358-366, 1991.

Houle, B., Rochette-Egly, C. and Bradley, W.E.C. Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor β in human epidermoid lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 985-989, 1993.

Houle, B., Pelletier, M., Wu, J., Googyer, C. and Bradley, W.E.C. Fetal isoform of human retinoic acid receptor β expressed in small cell lung cancer lines. *Cancer Res.*, 54: 365-369, 1994.

Hung, J., Kishimoto, Y., Sugio, K., Virmani, A., McIntire, D.D., Minna, J.D. and Gazdar, A.F. Allele specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *JAMA*, 273: 558-563, 1995.

Ihde, D.C., Pass, H.I. and Glatstein, E. Small cell lung cancer. *In: Cancer: principles & practice of oncology*, 5th ed., DeVita, V.T., Hellman, S. and Rosenberg, S.A. eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1997.

I. N. C. du Canada. Statistiques canadiennes sur le cancer. Toronto. 1997.

Jetten, A.M., Nervi, C. and Vollberg, T.M. Control of squamous differentiation in tracheobronchial and epidermal epithelial cells: Role of retinoids. *J. Natl Cancer Inst. Monogr.*, *13*: 93-100, 1992.

Jing, Y., Zhang, J., Bleiweiss, I.J., Waxman, S., Zelent, A. and Mira-Y-Lopez, R. Defective expression of cellular retinol binding protein type I and retinoic acid receptors $\alpha 2$, $\beta 2$ and $\gamma 2$ in human breast cancer cells. *FASEB J.*, *10*: 1064-1070, 1996.

Kabat, G.C. Aspects of the epidemiology of lung cancer in smokers and nonsmokers in the United States. *Lung Cancer*, *15*: 1-20, 1996.

Kakizuka, A., Miller, W.H., Umesono, K., Warrell, R.P., Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E. and Evans, R.M. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR α with a novel putative transcription factor, PML. *Cell*, *66*: 663-674, 1991.

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Craig, R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, *51*: 6304-6311, 1991.

Kastner, P., Krust, A., Mendelsohn, C., Garnier, J.M., Zelent, A., Leroy, P., Staub, A. and Chambon, P. Murine isoforms of retinoic acid receptor γ with

specific patterns of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *87*: 2700-2704, 1990.

Kastner, P., Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupe, V., Grondona, J.M. and Chambon, P. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development*, *124*: 313-326, 1997.

Kawajiri, K., Nakashi, K., Imai, K., Yoshii, A., Shinoda, N. and Watanabe, J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450 1A1 gene. *FEBS Letters*, *263*: 131-133, 1990.

Killary, A.M., Wolf, M.E., Giambernardi, T.A. and Naylor, S.L. Definition of a tumor suppressor locus within human chromosome 3p21-p22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *89*: 10877-10881, 1992.

Kim, N.W., Piatyszeck, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. and Shay, J.W. Specific association of telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, *266*: 2011-2014, 1994.

Kishimoto, Y., Murakami, Y., Shiraishi, M., Hayashi, K. and Sekiya, T. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res.*, *52*: 4799-4804, 1992.

Knudson, A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 68: 820-823, 1971.

Kobayashi, T., Tsuda, H., Noguchi, M., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Goya, T. and Hayata, Y. Association of a point mutations in c-Ki-ras oncogene in lung adenocarcinoma with particular reference to cytologic subtypes. Cancer, 66: 289-294, 1990.

Kok, K., Naylor, S.L. and Buys, C.H.C.M. Deletion of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. Adv. in Cancer Res., 27-92, 1997.

Krust, A., Kastner, P., Petkovitch, M., Zelent, A. and Chambon, P. A third human retinoic acid receptor, hRAR γ . Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86: 5310-5314, 1989.

Kurokawa, R., Yu, V.C., Näär, A., Kyakumoto, S., Han, Z., Silverman, S., Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. Differential orientation of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. Genes Dev., 7: 1423-1435, 1993.

Kurokawa, R., DiRenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., Rosenfeld, M.G., Heyman, R.A. and Glass, C.K. Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. Nature, 371: 528-531, 1994.

Kurokawa, R., Söderström, M., Hörlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature*, 377: 451-454, 1995.

Langston, A.W. and Gudas, L.J. Identification of a retinoic acid responsive enhancer 3' of the murine homeobox gene Hox-1.6. *Mech. Dev.*, 38: 217-228, 1992.

Lanoix, J., Belhumeur, P., Lussier, M., Royal, A., Bravo, R. and Skup, D. Regulated expression of Krox-24 and other serum-responsive genes during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Cell Growth & Differentiation*, 2: 391-399, 1991.

Le Douarin, B., Zechel, C., Garnier, J.M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, B., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P. and Losson, R. TIF1, a potential mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.*, 14: 2020-2033, 1995.

Leach, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomaki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L.A. and Nystrom-Lahti, M. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*, 75: 1215-1225, 1993.

Leblanc, B.P. and Stunnenberg, H.G. *9-cis* retinoic acid signaling: Changing partners causes some excitement. *Genes Dev.*, 9: 1811-1816, 1995.

Lee, J.S., Pathak, S., Hopwood, V., Tomasovic, B., Mullins, J.D., Baker, F.L., Spitzer, G. and Neidhart, J.A. Involvement of chromosome 7 in primary lung cancer and nonmalignant normal lung tissue. *Cancer Res.*, *47*: 6349-6352, 1987.

Lee, J.W., Ryan, F., Swaffield, J.C., Jonhston, S.A. and Moore, D.A. Interaction of thyroid hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature*, *374*: 91-94, 1995.

Leid, M., Kastner, P. and Chambon, P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends in Biological Sciences*, *17*: 427-433, 1992a.

Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, M., Chen, J.Y., Staub, A., Garnier, J.M., Mader, S. and Chambon, P. Purification, cloning and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR and TR heterodimers to bind target sequences. *Cell*, *68*: 377-395, 1992b.

Leroy, P., Krust, A., Zelent, A., Mendelsohn, C., Garnier, J.-M., Kastner, P., Dierich, A. and Chambon, P. Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor α are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. *EMBO J.*, *10*: 59-69, 1991a.

Leroy, P., Nakshatri, H. and Chambon, P. Mouse retinoic acid receptor $\alpha 2$ isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Biochemistry*, *88*: 10138-10142, 1991b.

Lewin, B. *Genes V*. Oxford University Press, Oxford. 1994.

Li, E., Sucov, H.M., Lee, K.-F., Evans, R.M. and Jaenisch, R. Normal development and growth of mice carrying a targeted disruption of the $\alpha 1$ retinoic acid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *90*: 1590-1594, 1993.

Li, X.-S., Shao, Z.-M., Sheikh, M.S., Eiseman, J.L., Sentz, D., Jetten, A.M., Chen, J.-C., Dawson, M.I., Aisner, S., Rishi, A.K., Gutierrez, P., Schnappel, L. and Fontana, J.A. Retinoic acid nuclear receptor β inhibits breast carcinoma anchorage independent growth. *J. Cell. Physiol.*, *165*: 449-458, 1995.

Liang, P. and Pardee, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, *257*: 967-971, 1992.

Little, C.D., Nau, M.M., Carney, D.N., Gazdar, A.F. and Minna, J.D. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature*, *306*: 194-, 1983.

Liu, Y., Lee, M.-O., Wang, H.-G., Li, Y., Hashimoto, Y., Klaus, M., Reed, J.C. and Zhang, X.K. Retinoic acid receptor β mediates the growth inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, *16*: 1138-1149, 1996.

Loeb, L.A. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.*, *51*: 3075-3079, 1991.

Loeb, L.A. Microsatellite instability: Marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.*, *54*: 5059-5063, 1994.

Lohnes, D., Kastner, P., Dierich, A., Mark, M., LeMeur, M. and Chambon, P. Function of RAR γ in the mouse. *Cell*, *73*: 643-658, 1993.

Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dollé, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A. and Chambon, P. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. *Development*, *120*: 2723-2748, 1994.

Lotan, R. Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, *605*: 33-91, 1980.

Lotan, R. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.*, *10*: 1031-1039, 1996.

Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T. and Housman, D.E. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, *74*: 957-967, 1993.

Lufkin, T., Lohnes, D., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P., Gaub, M.-P., LeMeur, M. and Chambon, P. High post-natal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor α mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *90*: 7225-7229, 1993.

Luo, J., Pasceri, P., Conlon, R.A., Rossant, J. and Giguere, V. Mice lacking all isoforms of retinoic acid receptor β develop normally and are susceptible to the teratogenic effects of retinoic acid. *Mech. Dev.*, *52*: 1-11, 1995.

Lynch, H.T., Fusaro, R.M., Pester, J., Oosterhuis, J.A., Went, L.N., Rumke, P., Neering, H. and Lynch, J.F. Tumour spectrum in the FAMMM syndrome. *Br. J. Cancer*, 44: 553-560, 1981.

Lynch, H.T., Kimberling, W.J., Markvicka, S.E., Biscione, K.A., Lynch, J.F., Whorton, E. and Maillard, J. Genetics and smoking-associated cancers. A study of 485 families. *Cancer*, 57: 1640-1646, 1986.

Mabry, M., Nelkin, B.D., Falco, J.P., Barr, L.F. and Baylin, S.B. Transitions between lung cancer phenotypes-Implications for tumor progression. *Cancer Cells*, 3: 53-58, 1991.

Mader, S., Leroy, P., Chen, J.Y. and Chambon, P. Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements: selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J. Biol. Chem.*, 268: 591-600, 1993.

Mangelsdorf, D.J., Ong, E.S., Dyck, J.A. and Evans, R.M. A nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*, 345: 224-229, 1990.

Mangelsdorf, D.J., Borgmeyer, U., Heyman, R., Zhou, J.Y., Ong, E.S., Oro, A.E., Kakizuka, A. and Evans, R.M. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-*cis* retinoic acid. *Genes Dev.*, 6: 329-344, 1992.

Mangelsdorf, D.J., Umesono, K. and Evans, R.M. The retinoids receptors. *In: The Retinoids-Biology, Chemistry and Medicine*, 2nd ed., Sporn, M.B., Roberts, A.B. and Goodman, D.S. eds. Raven Press, New York. 1994.

Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83: 841-850, 1995.

Mao, L., Lee, D.J., Tockman, M.S., Erozan, Y.S., Askin, F. and Sidransky, D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 91: 9871-9875, 1994.

Marshall, H., Morrison, A., Studer, M., Pöpperl, H. and Krumlauf, R. Retinoids and Hox genes. *FASEB J.*, 10: 969-978, 1996.

Marshall, H., Studer, M., Popperl, H., Aparicio, S., Kuroiawa, A., Brenner, S. and Krumlauf, R. A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1. *Nature*, 370: 567-571, 1994.

Martin, B., Renkawitz, R. and Muller, M. Two silencing sub-domains of v-erbA synergize with each other, but not with RXR. *Nucleic Acids Research*, 22: 4899-4905, 1994.

Mattei, M.-G., Rivière, M., Krust, A., Ingvarsson, S., Vennström, B., Quamrul Islam, M., Levan, G., Kastner, P., Zelent, A., Chambon, P., Szpirer, J. and Szpirer, C. Chromosomal assignment of retinoic acid receptor (RAR) genes in the human, mouse and rat genomes. *Genomics*, 10: 1061-1069, 1991.

McLelland, M., Mathieu-Daude, F. and Welsh, J. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends in Genetics*, *11*: 242-246, 1995.

Mendelsohn, C., Ruberte, E., LeMeur, M., Morris-Kay, G. and Chambon, P. Developmental analysis of the retinoic acid-inducible RAR- β 2 promoter in transgenic animals. *Development*, *113*: 723-734, 1991.

Mendelsohn, C., Larkin, S., Mark, M., Lemeur, M., Clifford, J., Zelent, A. and Chambon, P. RAR β isoforms: Distinct transcriptional control by retinoic acid and specific spatial patterns of promoter activity during mouse embryonic development. *Mechanisms of Development*, *45*: 227-241, 1994a.

Mendelsohn, C., Lohnes, D., Décimo, D., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P. and Mark, M. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. *Development*, *120*: 2749-2771, 1994b.

Mendelsohn, C., Mark, M., Dollé, P., Dierich, A., Gaub, M.P., Krust, A., Lampron, C. and Chambon, P. Retinoic acid receptor β 2 (RAR β 2) null mice appear normal. *Dev. Biol.*, *166*: 246-258, 1994c.

Merlo, A., Gabrielson, E., Askin, F. and Sidransky, D. Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, *54*: 640-642, 1994.

Merlo, A., Mabry, M., Gabrielson, E., Vollmer, R., Baylin, S.B. and Sidransky, D. Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 54: 2098-2101, 1994.

Merlo, A., Herman, J.G., Mao, L., Lee, D.J., Gabrielson, E., Burger, P.C., Baylin, S.B. and Sidransky, D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Medicine*, 1: 686-692, 1995.

Merriman, R.L. and Bertram, J.S. Reversible inhibition by retinoids of 3-methylcholanthrene-induced neoplastic transformation in C3H/10T1/2 clone 8 cells. *Cancer Res.*, 39: 1661-1666, 1979.

Meyer, M.E., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Bocquel, M.T., Tasset, D. and Chambon, P. Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell*, 57: 433-442, 1989.

Miller, A.B. and Risch, H.A. Diet and lung cancer. *Chest*, 96: 8S-9S, 1989.

Minna, J.D. Genetic events in the pathogenesis of lung cancer. *Chest*, 96: 17S-23S, 1989.

Minna, J.D. The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *Chest*, 103: 449S-456S, 1993.

Minna, J.D., Sekido, Y., Fong, K.M. and Gazdar, A.F. Cancer of the lung. *In: Cancer: principles & practice of oncology*, 5th ed., DeVita, V.T., Hellman, S. and Rosenberg, S.A. eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 1997.

Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T. and Taniguchi, T. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN- β gene regulatory elements. *Cell*, *54*: 903-913, 1988.

Moghal, N. and Neel, B.G. Evidence for impaired retinoic acid receptor-thyroid hormone receptor AF-2 cofactor activity in human lung cancer. *Mol. Cell. Biol.*, *15*: 3945-3959, 1995.

Mooi, W.J. Common lung cancers. *In: Spencer's pathology of the lung*, 5th ed., Hasleton, P.S. eds. McGraw-Hill, New York. 1996.

Nagpal, S., Saunders, M., Kastner, P., Durand, B., Nakshatri, H. and Chambon, P. Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell*, *70*: 1007-1019, 1992a.

Nagpal, S., Zelent, A. and Chambon, P. RAR- β 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR- β 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *89*: 2718-2722, 1992b.

Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H. and Chambon, P. RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J.*, 12: 2349-2360, 1993.

Nau, M.M., Brooks, B.J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A.F., Kirsch, I.R., McBride, O.W., Bertness, V., Hollis, G.F. and Minna, J.D. L-myc, a New myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature*, 318: 69-73, 1985.

Nazar-Stewart, V., Motulsky, A.G., Eaton, D.L., White, E., Hornung, S.K., Leng, Z., Stapleton, P. and Weiss, N.S. The Glutathione-S-Transferase μ polymorphism as a marker for susceptibility to lung carcinoma. *Cancer Res.* 53: 2313-2318, 1993.

Nervi, C., Vollberg, T.M., George, M.D., Zelent, A., Chambon, P. and Jetten, A.M. Expression of nuclear retinoic acid receptors in normal tracheobronchial cells and in lung carcinoma cells. *Experimental Cell Res.*, 195: 163-170, 1991.

Nicholson, R.C., Mader, S., Nagpal, S., Reid, M., Rochette-Egly, C. and Chambon, P. Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP-1 binding site. *EMBO J.*, 9: 4443-4454, 1990.

Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S. and Hedge, P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253: 665-669, 1991.

Nowell, P.C. How many human cancer genes? *J. Natl Cancer Inst.*, 83: 1061-1064, 1991.

Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist, M., Balmes, J., Cullen, M.R., Glass, A., Keogh, J.P., Meyskens, F.L., Valanis, B., Williams, J.H., Barnhart, S. and Hammar, S. Effect of a combination of β -carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New Engl. J. Med.*, 334: 1150-1155, 1996a.

Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Glass, A., Keogh, J.P., Meyskens, F.L., Valanis, B., Williams, J.H., Barnhart, S., Cherniak, M.G., Brodtkin, C.A. and Hammar, S. Risk factor for lung cancer and for intervention effects in CARET, the β -carotene and retinol efficacy trial. *J. Natl Cancer Inst.*, 88: 1550-1559, 1996b.

Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, 270: 1354-1357, 1995.

Osann, K.E. Lung cancer in women: The importance of smoking, family history of cancer, and medical history of respiratory disease. *Cancer Res.*, 51: 4893-4897, 1991.

Parsons, R., Li, G.M., Longley, M.J., Fang, W.H., Papadopoulos, N., Jen, J., de la Chapelle, A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Modrich, P. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell*, 75: 1227-1236, 1993.

Peltomaki, P., Lothe, R.A., Aaltonen, L.A., Pylkkanen, L., Nyström-Lahti, M., Seruca, R., David, L., Holm, R., Ryberg, D., Haugen, A., Brogger, A. and de la Chapelle, A. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res.*, 53: 5853-5855, 1993.

Perlmann, T., Rangajaran, P.N., Umesono, K. and Evans, R.M. Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeats HREs. *Genes Dev.*, 7: 1411-1422, 1993.

Perlmann, T. and Jansson, L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.*, 9: 769-782, 1995.

Petkovitch, M., Brand, N., Krust, A. and Chambon, P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature*, 330: 444-450, 1987.

Pietenpol, J.A., Tokino, T., Thiagalingam, S., El-Deiry, W.S., Kinzler, W.K. and Vogelstein, B. Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91: 1998-2002, 1994.

Popperl, H. and Featherstone, M. Identification of a retinoic acid response element upstream of the murine Hox-4.2 gene. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 257-265, 1993.

Potten, C.S. and Loeffler, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, *110*: 1001-1020, 1990.

Prahalad, A.K., Ross, J.A., Nelson, G.B., Roop, B.C., King, L.C., Nesnow, S. and Mass, M.J. Dibenzo(a) pyrene-induced DNA adduction, tumorigenicity, and Ki-ras oncogene mutations in strain A/J mouse lung. *Carcinogenesis*, *18*: 1955-1963, 1997.

Reddel, R.R. and Harris, C.C. Carcinogenesis. *In: Thoracic Oncology*, Roth, J.A., Ruckdeschel, J.C. and Weisenburger, T.H. eds. W. B. Saunders Co., Philadelphia. 1989.

Reissmann, P.T., Koga, H., Takahashi, R., Figlin, R.A., Holmes, E.C., Piantadosi, S., Cordon-Cardo, C. and Slamon, D.J. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, *8*: 1913-1919, 1993.

Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. Crystal structure of the RAR- γ ligand-binding domain bound to *all-trans* retinoic acid. *Nature*, *378*: 681-689, 1995.

Richard, S. and Zingg, H. Identification of a retinoic acid response element in the human oxytocin promoter. *J. Biol. Chem.*, *266*: 21428-21433, 1991.

Richardson, G.E. and Jonhson, B.E. The biology of lung cancer. *Seminars in Oncology*, *20*: 105-127, 1993.

Rigas, J.R., Francis, P.A., Muindi, J.R.F., Kris, M.G., Huselton, C., DeGrazia, F., Orazem, J.P., Young, C.W. and Warrell, R.P. Constitutive variability in the pharmacokinetics of the natural retinoid, all-trans retinoic acid, and its modulation by ketaconazole. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 1921-1926, 1993.

Rigas, J.R., Miller, V.A., Zhang, Z.F., Klimstra, D.S., Tong, W.P., Kris, M.G. and Warrell, R.P. Metabolic phenotypes of retinoic acid and the risk of lung cancer. *Cancer Res.*, 56: 2692-2696, 1996.

Roberts, A.B. and Sporn, M.B. Cellular Biology and Biochemistry of the Retinoids. *In: The Retinoids*, Sporn, M.B., Roberts, A.B. and Goodman, D.S. eds. Academic Press, Orlando. 1984.

Roman, S.D., Clarke, C.L., Hall, R.E., Alexander, I.E. and Sutherland, R.L. Expression and regulation of retinoic acid receptors in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 52: 2236-2242, 1992.

Ross, H.J. The antiproliferative effect of trans-retinoic acid is associated with selective induction of interleukin-1 β , a cytokine that directly inhibits growth of lung cancer. *Oncology Res.*, 8: 171-178, 1996.

Ruberte, E., Dollé, P., Krust, A., Zelent, A., Morris-Kay, G. and Chambon, P. Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor γ transcripts during mouse embryogenesis. *Development*, 108: 213-222, 1990.

Ruberte, E., Dollé, P., Chambon, P. and Morris-Kay, G. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development*, *111*: 45-60, 1991.

Ruberte, E., Friedrich, V., Chambon, P. and Morris-Kay, G. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development. *Development*, *118*: 267-282, 1993.

Ryberg, D., Hewer, A., Phillips, D.H. and Haugen, A. Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Res.*, *54*: 5801-5803, 1994.

Samet, J.M. The epidemiology of lung cancer. *Chest*, *103*: 20S-29S, 1993.

Sanders, B.M., Jay, M., Draper, G.J. and Roberts, E.M. Non-ocular cancer in relatives of retinoblastoma patients. *Br. J. Cancer*, *60*: 358-365, 1989.

Schauer, I.E., Siriwardana, S., Langata, M. and Sclafani, R.A. Cyclin D1 overexpression vs retinoblastoma inactivation: implications for growth control evasion in non-small cell and small cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *91*: 7827-7831, 1994.

Schüle, R., Rangajaran, P., Yang, N., Kliwer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Verma, I.M. and Evans, R.M. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1 responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *88*: 6092-6096, 1991.

Seewaldt, V.L., Johnson, B.S., Parker, M.B., Collins, S.J. and Swisshelm, K. Expression of retinoic acid receptor β mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Cell Growth & Differ.*, 6: 1077-1088, 1995.

Segars, J.H., Nagata, T., Bours, V., Medin, J.A., Franzoso, G., Blanco, J.C.G., Drew, P.D., Becker, K.G., An, J., Tang, T., Stephany, D.A., Neel, B., Siebenlist, U. and Ozato, K. Retinoic acid induction of major histocompatibility complex class I gene in NTera-2 embryonal carcinoma cells involves induction of NF-kB (p50-p65) and retinoic acid receptor β -retinoid X receptor β heterodimers. *Mol Cell Biol*, 13: 6157-6169, 1993.

Sekido, Y., Takahashi, T. and R., U. Recombinant human stem cell factor mediates chemotaxis of small cell lung cancer cell lines expressing the c-kit proto-oncogene. *Cancer Res.*, 53: 1709-1713, 1993.

Sekido, Y., Bader, S., Latif, F., Gnarr, J.R., Gazdar, A.F., Linehan, W.M., Zbar, B., Lerman, M.I. and Minna, J.D. Molecular analysis of the Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene in human lung cancer cell lines. *Oncogene*, 9: 1599-1604, 1994.

Sekido, Y., Bader, S., Latif, F., Chen, J.Y., Duh, F.M., Wei, M.H., Albanesi, J.P., Lee, C.C., Lerman, M.I. and Minna, J.D. Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 4120-4125, 1996.

Sellers, T.A., Ooi, W.L., Elston, R.C., Chen, V.W., Bailey-Wilson, J.E. and Rotschild, H. Increased familial risk for non-lung cancer among relatives of lung cancer patients. *Am. J. Epidemiology*, 126: 237-246, 1987.

Shapiro, G.L., Park, J.E., Edwards, C.D., Mao, L., Merlo, A., Sidransky, D., Ewen, M.E. and Rollins, B.J. Multiple mechanisms of p16^{INK4A} inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res.*, 55: 6200-6209, 1995.

Shay, J.W. and Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*, 33: 787-791, 1997.

Sheikh, M.S., Shao, Z.M., Li, X.S., Dawson, M., Jetten, A.M., Wu, S., Conley, B.A., Garcia, M., Rochefort, H. and Fontana, J.A. Retinoid-resistant estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells transfected with retinoic acid receptor α acquire sensitivity to growth inhibition by retinoids. *J. Biol. Chem.*, 269: 21440-21447, 1994.

Shen, S., Kruyt, F.A., Den Hertog, J., van der Saag, P.T. and Kruijer, W. Mouse and human retinoic acid receptor β 2 promoters: sequence comparison and localization of retinoic acid responsiveness. *DNA Sequence*, 2: 111-119, 1991.

Si, S.P., Lee, X., Tsou, H.C., Buschblau, R., Tibaduiza, E. and Peacocke, M. RAR β 2-mediated growth inhibition in HeLa cells. *Exp. Cell Res.*, 223: 102-111, 1996.

Smarda, J., Sugarman, J., Glass, C. and Lipsick, J. Retinoic acid receptor α suppresses transformation by v-myb. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 2474-2481, 1995.

Smith, A.L., Hung, J., Walker, L., Rogers, T.E., Vuitch, F., Lee, E. and Gazdar, A.F. Extensive areas of aneuploidy are present in the respiratory epithelium of lung cancer patients. *Br. J. Cancer*, 73: 203-209, 1996.

Soussi, T., Tredaniel, J., Lubin, R., Zalcman, G. and Hirsh, A. The p53 tumor suppressor gene in lung cancer: from molecular to serological diagnosis. *In: Clinical and biological basis of lung cancer prevention*, Martinet, Y., Hirsch, F.R., Martinet, N., Vignaud, J.M. and Mulshine, J.L. eds. Birkhäuser-Verlag, Basel. 1998.

Sozzi, G., Miozzo, M., Donghi, R., Pilotti, S., Cariani, C.T., Pastorino, U., Della Porta, G. and Pierotti, M.A. Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung. *Cancer Res.*, 52: 6079-6082, 1992.

Sozzi, G., Veronese, M.L., Negrini, M., Baffa, R., Cotticelli, M.G., Inoue, H., Tornielli, S., Pilotti, S., De Gregorio, L., Pastorino, U., Pierotti, M.A., Ohta, M., Huebner, K. and Croce, C.M. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*, 85: 17-26, 1996.

Sporn, M.B. Carcinogenesis and cancer-different perspectives on the same disease. *Cancer Res.*, 51: 6215-6218, 1991.

Stanley, K. and Hansen, H.H. An international survey on attitudes in the control of lung cancer: A collaborative study between WHO and I.A.S.L.C. *Lung Cancer*, 1: 47-55, 1985.

Subbarayan, V., Kastner, P., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P. and Chambon, P. Limited specificity and large overlap of the functions of the mouse RAR $\gamma 1$ and $\gamma 2$ isoforms. *Mech. Dev.*, 66: 131-142, 1997.

Sucov, H.M., Murakami, K.K. and Evans, R.M. Characterization of an Autoregulated Response Element in the Mouse Retinoic Acid Receptor β Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5392-5396, 1990.

Sundaresan, V., Ganly, P., Hasleton, P., Rudd, R., Sinha, G., Bleehen, N.M. and Rabbitts, P. p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristics of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene*, 7: 1989-1997, 1992.

Swift, M., Caldwell, R.J. and Chase, C. Reassessment of cancer predisposition in Fanconi's anemia heterozygotes. *J. Natl. Cancer Inst.*, 65: 863-867, 1980.

Swishhelm, K., Ryan, K., Lee, X., Tsou, H.C., Peacocke, M. and Sager, R. Down-regulation of retinoic acid receptor β in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell Growth & Differentiation*, 5: 133-141, 1994.

Taioli, E. and Wynder, E.L. Endocrine factors and adenocarcinoma of the lung in women. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86: 869-870, 1994.

Takahashi, T., Nau, M.M., Chiba, I., Birrer, M.J., Rosenberg, R.K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A.F. and Minna, J.D. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, 246: 491-494, 1989.

Talmage, D.A. and Lackey, R.S. Retinoic acid receptor α suppresses polyomavirus transformation and c-fos expression in rat fibroblasts. *Oncogene*, 7: 1837-1845, 1992.

Taneja, R., Bouillet, P., Boylan, J.F., Gaub, M.-P., Roy, B., Gudas, L.J. and Chambon, P. Reexpression of retinoic acid receptor (RAR γ) or overexpression of RAR α or RAR β in RAR γ -null F9 cells reveals a partial functional redundancy between the three RAR phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7854-7858, 1995.

Taneja, R., Roy, B., Plassat, J.-L., Zusi, C.F., Ostrowski, J., Reczek, P.R. and Chambon, P. Cell-type and promoter-context dependent retinoic acid receptor (RAR) redundancies for RAR β 2 and Hoxa-1 activation in F9 and P19 cells can be artefactually generated by genes knockouts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6197-6202, 1996.

Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C. and Evans, R.M. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid and vitamin D3 receptors. *Cell*, 65: 1255-1266, 1991.

Valanis, B.G. Epidemiology of lung cancer: a worldwide epidemic. *Seminars in Oncology Nursing*, 12: 251-259, 1996.

van der Burg, B., van der Leede, B.J.M., Kwakkenbos-Isbrüker, L., Salverda, S., de Laat, S.W. and van der Saag, P.T. Retinoic acid resistance of estradiol-

independent breast cancer cells coincides with diminished retinoic acid receptor function. *Mol. Cell. Endo.* *91*: 149-157, 1993.

van der Leede, B.J.M., Folkers, G.E., Kruyt, F.A.E. and van der Saag, P.T. Genomic organization of the human retinoic acid receptor β 2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, *188*: 695-702, 1992.

van der Leede, B.J.M., Folkers, G.E., van den Brink, C.E., van der Saag, P.T. and van der Burg, B. Retinoic acid receptor α 1 isoform is induced by estradiol and confers retinoic acid sensitivity in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Endo.*, *109*: 77-86, 1995.

Vinocour, M. and Minna, J.D. Cellular and Molecular Biology of Lung Cancer. *In: Thoracic Oncology*, Roth, J.A., Ruckdeschel, J.C. and Weisenburger, T.H. eds. W. B. Saunders Company, Philadelphia. 1989.

Vivanco-Ruiz, M.D.M., Bugge, T.H., Hirschmann, P. and Stunnenberg, H.G. Functional characterization of a natural retinoic acid responsive element. *EMBO J.*, *10*: 3829-3838, 1991.

Voegel, J.J., Heine, M.J.S., Zechel, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H. A 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.*, *15*: 3667-3675, 1996.

Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics*, *9*: 138-141, 1993.

vom Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M., Garnier, J.M., Vivat, V., Le Douarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P. and Losson, R. Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J.*, 15: 110-124, 1995.

Walker, L.C., Ganesan, T.S., Dhut, S., Gibbons, B., Lister, T.A., Rothbard, J. and Young, B.D. Novel chimaeric protein expressed in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Nature*, 329: 851-853, 1987.

Weiner, D.B., Norberg, J., Robinson, R., Nowell, P.C., Gazdar, A., Greene, M.I., Williams, W.V., Cohen, J.A. and Kern, J.A. Expression of the neu gene encoded protein (p185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res.*, 50: 421-425, 1990.

Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D. and McClelland, M. Arbitrarily primed PCR fingerprint of RNA. *Nucleic Acids Research*, 20: 4965-4970, 1992.

Westra, W.H., Slebos, R.J., Offerhaus, G.J., Goodman, S.N., Evers, S.G., Kensler, T.W., Askin, F.B., Rodenhuis, S. and Hruban, R.H. K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. *Cancer*, 72: 432-438, 1993.

Whang-Peng, J., Kao-Shan, C.S., Lee, E.C., Bunn, P.A., Carney, D.N., Gazdar, A.F. and Minna, J.D. Specific chromosome defect associated with human small cell lung cancer: deletion 3p(14-23). *Science*, 215: 181-182, 1982.

Whang-Peng, J., Knutsen, T., Gazdar, A., Steinberg, S.M., Oie, H., Linnoila, I., Mulshine, J., Nau, M. and Minna, J.D. Nonrandom structural and numerical chromosome changes in non-small cell lung cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 3: 168-188, 1991.

WHO. The World Health Organization Histological Typing of Lung Tumours. *American Journal of Clinical Pathology*, 77: 123-136, 1982.

Wistuba, I.I. and Gazdar, A.F. Molecular abnormalities in the sequential development of lung carcinoma. *In: Clinical and Biological Basis of Lung Cancer Prevention*, Martinet, Y., Hirsch, F.R., Martinet, N., Vignaud, J.-M. and Mulshine, J.L. eds. Birkhäuser-Verlag, Basel. 1998.

Wolbach, S.B. and Howe, P.R. Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin. *Journal of Experimental Medicine*, 42: 753-777, 1925.

Xiang, R.-H., Hensel, C.H., Garcia, D.K., Carlson, H.C., Kok, K., Daly, M.C., Kerbacher, K., Van Den Berg, A., Veldhuis, P., Buys, C.H.C.M. and Naylor, S.L. Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer. *Genomics*, 32: 39-48, 1996.

Xu, H.-J., Hu, S.-X., Cagle, P.T., Moore, G.E. and Benedict, W.F. Absence of Retinoblastoma Protein Expression in Primary Non-Small Cell Lung Carcinomas. *Cancer Res.*, 51: 2735-2739, 1991.

Yokoyama, S., Yamakawa, K., Tsuchiya, E., Murata, M., Sakiyama, S. and Nakamura, Y. Deletion mapping on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res.*, 52: 873-877, 1992.

Zang, E.A. and Wynder, E.L. Differences in lung cancer risk between men and women: Examination of the evidence. *J. Natl. Cancer Inst.*, 88: 183-192, 1996.

Zechel, C., Shen, X.Q., Chen, J.Y., Chen, Z.P., Chambon, P. and Gronemeyer, H. The dimerization interfaces formed between the DNA-binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J.*, 13: 1425-1433, 1994.

Zelent, A., Mendelsohn, C., Kastner, P., Krust, A., Garnier, J.-M., Ruffenach, F., Leroy, P. and Chambon, P. Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor β are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J.*, 10: 71-81, 1991.

Zhang, X.-K., Lehmann, J., Hoffmann, B., Dawson, M.I., Cameron, J., Graupner, G., Hermann, T., Tran, P. and Pfahl, M. Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-*cis* retinoic acid. *Nature*, 358: 587-591, 1992.

Zhang, X.-K., Liu, Y., Lee, M.-O. and Pfahl, M. A specific defect in the retinoic acid response associated with human lung cancer cell lines. *Cancer Res.*, *54*: 5663-5669, 1994.

Zimmer, A., Zimmer, A.M. and Reynolds, K. Tissue specific expression of the retinoic acid receptor- β 2: regulation by short open reading frames in the 5'-noncoding region. *J.Cell Biol.*, *127*: 1111-1119, 1994.

Zou, C.P., Clifford, J.L., Xu, X.C., Sacks, P.G., Chambon, P., Hong, W.K. and Lotan, R. Modulation by retinoic acid (RA) of squamous differentiation, cellular RA-binding proteins and nuclear RA receptors in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, *54*: 5479-5487, 1994.