

Université de Montréal

Étude du rôle de la ribonucléotide réductase humaine (RNR) dans la
carcinogenèse mammaire.

Par :

Céline Ablasou

Programme de biologie moléculaire

Faculté des Études Supérieures

Mémoire présenté à la faculté des Études supérieures

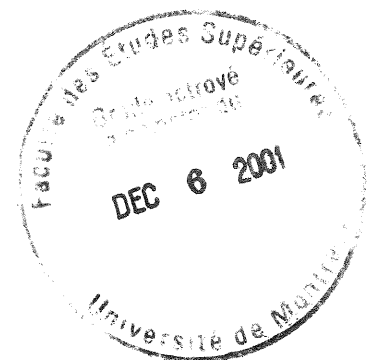
En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

En biologie moléculaire

Avril 2001

©Céline Ablasou, 2001



QH

506

154

2001

N.021

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire de maîtrise est intitulé :

Étude du rôle de la ribonucléotide réductase humaine (RNR) dans la
carcinogenèse mammaire.

Présenté par :

Céline Ablasou

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Anne-Marie Mes-Masson : président rapporteur

Dr Elliot Drobetsky : membre du jury

Dr. Yves Langelier : directeur

Dr. Marc Prentki : co-directeur

Mémoire accepté le : 17 septembre 2001

Sommaire:

Près de 5000 canadiennes meurent chaque année du cancer du sein. Les causes encore mal connues de cette maladie impliqueraient divers facteurs tant environnementaux que génétiques.

D'après certaines études la ribonucléotide réductase humaine (RNR) pourrait être impliquée dans la carcinogenèse mammaire. La RNR, qui convertit les ribonucléotides en désoxyribonucléotides, est une enzyme essentielle et limitante pour la réplication de l'ADN. Elle est constituée de deux sous-unités, HuR1 et HuR2, qui doivent interagir ensemble afin de former l'holoenzyme active. La sous-unité HuR1 comprend un site de contrôle allostérique responsable de la spécificité au substrat, alors que la sous-unité HuR2 possède un centre di-ferrique et un radical tyrosyl responsable de l'activité de l'enzyme.

Une surexpression importante de la HuR2 a été observée dans près de 80% des cellules provenant de biopsies de lésions pré-malignes du sein; l'implication dans le processus de transformation cellulaire de chacune des sous-unités formant la RNR reste toutefois à élucider. Afin de vérifier le rôle de la RNR dans la carcinogenèse, nous avons effectué quelques études préliminaires sur l'effet d'une surexpression de la HuR1 dans des cellules 293 rTa.

Les cellules exprimant de manière stable la protéine HuR1 ainsi que la protéine régulatrice rTa du système inductible Tet-on ont été sélectionnées alors que

l'expression de la HuR1 n'était pas induite. Le gène de la GFP_Q (sous le contrôle d'un promoteur CMV) présent dans le vecteur pAd-TR5F-K7-GFP_Q fut utilisé comme marqueur de sélection, sélection effectuée d'abord par micromanipulation. Cette stratégie a été choisie parce qu'elle rend possible l'observation de changements moléculaires pouvant survenir précocement suite à l'induction de la surexpression et ce, dans des cellules n'ayant pas subi de modifications génétiques résultant de leur adaptation à une surexpression constitutive de la HuR1.

L'analyse d'une vingtaine de clones isolés au départ nous a permis de dériver deux lignées exprimant de façon stable la GFP_Q et la HuR1. L'ajout de doxycycline à ces cellules, qui induit une surexpression de la HuR1 de 60-250 fois, entraîne une diminution significative de la croissance des clones induits, tandis qu'elle n'a aucun effet sur la croissance de cellules contrôles. Nous avons tenté de caractériser cette diminution de la croissance et d'en élucider la cause. Toutefois, sans études plus approfondies, il nous est impossible de conclure que la diminution de la croissance cellulaire observée chez ces cellules est bien due à de l'apoptose. Un arrêt du cycle cellulaire en G₀/G₁ pourrait amener une diminution de la croissance et une susceptibilité des cellules à la mort cellulaire, ou encore un arrêt durant la phase S pourrait avoir des effets similaires en favorisant la mort des cellules par la voie du p53. Il serait important de vérifier ces hypothèses avant de pouvoir avancer une conclusion.

Remerciements :

Je tiens à remercier le Dr Yves Langelier pour m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire. Je tiens à remercier également le Dr Marc Prentki pour son support moral et scientifique, ainsi que pour avoir financé mes deux années de maîtrise.

Un gros merci à tous ceux qui m'ont apporté leur aide et leurs connaissances tels que Claire Guilbault (notre éternelle référence) et le Dr Bernard Massie, mais sans oublier tous les étudiants qui m'ont accompagnés lors de ces deux années de recherche : Sonia Chiasson et Annie Gervais (que de souvenirs partagés nous aurons!), et tous les étudiants de chez Marc et de chez Bernard (Vive la danse).
Merci à mes parents adorés pour m'avoir soutenu tout le long de mes études. Je sais que je n'ai pas toujours été l'ange que je parais :oP

Table des matières :

	page
Sommaire.....	i
Remerciements.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	v
Listes des tableaux.....	ix
Listes des sigles et abréviations.....	x
1. Revue de littérature	p.1
1.1. Avant-propos	p.1
1.2. La ribonucléotide réductase humaine (RNR).....	p.3
1.2.1. Structure et fonction de l'enzyme	p.3
1.2.2. Régulation de l'activité enzymatique de la RNR	p.6
1.2.3. Conséquences d'un déséquilibre des réserves de dNTPs....	p.7
1.3. Tumorigénèse et ribonucléotide réductase.....	p.9
1.4. Système d'activation transcriptionnelle par la tétracycline (Tet-On)	p.11
1.5. Description du projet	p.14
2. Méthodologie	p.16
2.1. Développement de lignées cellulaires exprimant de manière stable la protéine rtTa.	p.16
2.1.1. Entretien des cellules et milieu de culture	p.16
2.1.1.1. Obtention des clones MDA-MB-231 rtTa	p.18
2.2. Construction des vecteurs	p.20
2.2.1. Vecteur utilisé : pAdTR5F-K7-GFP _Q	p.20
2.2.2. Construction pAdTR5F-K7-HuR1-GFP _Q et pAdTR5F-K7- HuR2-GFP _Q	p.20
2.3. Établissement de lignées cellulaires qui expriment de manière la HuR1 ou la HuR2	p.21

2.4. Récolte des cellules	p.25
2.5. Électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE)	p.26
2.6. Immunobuvardage.....	p.27
2.7. Étude de la protéine recombinante HuR1.....	p.28
2.8. Dosage de l'activité réductase de la HuR1 recombinante.....	p.29
2.9. Courbes de croissance.....	p.29
2.10. Immunofluorescence sur lamelles.....	p.30
2.11. Solubilité de la protéine recombinante HuR1.....	p.31
2.12. Dosage enzymatique des activités caspases-1, 3, 6, 8 et 9	p.32
2.13. Statistiques.....	p.33
3. Résultats	p.34
3.1. Établissement de lignées cellulaires du sein exprimant de manière stable la protéine rtTa	p.34
3.1.1. Sélection des clones MCF-10A rtTa.....	p.34
3.1.2. Sélection des clones MDA-MB-231 rtTa.....	p.34
3.2. Établissement de lignées cellulaires qui expriment de manière stable la HuR1 ou HuR2	p.36
3.3. Caractérisation de la surexpression de HuR1	p.38
3.4. Dosage de l'activité réductase de la HuR1 recombinante	p.44
3.5. Effet de la surexpression de HuR1 sur la croissance cellulaire	p.45
3.6. Localisation et distribution de la HuR1	p.53
3.7. Solubilité de la protéine HuR1 recombinante	p.57
3.8. Caractérisation de l'apoptose induite par la surexpression de HuR1.	p.59
4. Discussion.....	p.63
4.1. Établissement de lignées cellulaires du sein exprimant de manière stable la protéine rtTa.....	p.64
4.2. Établissement de lignées cellulaires qui expriment de manière stable la HuR1 ou la HuR2	p.65
4.3. Étude la protéine recombinante HuR1	p.67

4.3.1. Effets de différents niveaux d'expression de la HuR1 sur la croissance cellulaire	p.69
4.4. Solubilité de la HuR1 recombinante	p.71
4.4.1. Immunofluorescence sur lamelles	p.71
4.4.2. Solubilité de la protéine HuR1	p.72
4.5. Détermination des mécanismes par lesquels une surexpression de HuR1 affecte la croissance cellulaire	p.73
4.5.1. Clivage de la protéine PARP	p.73
4.5.2. Dosage enzymatique des activités caspase-1, 3, 6, 8 et 9	p.74
5. Conclusion.....	p.75
5.1. Perspectives d'avenir.....	p.77
6. Références bibliographiques	p.78

Liste des figures

Figure 1	Réduction d'un ribonucléotide en désoxyribonucléotide.	p. 3
Figure 2	Sous-unités R1 et R2 de la RNR d' <i>Escherichia coli</i> .	p. 4
Figure 3	Génération du radical tyrosyl libre	p. 5
Figure 4	Le contrôle de la régulation de la synthèse des dNTPs dans la RNR des mammifères.	p. 6
Figure 5	Le système d'activation transcriptionnelle par la tétracycline (système Tet-on)	p. 13
Figure 6	Plasmide pUHD172-1néo	p. 19
Figure 7	Vecteur pAd-TR5F-K7-GFP _Q utilisé lors des constructions HuR1 et HuR2.	p. 22
Figure 8	Construction du vecteur pAd-TR5F-K7-HuR1-GFP _Q et pAd-TR5F-K7-HuR2-GFP _Q	p. 23
Figure 9	Induction par la doxycycline de la surexpression de la protéine recombinante HuR1 dans des 293 rtTa.	p. 37
Figure 10	Production de la protéine HuR1 en fonction du temps post-induction. a- Bleu de Coomassie b- Immunodétection	p. 40
Figure 11	Production de la protéine HuR1 en fonction de la concentration de doxy sur les cellules 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8. a- Bleu de Coomassie b- Immunodétection	p. 42
Figure 12	Production de la protéine HuR1 en fonction de la concentration de doxy (0 à 3 µg/ml de doxy) : a-293rtTa/R1-1 b-293rtTa/R1-8	p. 43
Figure 13	Croissance des différents clones cellulaires en présence et en absence de doxy (3µg/ml) ajoutée à l'ensemencement.	p. 46
Figure 14	Croissance des 293rtTa/R1-1 avec et sans induction par 3 µg/ml de doxy 24h après l'ensemencement.	p. 49
Figure 15	Croissance des 293rtTa/R1-1 et des 293rtTa/R1-8 en absence et en présence de doxycycline (200 ng/ml et 3µg/ml).	p. 51

- Figure 16** Croissance des différents clones cellulaires induit depuis 1 semaine en présence et en absence de doxy (3µg/ml) ajoutée 24h après l'ensemencement. p. 52
- Figure 17** Immunofluorescence permettant la détection de la protéine HuR1 endogène et recombinante. p. 55
- Figure 18** Solubilité des protéines des différentes fractions provenant des extraits de 293rtTa, 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 induits et non-induits par la doxy. a- Bleu de Coomassie
b- Immunodétection p. 58
- Figure 19** Clivage de la protéine PARP suite à l'induction de l'expression de la protéine HuR1. p. 60
- Figure 20** Activité enzymatique spécifique de la caspase-3 sur des extraits induits et non-induits pendant 24h, 48h et 72h.. p. 62

Liste des tableaux

Tableau I	Sélection des clones MDA-MB-231 rtTa en fonction de l'expression de la GFP après induction.	p. 35
Tableau II	Stabilité de l'insertion des gènes HuR1 ou HuR2 dans les 293 rtTa.	p. 37
Tableau III	Activité réductase de la HuR1 (endogène et recombinante), et estimation de la surexpression de HuR1 recombinante.	p. 45
Tableau IV	Pourcentage de solubilité de la protéine recombinante HuR1 déterminé par densitométrie.	p. 57
Tableau V	Dosage des activités spécifiques des caspases 1, 3, 6, 8 et 9.	p. 61

Liste des sigles et abréviations

a.a.	acides aminés
Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
DMEM	« Dulbeco's minimum essential medium »
doxy	doxycycline
dNTP	désoxyribonucléoside 5'-triphosphate
FACS	« Flow Cytometry Analysis and Cell Sorting »
G-418	G-418-sulfate ou Geneticine
GFP	protéine fluorescente verte (« green fluorescent protein »)
h	heure
HRP	Péroxydase de Raiford (« horse raidish peroxydase »)
HuR1	grande sous-unité de la RNR humaine
HuR2	petite sous-unité de la RNR humaine
mA	milliampères
mg	milligrammes
min	minutes
ml	millilitres
mM	millimolaires
MOI	multiplicité d'infection (« multiplicity of infection »)
µg	microgrammes

μl	microlitres
NADPH	forme réduite du nicotiamide adénine dinucléotide phosphate
ng	nanogrammes
PARP	poly (ADP-ribose) polymérase
pb	paire de bases
PBS	Tampon de phosphate salin (« phosphate buffered saline »)
PFU	unité formant une plaque (« plaque forming unit »)
R1	grande sous-unité de la RNR
R1-1	Clone #1 exprimant de manière stable la HuR1
R1-8	Clone #8 exprimant de manière stable la HuR1
R2	petite sous-unité de la RNR
RNR	ribonucléotide réductase
rpm	révolution par minute
rtTa	« reverse tetracycline trans-activator »
SDS	dodécyle sulfate de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (« SDS polyacrylamide gel electrophoresis »)
sec	secondes
TNF	« tumor necrosis factor »
Tris	tri(hydroxyméthyle) aminométhane
V	Volt

1 Revue de littérature

1.1 Avant-propos

Le cancer est une maladie dont meurent près de 60 000 canadiens chaque année (Source : Statistique Canada, Division des statistiques sur la santé.). Le cancer est un processus évolutif qui nécessite plusieurs étapes avant de dégénérer en une tumeur envahissante et métastatique. Les causes de la maladie sont multifactorielles. Les facteurs impliqués peuvent être des mutagènes environnementaux (tels que la pollution, les radiations, les virus et l'exposition à divers produits chimiques), des éléments de nature génétique tel que l'accumulation de plusieurs mutations génétiques ou des phénomènes de nature épigénétique.

Parmi tous les cancers affectant les femmes, celui du sein est le plus important et un des plus létaux. Ce sont 10 % des canadiennes qui en seront atteintes un jour ou l'autre au cours de leur vie, et 4% des femmes en décèderont (Source : Institut national du cancer du Canada, Statistiques canadiennes sur le cancer 2000, Toronto, 2000). Des études associent la présence de certaines altérations dans des gènes tels BRCA1 (Smith et Ponder, 1993) et BRCA2 (Wooster et *al*, 1994), à une prédisposition à développer la maladie. Ce genre de « défaut » génétique pourrait impliquer environ 10% des cas de cancers du sein. D'autres facteurs peuvent être des facteurs de risque de l'apparition de la maladie tels que l'âge du début et de la fin des menstruations, le diabète, l'obésité et la nutrition.

Dans la littérature, plusieurs observations supportent l'hypothèse que la ribonucléotide réductase (RNR) pourrait être impliquée dans la transformation cellulaire. Le but principal de cette étude était d'étudier l'implication possible de cette enzyme dans la carcinogenèse mammaire.

Afin d'étudier le rôle de chacune des sous-unités qui compose la RNR, nous avons utilisé un système d'activation transcriptionnelle par la tétracycline (Tet-on). Contrairement aux systèmes d'expression homologues, qui sont basés sur des mécanismes de régulation eucaryotique, le système Tet-on n'a pas d'effet pléiotropique (Harkin et *al.* 1999). Il est donc plus facile de distinguer les événements qui ne sont dus qu'à une surexpression de notre gène d'intérêt. De plus, le système semble étanche en comparaison à d'autres systèmes de contrôle de la transcription, c'est à dire que l'expression du gène d'intérêt est maintenue dans un état de répression (état OFF) tant et aussi longtemps qu'il n'y a pas d'ajout de doxy (un analogue de la tétracycline) (Lee et al, 1998). Cela permet de pouvoir observer les événements qui pourraient survenir de manière précoce dès l'induction de l'expression du gène d'intérêt. Cela permet également d'éviter de sélectionner des cellules qui auraient subi une adaptation à une surexpression.

1.2 La ribonucléotides réductase humaine

1.2.1 Structure et fonction de l'enzyme

La RNR est la seule enzyme du métabolisme à catalyser la formation des désoxyribonucléotides (dNTPs) à partir de la réduction des ribonucléotides (NTPs) correspondants (Lewis et *al.* 1978) (figure 1). Étant essentielle à la synthèse *de novo* de l'ADN, elle est retrouvée chez presque tous les organismes vivants. La RNR peut être divisée en trois classes bien caractérisées (Reichard, 1993) (Jordan et Reichard 1998). Les RNR de la classe I regroupe les RNR de presque tous les eucaryotes en plus de quelques organismes unicellulaires, de *E. coli* et de grands virus tels la vaccine ou les virus herpès. Ils sont caractérisés par la présence d'un radical tyrosyl qui est stabilisé par un complexe di-ferrique. Les RNR de la classe II utilisent une coenzyme B₁₂ alors que les enzymes de la classe III contiennent un complexe [3Fe-4S] et quelques fois un complexe [4Fe-4S] qui requièrent de la S- adénosylméthionine et du NADPH pour leur activité.

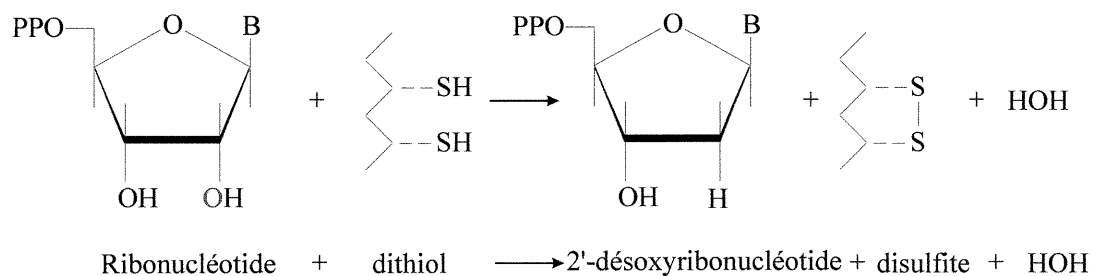


Figure 1 Réduction d'un ribonucléotide en désoxyribonucléotide.

La RNR catalyse la réduction par désoxygénation de l'anneau de ribose en 2' formant ainsi un 2'-désoxyribose.

Quant à sa structure, la RNR est un tétramère de type $\alpha_2\beta_2$, c'est-à-dire, un hétérodimère composé de deux sous-unités homodimériques: R1 et R2 qui doivent interagir ensemble par leurs extrémités carboxy-terminales afin de former l'holoenzyme active. La sous-unité R1 (figure 2a) contient deux sites du contrôle allostérique nécessaires à une synthèse équilibrée des différents dNTPs: l'un contrôle la spécificité au substrat, le second l'activité catalytique de l'enzyme. Chaque sous-unité R2 (figure 2b) contient un radical tyrosyl stabilisé par un complexe di-nucléaire de fer (ou complexe di-ferrique) à ponts oxo qui est absolument nécessaire à l'activité enzymatique de réduction (Stubbe et Riggs-Gelasco 1998).

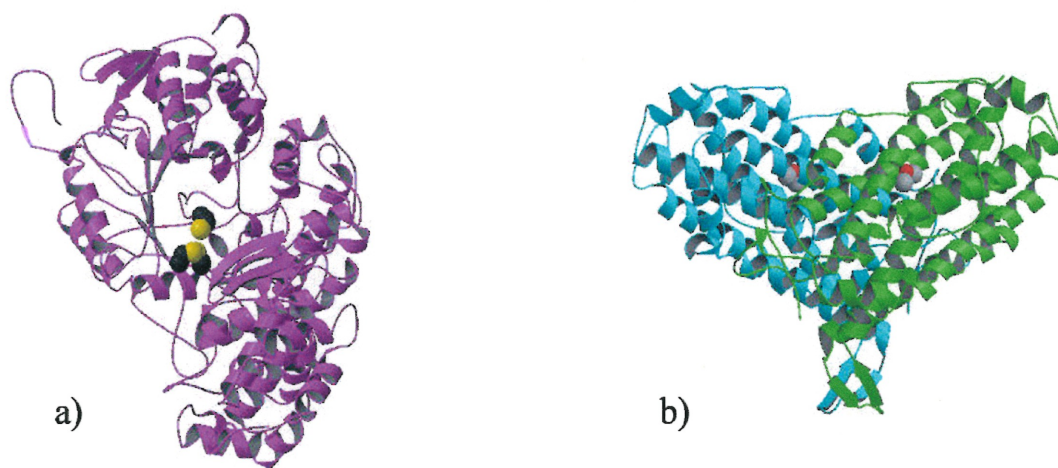


Figure 2 Sous-unités R1 et R2 de la RNR d'*Escherichia coli*

a) Forme cristalline de la sous-unité R1.

b) Forme cristalline de la sous-unité R2.

Basé sur Nordlund et collaborateurs qui ont déterminé les formes cristallines d'origine des deux sous-unités de la RNR d'*Escherichia coli* (Nordlund et al, 1989 et 1993)

Le complexe di-ferrique peut se trouver sous deux formes distinctes: la forme réduite (FeII-FeII) et la forme oxydée (FeIII-FeIII). La forme réduite forme un centre di-ferrique très symétrique sans pont oxo. Cette forme peut réagir avec l'oxygène en créant le radical tyrosyl neutre (Figure 3). Sous la forme oxydée, les deux atomes de fer sont liés ensemble par des Ponts Oxo avec le résidu Glu. Chaque atome de fer est lié à une Histidine et une molécule d'eau; en plus, un atome de fer lie deux résidus Glu pendant que l'autre atome de fer « chélate » le résidu Asp (2-). Les résidus tyrosyls génèrent des radicaux libres (Y*) qui sont utilisés pour le transfert d'électrons utilisés lors de la réduction de l'anneau de ribose (Fontecave et al. 1992).

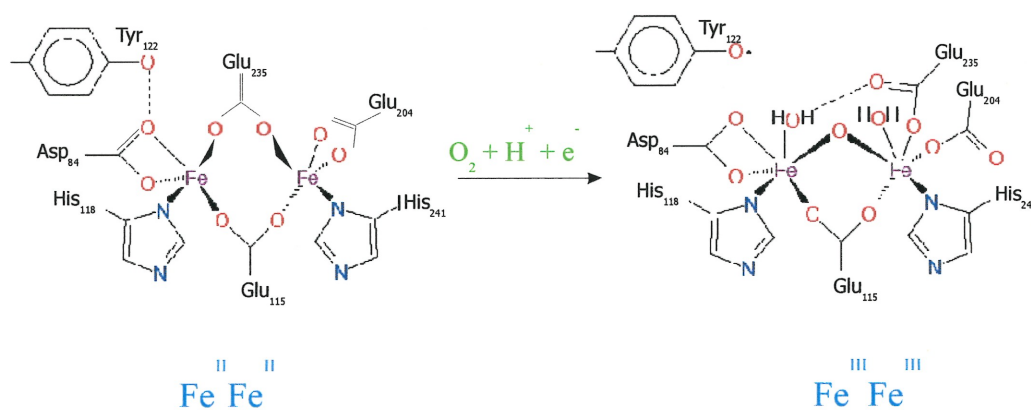


Figure 3 Génération du radical tyrosyl libre

Le centre di-ferrique catalyse l'oxydation du résidu Tyr-122 voisin générant le radical tyrosyl essentiel à la réaction de réduction.

Il est possible de trouver dans la littérature l'ancienne nomenclature qui nomme les sous-unités M1 et M2 (Mammifère), B1 et B2 (*E.coli*) et H1 et H2 (virus Herpès). Chacune des deux sous-unités est codée par un gène situé sur un chromosome différent (Tonin et al. 1989).

1.2.2 Régulation de l'activité enzymatique de la RNR

L'expression et l'activité de la RNR sont hautement régulées (Wright *et al.* 1990; Choy *et al.* 1988). L'activité de l'holoenzyme est régulée par une boucle de rétroaction complexe (Thelander et Reichard, 1979) impliquant les niveaux de ses différents substrats (Figure 4). Par exemple, la liaison de l'ATP au site de contrôle allostérique contrôlant l'activité générale de l'holoenzyme active la RNR; alors que la liaison du dATP inhibe l'activité de l'enzyme envers tous ses substrats.

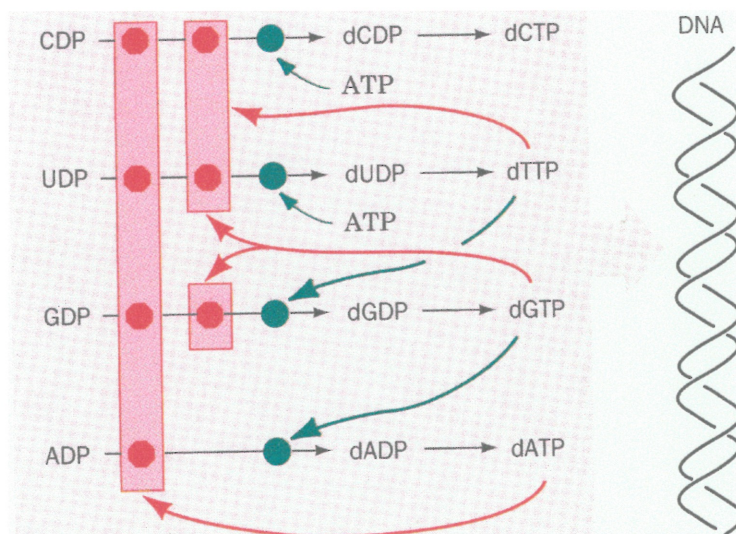


Figure 4 Le contrôle de la régulation de la synthèse des dNTPs dans la RNR des mammifères.

Les flèches et cercles verts indiquent une activation, alors que les octogones et flèches rouges indiquent une inhibition de l'activité enzymatique. (Figure tirée de Thelander et Reichard, 1979)

Au site de spécificité au substrat, la liaison de l'ATP ou du dATP stimule la réduction du CDP et du UDP; alors que la liaison du dTTP stimule la réduction du GTP mais inhibe la réduction du CDP et du UDP, et la liaison du dGTP stimule la réduction de l'ATP en dATP inhibant ainsi l'activité générale de l'holoenzyme (fin de la boucle de rétroaction).

L'activité réductase est fortement régulée à travers le cycle cellulaire, principalement par la régulation transcriptionnelle et par la stabilité des deux sous-unités protéiques dans le temps. L'holoenzyme n'est active que lors de la phase S (Björklund et *al*, 1990). Alors que l'on retrouve la protéine R1 à travers tout le cycle, la protéine R2 a une demi-vie de seulement quelques heures ; on ne la détecte que durant la phase S (Eriksson et *al*, 1984). C'est donc la R2 qui est limitante pour l'activité de l'holoenzyme (Engstrom et Rozell, 1988).

1.2.3 Conséquences d'un déséquilibre des réserves de dNTPs

Une balance équilibrée des réserves de dNTPs est critique pour le maintien de la stabilité génétique *in vivo* (Lei et *al*, 1998). Les quatre types de dNTPs ne sont pas seulement les précurseurs de l'ADN, mais sont également étroitement liés à la mutagenèse. Plusieurs événements peuvent survenir et entraîner un déséquilibre des réserves de dNTPs. Il peut s'agir soit de l'inactivation d'un des gènes contrôlant une étape dans le catabolisme ou la synthèse des précurseurs de l'ADN ; soit d'un traitement par une drogue qui inhibe une enzyme requise pour la biosynthèse des dNTPs (e.g. hydroxyurée inhibant la RNR) ou la production de folates réduits ; ou soit d'une accumulation de bases exogènes ou de nucléosides (chez les organismes capables de les capter et les accumuler).

Un déséquilibre des réserves de dNTPs peut provoquer toute sorte de désordres génétiques tels la mort cellulaire, des mutations, de la recombinaison, des

réarrangements chromosomiques (bris ou perte de chromosomes) et même la transformation cellulaire. Les conséquences d'un déséquilibre des réserves de dNTPs sont très bien documentées dans la littérature. On sait par exemple qu'une augmentation des quantités de dTTP dans les cellules d'ovaire de hamster chinois peut provoquer de la mutagenèse (Goncalves et *al*, 1984) et des dommages chromosomiques (Anderson et *al*, 1981). Diverses études supportent l'idée que des déséquilibres dans les réserves de dNTPs pourraient induire des points de mutations *in vivo* en promouvant l'incorporation de mauvais nucléotides durant la réplication de l'ADN (Mendelman et *al*, 1990) lors d'une inhibition de la capacité de « proofreading » ou lors d'une augmentation de la polymérisation.

Des lésions dans des gènes requis pour la synthèse des dNTPs (tels la CTP synthase, la dCMP desaminase, la RNR, la dCMP hydroxyméthylase et la dUTPase) peut conférer un phénotype mutateur. La conception du cancer comme un phénotype mutateur est basé sur la rareté des mutations dans les cellules normales et leurs hautes fréquences dans les cellules malignes. L'hypothèse du phénotype mutateur postule que le taux de mutation dans les stades précoces du développement d'une tumeur doit être significativement plus élevé que chez les cellules somatiques normales (Loeb et Loeb, 1999). L'hypothèse du phénotype mutateur propose que l'instabilité intrinsèque de cellules cancéreuses mène à la production d'un groupe de mutations lesquelles confèrent un avantage sélectif, permettant à ces cellules de croître sous des conditions difficiles.

1.3 Tumorigénèse et ribonucléotide réductase

Notre groupe s'est intéressé particulièrement à la RNR, car des études antérieures avait montré un lien entre une augmentation de l'activité de la RNR et l'état néoplasique des cellules (Gordon et *al*, 1970) (Weber, 1983). Une étude approfondie de l'implication dans la tumorigénèse des deux sous-unités qui compose la RNR nous a donc semblé importante.

Dès les années 1970, plusieurs agents anti-cancéreux basés sur l'inhibition de l'activité de la RNR ont été développés et sont encore utilisés de nos jours (Brockman et *al*, 1975; Agrawal et *al*, 1977; Moore et Loo, 1984). Il était connu que les cellules tumorales se divisaient plus que les cellules en quiescence; en inhibant la RNR, on inhibait la division cellulaire. Différents groupes se sont intéressés au rôle de la RNR dans l'expression du programme néoplasique (Takeda et Weber, 1980). Des études ont suivi afin de déterminer la nature et les propriétés de la RNR chez les mammifères (Nutter et Cheng, 1984). Quelques années plus tard, l'intérêt pour la RNR est resurgi en cartographiant des « points de bris » fréquents sur le chromosome 11. En effet, de nombreux points de bris semblaient impliqués dans des translocations menant à un grand nombre de cancers (Burnett et *al*, 1993; Gu et *al*, 1994). Il s'est avéré qu'une de ces zones sensibles, le segment 11p15.4-15.5 (Brissenden et *al.*, 1988), codait justement pour la sous-unité HuR1 de la RNR. (Kalatzis et *al*, 1993). Le gène de la HuR2 a quant à lui été localisé sur le chromosome 2p22 (Yang-Feng et *al.*, 1987).

En comparant des cellules normales et des cellules provenant de lésions pré-malignes, on s'est aperçu qu'elles exprimaient de manière différentielle la RNR. L'ARNm codant pour la HuR2 était plus abondant (de 4-30 fois plus que la normale) dans 80% des biopsies de lésions pré-malignes du sein (Jensen et *al*, 1994). Le groupe de Wright a effectué de nombreuses études sur les sous-unités composant la RNR. Dès 1996, il est rapporté que la R2 en coopération avec différents oncogènes pourrait être impliquée dans la transformation cellulaire et le potentiel de malignité (Fan et *al*, 1996). Afin de vérifier l'hypothèse qu'une surexpression de la R2 pouvait contribuer à la tumorigénèse, le groupe de Wright a surexprimé la R2 de souris dans des cellules non-transformées (NIH) seule ou avec des oncogènes tels que *H-ras* et *rac-1*. Ils ont observé qu'une surexpression de R2 en coopération avec différents oncogènes (tels *H-ras*, *rac-1*) augmentait la fréquence de transformation cellulaire et le potentiel de malignité. Par contre, lorsque surexprimée seule, la R2 ne démontrait pas d'effet (Fan et *al*, 1998). La surexpression de R2 obtenue par Wright atteignait deux fois le niveau d'expression normal de R2, or il a été observé que le niveau d'ARNm codant pour la R2 pouvait être de quatre à trente fois supérieure à la normale dans des lésions pré-malignes du sein (Jensen et *al*, 1994). Le niveau d'expression obtenu par Wright n'était peut-être pas assez élevé pour induire une augmentation du potentiel de malignité et la transformation cellulaire. La R2 pourrait également être impliquée dans la carcinogénèse par son potentiel à générer des radicaux libres, connus pour être de puissants agents mutagènes.

Le groupe de Wright a également effectué des travaux sur l'implication de la sous-unité R1 dans la tumorigénèse. Ils ont surexprimé de la R1 de souris dans plusieurs lignées cellulaires transformées. Après avoir été infectées par un virus codant pour la sous-unité R1, les cellules surexprimaient la protéine de manière constitutive. Wright et son groupe ont observé une diminution de la tumorigénicité et du potentiel de malignité de ces cellules lorsqu'injectées dans des souris syngéniques C3H/HeN. Ils ont aussi remarqué une augmentation de l'indépendance d'ancrage chez des cellules exprimant une R1 dans une orientation anti-sens. Wright suggéra que la sous-unité R1 devait contrebalancer de manière naturelle l'effet de progression tumorale due à la R2. La sous-unité R1 pourrait donc être un gène suppresseur de tumeur (Fan et *al*, 1997). Une hypothèse qui semble réfutée par le fait que bien que 75% des cancers du poumon montrent une perte d'hétérozygotie dans la région 11p15.5, région qui code justement pour la sous-unité R1 de la RNR, 12 échantillons sur 19 ne présentaient pas de mutations dans le gène codant pour la HuR1 (Pitterle et *al*, 1999). Le groupe de Pitterle n'a par contre pas vérifié les niveaux d'expression des gènes étudiés. L'implication de la sous-unité HuR1 dans la carcinogénèse reste donc à élucider.

1.4 Système d'activation transcriptionnelle par la tétracycline (Tet-On)

Le système Tet-On est un système d'activation de la transcription par la tétracycline qui permet d'obtenir de hauts niveaux d'expression d'un gène d'intérêt (ici, la HuR1 ou la HuR2), régulable par la concentration de tétracycline dans le

milieu (Gossen et Bujard, 1992). Ce système nous permet de contrôler le niveau d'induction ainsi que le moment de l'induction de l'expression du gène d'intérêt. Le système Tet est basé sur le contrôle de la transcription de l'opéron codant pour les gènes de résistance à la tétracycline du transposon Tn10 chez *E. coli*. Dans le système Tet-On, quelques paires de bases ont été mutées dans l'opéron, ce qui a pour effet de réguler de manière positive par la présence d'un activateur Tet. En présence de tétracycline, ce dernier va se lier aux séquences de l'élément de réponse à la tétracycline (TRE : « Tetracycline Response Element ») (Tovar et Hillen, 1989) permettant ainsi l'activation de la transcription (Gossen et *al.* 1995). (voir figure 5)

Le système Tet-On nécessite l'utilisation de lignées cellulaires qui expriment de manière stable la protéine régulatrice rtTa ainsi que la protéine d'intérêt sous le contrôle d'un élément de réponse à la tétracycline. Dans les expériences effectuées, nous avons réalisé deux transfections consécutives de type « stable ». Le premier plasmide utilisé (pUHD172,1Néo) code pour la protéine rtTa (rtTa : « reverse tetracycline Trans-Activator »), une protéine de fusion composée du transactivateur contrôlé par la tétracycline, de l'activateur Tet modifié (rTetR) et du domaine d'activation de la protéine VP16 du virus Herpes simplex. Le second plasmide utilisé code pour le gène d'intérêt (HuR1 ou HuR2) sous le contrôle de l'élément de réponse à la tétracycline (TRE).

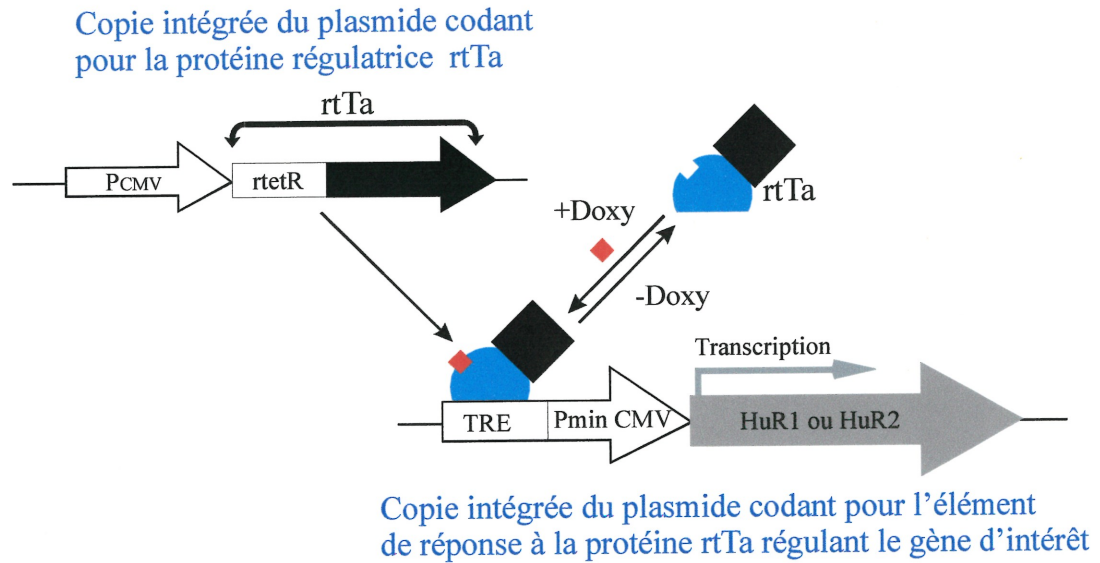


Figure 5 Le système d'activation transcriptionnelle par la tétracycline (Tet-On). La doxy lorsque présente dans le milieu se lie à la protéine activatrice (rtTa) lui permettant de se lier à l'élément de réponse à la tétracycline (TRE) et d'induire la transcription du gène d'intérêt. Figure basée sur le manuel d'utilisation "Tet-On gene expression systems" (Clontech)

Lors de nos expériences, nous utilisons la doxy (doxy), un analogue de la tétracycline, pour induire la transcription, car le système de régulation Tet-On y est beaucoup plus sensible.

Comme mentionné plus haut, le système Tet-On a également pour avantage de hauts niveaux d'expression régulable en fonction de la concentration de doxy dans le milieu.

1.5 Description du projet

Certaines études ayant montré un lien entre une augmentation de l'activité de la RNR et l'état néoplasique des cellules, nous croyons qu'il est essentiel de bien comprendre l'implication de cette enzyme dans la tumorigénèse. Cette augmentation est-elle une cause ou une conséquence de la transformation cellulaire ? Le groupe de Wright (Fan et *al*, 1996, 1997 et 1998) a tenté de répondre à cette question, mais leurs études sur la R2 ayant été effectuées sur des cellules de souris, nous voulions vérifier si des résultats similaires pouvaient être obtenus avec des cellules humaines. Nous avons décidé d'étudier le rôle de chacune des deux sous-unités qui forment la RNR dans la carcinogenèse mammaire.

Tout d'abord, nous décrivons les cellules qui ont servi à notre étude. Pour cette étude, nous avons opté pour des cellules humaines immortelles dérivées de tissu fibrocystique possédant les caractéristiques des cellules d'un épithélium normal (MCF-10A) et des cellules d'adénocarcinome mammaire (MDA-MB-231).

La mise au point de lignées cellulaires qui expriment de manière stable la protéine rtTa ayant été plus longue que prévue (problème d'efficacité d'étalement), nous avons entrepris des études préliminaires sur l'implication des deux sous-unités dans la tumorigénèse, dans des cellules humaines transformées d'embryon du rein facilement transfectables : les 293rtTa.

Les objectifs de mon projet étaient donc de :

1. Obtenir des lignées cellulaires du sein (MDA-MB-231 et MCF-10A) exprimant de manière stable la protéine rtTa.
2. Obtenir des lignées cellulaires 293rtTa exprimant de manière stable chacune des deux sous-unités de la RNR (HuR1 ou HuR2).
3. Vérifier l'activité et la solubilité de la protéine HuR1 recombinante.
4. Étudier les effets de différents niveaux de surexpression de la HuR1 sur la croissance cellulaire.
5. Vérifier si une surexpression de HuR1 dans des cellules transformées entraîne une diminution du potentiel de malignité.
6. Déterminer le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) une surexpression de HuR1 affecte la croissance cellulaire des cellules transformées.

2 Méthodologie

2.1 Développement de lignées cellulaire exprimant de manière stable la protéine rtTa

2.1.1 Entretien des cellules et milieu de culture

Les cellules étaient ensemencées dans des boîtes de Pétri de 100mm (Sarsted), à une densité de 1×10^6 cellules dans 10 ml de milieu « Dulbecco's minimum essential medium » (DMEM), additionné de 5% de sérum de veau fœtal certifié sans tétracycline (Clontech) ainsi que de 350 $\mu\text{g/ml}$ de Geneticine (G-418) (Life technologies) pour les 293 rtTa ou de 700 $\mu\text{g/ml}$ de G-418 pour les MDA-MB-231 rtTa. Les cellules ont été incubées à 37°C avec 5% de CO_2 et étaient repiquées tous les 3-4 jours. Lors des repiquages, les cellules étaient remises en suspension avec 1,5 ml de trypsine-EDTA (Gibco BRL).

Les 293 rtTa sont des cellules embryonnaires humaines du rein. Elles sont transformées par l'ADN d'un adénovirus de type 5. Ces cellules contiennent et expriment les régions précoces E1 et E5 du virus (Louis et *al*, 1997). Ce sont de très bonnes cellules réceptrices d'ADN lors des transfections. Les 293 rtTa ont été gracieusement fournies par le laboratoire du Dr Bernard Massie de l'Institut de recherches en biotechnologies (IRB, Montréal); ces dernières sont d'origine clonale et expriment de manière stable la protéine régulatrice rtTa. Ces cellules sont un assez bon modèle pour des études préliminaires sur le rôle de la HuR1 dans la transformation cellulaire. Par contre, étant des cellules déjà transformées, elles

ne sont pas le modèle idéal pour l'étude de l'implication de la HuR2 dans la tumorigénèse.

Les MDA-MB-231 sont des cellules humaines provenant d'adénocarcinome du sein. Il s'agit d'un bon modèle pour l'étude du rôle de la HuR1 dans la carcinogénèse mammaire. Le plasmide pUHD172-1Néo (figure 6), obtenu du laboratoire du Dr Bernard Massie (IRB, Montréal), code pour la protéine rtTa et est couplé au gène de résistance au G-418. Il a été introduit dans des MDA-MB-231 par électroporation à l'aide de l'électroporateur à ondes carrées BTX modèle T-820 (Genetronics Inc.).

Soit, dans une cuvette de 0,4 cm, nous avons mis 20 µg du plasmide pUHD172-1néo linéarisé par AhdI et traité par la technique du phénol/chloroforme. Environ 4×10^6 cellules ont été ajoutées à la cuvette et mélangées à l'ADN. Une pulsation d'un voltage de 140 V et d'une durée de 70 msec a été appliquée. Les cellules électroporées ont été rapidement resuspendues dans du milieu frais et étalées dans un Pétri de 100 mm. Un milieu contenant l'agent de sélection, soit 700 µg/ml de G-418 (Life Technologies), a été ajouté 48h après l'électroporation.

Deux semaines après l'électroporation, les colonies qui sont apparues ont été clonées par dilution-limite dans des plaques de 96 puits. Les clones ont ensuite été testés afin de détecter l'expression de la protéine rtTa, ainsi que l'étanchéité du système Tet-On.

2.1.1.1 Obtention des clones MDA-MB-231 rtTa

Nous avons testé l'expression de la protéine régulatrice rtTa à l'aide d'adénovirus contenant le gène de la protéine GFP (« Green Fluorescent Protein ») sous le contrôle d'un promoteur contenant un TRE (ce vecteur a été construit par le laboratoire du Dr Bernard Massie (IRB, Montréal)).

Nous avons utilisé des HeLa rtTa comme contrôles positifs dans ce test. Pour chacun des clones, nous avonsensemencé deux puits dans des plaques de six puits à une densité de 4×10^4 cellules/puits dans 3 ml de milieu DMEM additionnée de 5% de sérum certifié sans tétracycline et de 700 $\mu\text{g/ml}$ de G-418. Le milieu a été aspiré 24h après ensemencement, et remplacé par 500 μL d'une suspension virale composée du même milieu mais contenant l'adénovirus Ad-TR5-GFP à une multiplicité d'infection (MOI) de 100 PFU/cellule. De plus, 3 $\mu\text{g/ml}$ de doxy ont été ajoutés à un des deux puits de chacun des clones. Les plaques ont été incubées 18h sur une balancette (Bellco Biotechnology) à 37°C. À la fin de la période d'incubation, 3 ml de milieu respectivement avec ou sans doxy ont été ajouté à chaque puits. Les plaques ont été réincubées à 37°C pour une période de 48h. Les résultats ont été obtenus en observant directement les pétri à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence (Axioskop MC100 de Zeiss).

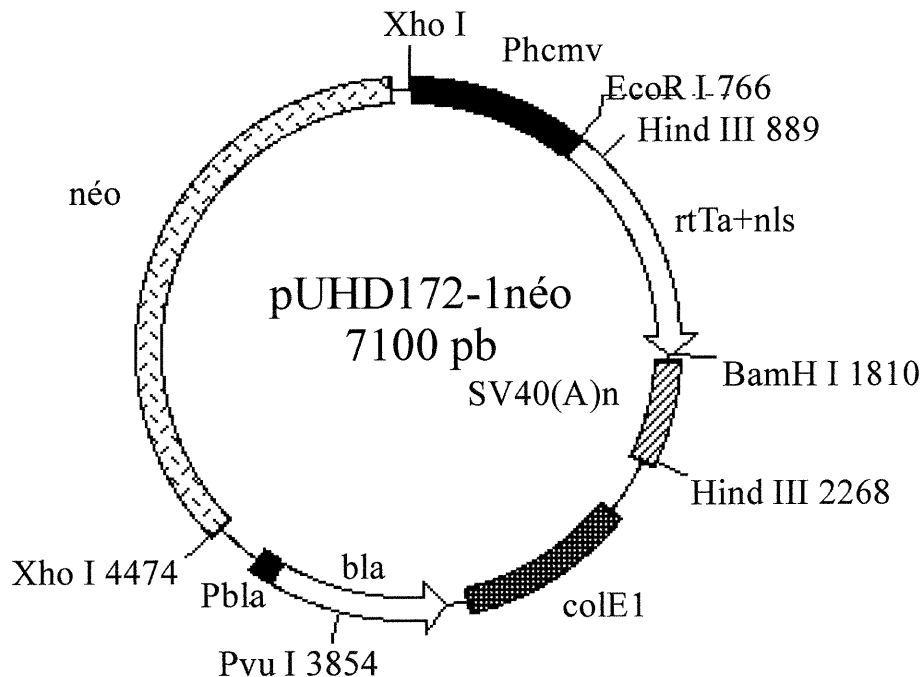


Figure 6 Plasmide pUHD172-1néo

Le plasmide est composé de quatre grands fragments :

- 1- les séquences provenant de pBR322 incluant l'origine de réplication colE1 et le gène de résistance β -lactamase avec le $P_{bla/p3}$ du Tn2661 (site HincII et site PstI enlevés);
- 2- la région de régulation avec un promoteur/enhancer hCMV (position -675 - +75; Boshart et al. (1985));
- 3- le gène rtTa composé par la fusion rTetR-VP16 précédé par une séquence de Kozak et une séquence de localisation nucléaire provenant de la protéine de l'adénovirus E1A, ainsi que de la fusion rTetR-VP16 suivie du signal de polyadénylation de SV40; et
- 4- un marqueur de sélection néomycine composé d'un fragment Xho I de 2,8 Kb provenant de pSV2neo.

Carte plasmidique basée sur celle de Gossen et *al.*1995.

2.2 Construction des vecteurs

2.2.1 Vecteur utilisé : pAdTR5F-K7-GFP_Q

Le plasmide utilisé lors de cette étude contient deux cassettes. (figure 7). La première cassette contient le gène d'intérêt (HuR1 ou HuR2) sous le contrôle d'un promoteur qui contient un TRE alors que la seconde cassette exprime la protéine GFP_Q sous le contrôle d'un promoteur CMV. La GFP_Q est la protéine fluorescente verte provenant de la méduse *Aequorea victoria* dont quelques acides aminés ont été modifiés afin d'augmenter la fluorescence (Quantum). Le vecteur a été linéarisé au site FseI afin de faciliter son intégration de manière stable dans le génome.

Ce système nous a permis de sélectionner les cellules ayant intégré le plasmide grâce à l'expression constitutive de la GFP_Q, alors que l'expression de la HuR1 ou de la HuR2 n'était pas induite. Le gène d'intérêt et la GFP_Q étant porté sur la même construction, l'expression de GFP_Q est fortement associée à l'expression potentielle de notre gène d'intérêt, c'est à dire que plus il y a de protéines GFP_Q produites, plus il y a de chance que notre gène d'intérêt soit fortement exprimé également lorsque induit par la doxy. Plus le nombre de copies intégrées est élevé, plus l'expression des protéines est forte.

2.2.2 Construction pAdTR5F-K7-HuR1-GFP_Q et pAdTR5F-K7-HuR2-GFP_Q

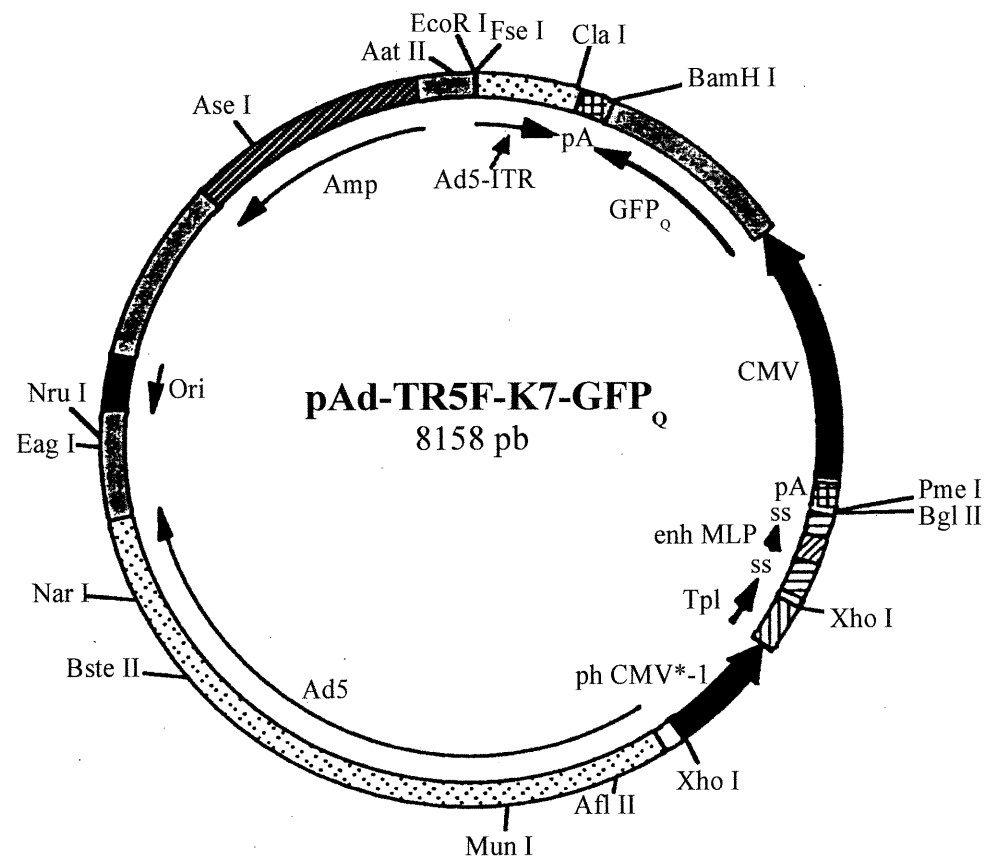
L'insert codant pour la HuR1 (Pavloff et *al.*1992) a été obtenu par digestion du vecteur pJVETZ-HuR1 par NheI, alors que le vecteur pAdTR5F-K7-GFP_Q a été

linéarisé grâce à Pme I (figure 8). Après avoir comblé les extrémités du fragment HuR1 afin de créer des extrémités à bouts francs, nous avons effectué la ligation, à 15°C pendant 24h. Après transformation de bactéries DH5 α avec la ligation, nous avons repiqué les colonies obtenues afin de vérifier lesquelles exprimaient la construction. Nous avons récupéré le plasmide grâce au kit de maxiprep (Quiagen); puis fait séquencer la construction obtenue dans la région 5'-NH₃, afin de vérifier que notre gène HuR1 n'était pas tronqué. Aucune modification de bases n'a été notée.

L'insert codant pour la HuR2 a été obtenu par digestion du vecteur pJVETZ-HuR2 par BamHI (Pavloff et *al*, 1992). Le fragment a été récupéré et purifié par GeneClean (BIO101 Inc.). Quant au vecteur pAdTR5F-K7-GFP_Q, il a été linéarisé par Bgl II. La ligation des extrémités cohésives a été effectuée à 16°C durant 1h. Le reste de la procédure était similaire à la construction du vecteur pAdTR5F-K7-HuR1-GFP_Q.

2.3 Établissement de lignées cellulaires qui expriment de manière stable la HuR1 ou la HuR2

Pour notre étude préliminaire de l'implication de la RNR humaine dans la carcinogenèse, nous avons utilisé principalement des cellules facilement transfectables : les 293 rtTa. Les gènes codant pour chacune des deux sous-unités de la RNR (HuR1 ou HuR2) y ont été introduit de manière à être exprimés de façon stable.



Ad-ITR (0,1) : 14-347 pb

pA (signal Poly-A de la globine de lapin) : 494-393 pb

GFP_Q (Quantum) : 1231-512 pb

CMV (promoteur) : 2192-1232 pb

pA (signal Poly-A de la globine de lapin) : 2300-2199 pb

Enh MLP : 2497-2397 pb

Tpl (Adeno Tripartite leader) : 2838-2634 pb

Ph CMV*-1 : 3282-5837 pb

Ad5 (9.4-15.5) : 3353-5837 pb

Amp (β -Lactamase) : 7952-7093 pb

ss (« splicing site » site d'épissage)

Figure 7 Vecteur pAd-TR5F-K7-GFP_Q utilisé lors des constructions HuR1 et HuR2.

Ce vecteur de 8158pb contient deux cassettes :

1- Casette sous le contrôle d'un promoteur contenant un élément de réponse à la tétracycline, contenant les sites d'insertion (Pme I ou Bgl II) où le gène d'intérêt va être insérer (séquence acceptrice).

2- Casette codant pour la protéine GFP_Q sous le contrôle d'un promoteur CVM.

Le vecteur a été linéarisé pour faciliter l'intégration stable lors de la transfection au site FseI.

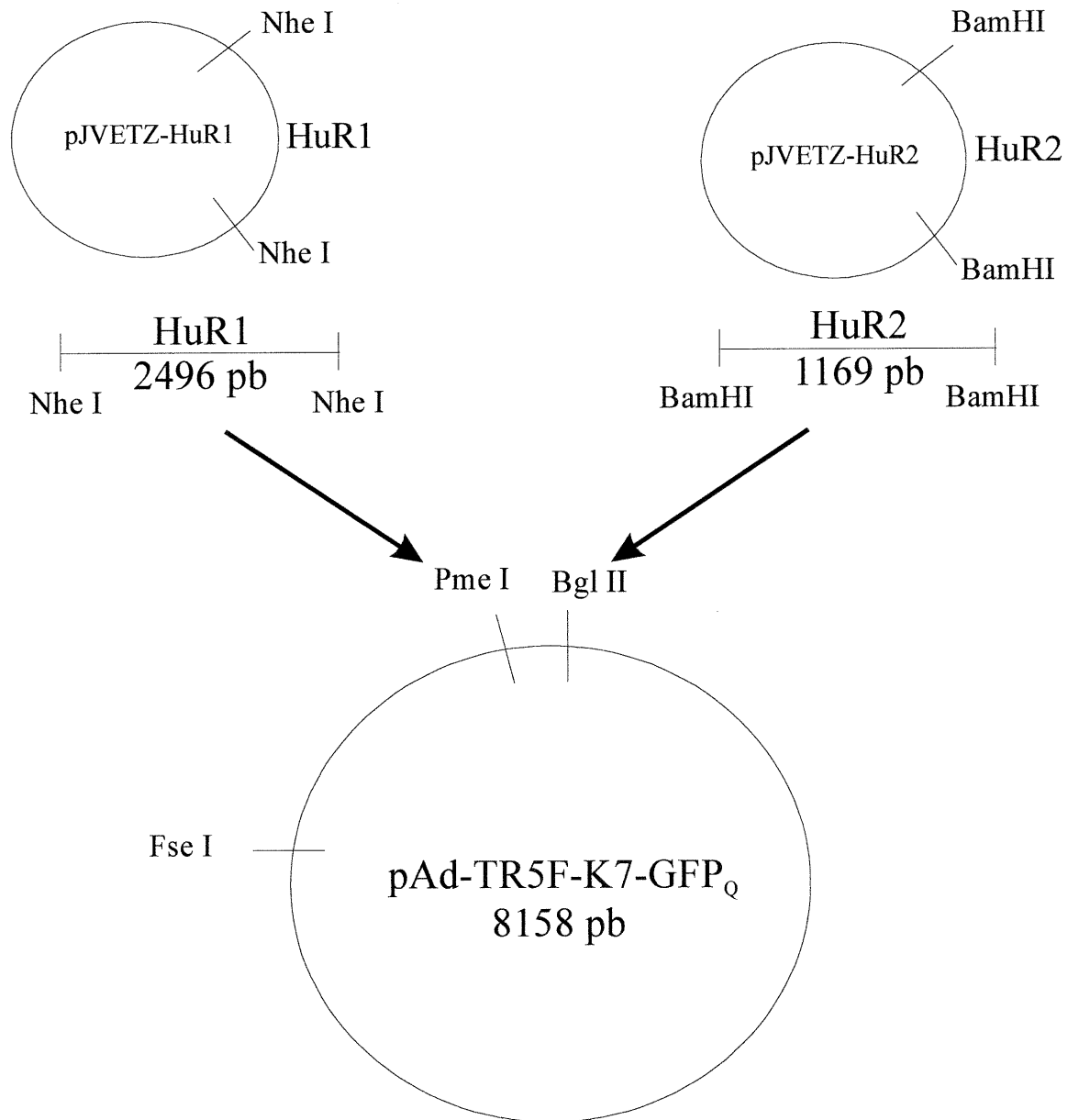


Figure 8 Construction des vecteurs pAd-TR5F-K7-HuR1-GFP_Q et pAd-TR5F-K7-HuR2-GFP_Q.

Les inserts ont été obtenus par digestion des vecteurs pJVETZ-HuR1 par Nhe I, et pJVETZ-HuR2 par BamHI. Le fragment HuR2 a été inséré directement dans le vecteur pAd-TR5F-K7-GFP_Q préalablement linéarisé par Bgl II, alors que le fragment HuR1 a dû être traité pour allonger les extrémités afin d'obtenir des extrémités franches pour insertion au site Pme I.

Nous avons tenté d'introduire le vecteur pAdTR5F-K7-HuR1-GFP_Q par électroporation avec le BTX modèle T820 (Genetronics Inc.). Différentes mises au point ont été effectuées afin d'optimiser l'efficacité de transfection tout en minimisant le taux de mortalité des 293 dû au choc de l'électroporation. Dans une cuvette de 4 mm, nous avons mélangé 4×10^6 cellules resuspendues à une densité de 10×10^6 cellules/ml avec 12 µg du plasmide pAD-TR5F-K7-HuR1-GFP_Q linéarisé par FseI. Les cellules ont été électroporées à 242 V par une pulsation d'une durée de 50 msec.

Les cellules électroporées sont rapidement resuspendues dans du milieu frais et étalées dans un Pétri de 100 mm. La sélection pour la protéine rtTa est effectuée en ajoutant au milieu 350 µg/ml de G-418 (Life Technologies) 48h après l'électroporation. Les cellules ayant intégré le plasmide de manière transitoire ou stable exprimeront la protéine GFP_Q. Pour obtenir des cellules exprimant de manière stable la HuR2, nous avons procédé exactement de la même manière, mais la construction introduite dans les cellules étaient le pAD-TR5F-K7-HuR2-GFP_Q.

La sélection des clones cellulaires exprimant de manière stable la HuR1 ou la HuR2 a été effectuée à l'aide d'un micromanipulateur de cellules couplé à un microscope inversé à fluorescence: le Quixell (Stoelting). Les cellules ont été sélectionnées 9 jours après la transfection, elles produisaient de la GFP_Q de manière constitutive. Ces cellules individuelles très vertes à la fluorescence ont été aspirées une par une à l'aide d'un capillaire stérile, puis déposées sur une plaque de 96 puits dans un milieu receveur. Le milieu receveur est composé de (pour 11 ml) : 4,5 ml

de milieu L-15 (Gibco BRL) additionnée de 0,5 ml de sérum certifié sans tétracycline (Clontech), de 2 ml de milieu conditionné et de 4 ml de milieu normal (DMEM +5% sérum Tet certifié). Le milieu conditionné a été obtenu après filtration du milieu de culture de cellules 293 rtTa en phase de croissance exponentielle pour une période de 48h. Le milieu L-15 de Leibovitz a été développé pour supporté la croissance des cellules dans un environnement non-équilibré en CO₂. Ce milieu de contient pas de système tampon avec bicarbonate de sodium; il est tamponné par des phosphates et ne contient pas d'acides aminés avec des bases libres (L-arginine principalement, mais aussi L-histidine and L-cystéine). La production de métabolites qui pourraient acidifier le milieu est réduite en remplaçant le glucose par du galactose et du pyruvate de sodium.

Les différents clones repiqués ont été amplifiés sur une période de 15 jours. Le milieu fut remplacé régulièrement par un mélange de milieu frais normal et de milieu conditionné (1:1), le tout additionné de G-418 à 350 µg/ml.

2.4 Récolte des cellules et préparations des extraits protéiques

Dans des tubes de 50 ml (Sarstedt), on a récolté les milieux de culture des différentes conditions d'induction de l'expérience. Les cellules sont récoltées à l'aide de la trypsine. Les Pétris sont rincés avec du PBS froid afin de récupérer toutes les cellules. On centrifuge les cellules à 1500 rpm dans une centrifugeuse

Sorvall RT6000B réfrigérée à 4°C pour une durée de 4 min. On lave et centrifuge 2 fois au PBS froid (même centrifugeuse). Lors du dernier lavage les cellules sont transférées dans des tubes de 1,5 ml vissés. On centrifuge à 1500 rpm, 4 min, 4°C.

Les cellules sont resuspendues dans un volume précis de tampon d'extraction désiré. Trois tampons ont été utilisés lors des différentes expériences. Lors des dosages de l'activité réductase, le tampon Hepes-DTT composé d'Hepes 50 mM pH 8,1 et de DTT 2 mM a été utilisé, afin de ne pas interférer avec le dosage enzymatique. Le tampon utilisé lors de dosage d'activité des caspases était le tampon provenant du kit « apoalert caspase-3 assay » (Clontech). Ce tampon diminuait les risques d'activation des caspases après la récolte des cellules, lors de la conservation des extraits ou pendant leur manipulation (congélation / décongélation). Le tampon Tris-Urée contenant 62,5 mM de Tris et 6 M d'urée a été utilisé lors des immunobuvardages. Les différents extraits protéiques ont été dosés à l'aide du kit Biorad « DC Protein Assay ».

2.5 Électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les protéines des extraits cellulaires ont été fractionnées sur un gel SDS-PAGE 7,5% (Laemmli, 1970; Shapiro et *al*, 1967). Les protéines séparées ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C) durant 18h à 80 mA, à 4°C.

2.6 Immunobuvardage

Les membranes de nitrocellulose ont été incubées pendant 30min dans une solution de blocage « Superblock blocking buffer » dans du PBS et du TBS (Pierce) à la température de la pièce avec agitation modérée.

L'incubation terminée, on a procédé à l'immunodétection des protéines (Knecht, D.A. et Dimond R.L., 1984). On a remplacé la solution de blocage par une dilution optimale de l'anticorps (Ac) primaire (1^{aire}); cette dilution était composée de 90% de PBS-Tween 2% (BDH) et de 10% de solution de blocage Superblock (Pierce). La membrane a été incubée 1h avec agitation modérée à la température de la pièce. Pour l'Ac anti-HuR1, la dilution optimale utilisée était de 1/10 000, et pour l'Ac anti-PARP, la dilution était de 1/700.

On a effectué des lavages au PBS-Tween 2%, afin d'éliminer tout Ac 1^{aire} non-fixé de manière spécifique à la membrane. L'Ac secondaire (Ac 2^{aire}) utilisé dans tous les cas était un Ac 2^{aire} IgG anti-souris (Santa Cruz Biotechnology) couplé à la peroxydase de Raifort (HRP : « horse raidish peroxydase ») dilué 1/100 000 de la même façon que l'Ac 1^{aire}.

La membrane a ensuite été incubée avec une solution révélatrice composée du révélateur « Supersignal West Extended duration Substrate » (Pierce) dilué 1/3 dans du PBS-Tween 2%, à température pièce avec agitation modérée.

2.7 Étude de la protéine recombinante HuR1

Les cellules ont étéensemencées dans des Pétris de 100 mm à une densité de 2×10^6 cellules/Pétri avec 10 ml de milieu DMEM additionné de 5% de sérum de veau foetal certifié sans Tétracycline (Clontech). Dans le cas de l'étude de la production de HuR1 en fonction de temps post-induction, 5×10^5 cellules/Pétri ont étéensemencées pour les temps 48h et 72h.

Lors de l'induction des cellules, 3 $\mu\text{g/ml}$ de doxy ont été ajoutés, au moment de l'ensemencement ou 24h après selon l'expérience, sauf lors de l'étude de la production de HuR1 en fonction de la concentration de doxy où celle-ci variait de 0,01 à 3 $\mu\text{g/ml}$.

Les cellules étaient récoltées après 48h, excepté dans l'étude de la production de HuR1 en fonction du temps post-induction où les cellules ont été récoltées à différents intervalles variant de 6h à 72h, et lors de l'étude du clivage de PARP où elles ont été récoltées à 24h et 72h. Les extraits ont été resuspendus dans 300 μL de tampon Tris-Urée.

Afin de subir une immunodétection de la HuR1 ou de PARP, 20 μg de protéines ont été déposés sur un gel SDS-PAGE, puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Selon l'expérience, 10 μg de protéines ont été fractionnés sur un gel SDS-PAGE, puis colorés au Bleu de Coomassie.

2.8 Dosage de l'activité réductase de la HuR1 recombinante

Les cellules ont étéensemencées dans six Pétris de 150mm à une densité de 2×10^6 cellules/Pétris dans 30 ml de milieu DMEM additionné de 5% de sérum de veau fœtal certifié sans Tétracycline et de 3 $\mu\text{g/ml}$ de doxy. Les cellules ont été récoltées, culottées puis recouvertes d'un volume égal au culot de tampon d'extraction Hepes-DTT. Les différents extraits ont été centrifugés sur colonnes de Sephadex G25. Cette étape servant à éliminer certains éléments qui peuvent inhiber l'activité réductase cellulaire. La fraction obtenue de purification partielle de la protéine a été nommée S10. L'activité enzymatique spécifique de la sous-unité R1 des différentes fractions S10 a été dosée en ajoutant des quantités limitantes d'un extrait contenant de la R2 tel que décrit par Langelier et collaborateurs en 1998. L'extrait de R2 purifié au sulfate d'ammonium a été obtenu à partir de cellules 293 infectées par un adénovirus Ad-BM5-HuR2 (Massie et *al* 1995).

2.9 Courbes de croissance

Les cellules ont étéensemencées à une densité de 8×10^5 cellules/Pétri dans 16 Pétris de 60 mm en présence et en absence de doxy respectivement. La doxy (habituellement 3 $\mu\text{g/ml}$) était ajoutée selon les conditions soit au moment de l'ensemencement, soit 24h après l'ensemencement.

À différents intervalles après l'induction, trois boîtes de Pétri de chaque clone cellulaire étaient récoltées à l'aide de trypsine puis déposées dans des tubes de 15 ml (Sarstedt). Les milieux de culture étaient également conservés, afin de compter toutes les cellules. Après centrifugation, les cellules étaient resuspendues dans un volume adéquat de milieu puis comptées à l'aide d'un hématimètre.

2.10 Immunofluorescence sur lamelles

Les cellules ont étéensemencées à une densité de 1×10^5 cellules/puits avec 4 ml de milieu normal, dans deux puits d'une plaque de six puits dont chaque puits contenait trois petites lamelles traitées à la poly-L-lysine. 24h après l'ensemencement, on a ajouté à un des puits, pour chacune des lignées cellulaires, 3 $\mu\text{g/ml}$ de doxy.

Les lamelles ont été fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (7%) 48h après induction à la doxy. Pour l'immunofluorescence, les lamelles ont été perméabilisées au méthanol, puis incubées 30 min, en présence de l'anticorps anti-HuR1, dans une chambre humide. Différentes dilutions ont été utilisées soient 1/500 et 1/1000. L'Ac 2^{aire} utilisé était un anticorps secondaire IgG (H+L) anti-souris conjugué au fluorochrome Alexa Fluor™ 546 2 mg/ml dilué 1/100. (Molecular probes). Les lamelles ont été scellées au vernis puis observées sous un microscope à fluorescence.

2.11 Solubilité de la protéine recombinante HuR1

Les cellules ont étéensemencées dans deux Pétris de 100 mm à une densité de 2×10^6 cellules/Pétri avec 10 ml de milieu normal. Pour chaque type de cellules, on a ajouté à une des deux boîtes de Pétri 3 $\mu\text{g/ml}$ de doxy. Les cellules étaient récoltées après 48h puis resuspendues dans du tampon Hepes-DTT.

Après sonication, les extraits ont été ultracentrifugés durant 1h à 100 000g (29 000 rpm avec le rotor SW55Ti), à 4°C. Le surnageant recueilli fut appelé fraction « S » pour surnageant. Le culot était resuspendu dans un 300 μL de tampon Hepes-DTT puis soniqué de nouveau. La fraction obtenue fut nommée « C » pour culot.

Après avoir dosé les protéines, les différentes fractions des extraits cellulaires étaient déposées sur gels SDS-Page puis soumises à une coloration au Bleu de Coomassie et à une immunodétection de la protéine HuR1. Le pourcentage de solubilité était déterminé par calculs à partir des quantifications par densitométrie sur les taches obtenues par immunodétection.

Le calcul utilisé afin de déterminer le pourcentage de solubilité de la protéine était :

Ratio des protéines insolubles versus protéines solubles = 30 : 100
Ratio des protéines insolubles versus la quantité de protéines totales = 30 : 130
(Le ratio a été déterminé à partir des taches obtenues à l'immunodétection)

Si la quantité de protéines totales est de 100 (afin d'exprimer la solubilité en pourcentage), le ratio change à 23 : 77 (obtenu par calcul avec la règle de trois).

Le pourcentage de solubilité est donc de 77%.

2.12 Dosage enzymatique de l'activité spécifique des caspases 1, 3, 6, 8 et 9

Les différentes activités enzymatiques ont été dosées à l'aide de kits « ApoAlertTM Caspase Fluorescent Assay Kit » (Clontech). Les différents extraits cellulaires étaient mis en présence du substrat de la caspase à tester, ce dernier devenant fluorescent lorsque scindé. Les extraits cellulaires ont été obtenus à partir des clones 293rtTa, 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 induits ou non-induits par 3 µg/ml de doxy, ensemencés à 1×10^6 cellules/Pétri de 100 mm, pendant 24h, 48h et 72h. Les cellules ont été récoltées en prenant soin de toujours conserver les échantillons sur glace; puis resuspendues dans 300 µL de tampon Clontech pendant 10 min sur glace. Les échantillons ont été centrifugés à 12000 rpm à 4°C pendant 3 min. Le surnageant fut recueilli et devint l'extrait à analyser. Deux dosages d'activité spécifique des caspases ont été effectués à partir des mêmes extraits cellulaires.

2.13 Statistiques

Les pentes observées lors des différentes courbes de croissance cellulaires avec et sans induction par la doxy semblent significativement distinctes. L'écart-type associé à chacun des points de la courbe pour chacun des jours de comptes cellulaires sans doxy n'intercepte pas l'écart-type associé aux points avec induction par la doxy. Un test-T de Student a été effectué et on peut affirmer que les courbes de croissance avec et sans induction par la doxy sont significativement différentes à $p \leq 0,02$.

3 Résultats

3.1 Établissement de lignées cellulaires du sein exprimant de manière stable la protéine rtTa

3.1.1 Sélection des clones MCF-10A rtTa

Malgré plusieurs tentatives de transfections avec différentes méthodes (LIPOFECT AMINE Reagent (Gibco BRL), LIPOFECT AMINE Plus Reagent (Gibco BRL), phosphate de calcium, phosphate de calcium avec choc au glycérol, FuGENE™6 (Roche), électroporation), nous n'avons pas obtenu de clones ayant incorporé la construction pUHD172,1Néo. Les rares clones résistants au G-418 n'ont pu être amplifiés.

3.1.2 Sélection des clones MDA-MB-231 rtTa

Deux semaines après l'électroporation, nous avons cloné les cellules résistantes au G-418 par dilution-limite dans des plaques de 96 puits. Nous avons pu amplifier 36 clones différents.

Afin de détecter l'expression inductible de la protéine régulatrice rtTa dans les différents clones MDA-MB-231 résistants au G-418 ainsi que tester l'étanchéité du système Tet-on, nous avons infecté ces cellules à l'aide d'un adénovirus Ad-TR5-GFP qui codait pour la GFP sous le contrôle d'un promoteur contenant un élément de réponse à la tétracycline (TRE). Nous avons observé les plaques, 48h

après l'infection, sous un microscope inversé à fluorescence. Le tableau I résume les observations effectuées.

Tableau I *Sélection des clones MDA-MB-231 rtTa en fonction de l'expression de la GFP après induction.*

		Cellules Vertes (%) ^a	
		- ^b	+ ^c
Contrôle positif	HeLa rtTa	0	100
Clones résistants au G-418	#1-21,23-25,27-36	0	0
	#22	20-25	30-35
	#26	<2-3	>95

^a Le pourcentage de cellules vertes a été obtenu en effectuant la moyenne sur le compte de 3 champs (40X) au microscope inversé à fluorescence, 48h après infection des cellules par un l'adénovirus Ad-TR5-GFP.

^b Cellules non-induites par la doxy

^c Cellules induites par la doxy pendant 48h

La plupart des clones MDA-MB-231 résistants au G-418 ne semblaient pas exprimer la protéine régulatrice rtTa : il s'agissait de faux-positifs. Par contre, nous avons observé de la fluorescence chez les clones #22 et #26. Dans le cas du clone #22, même en absence de doxy, il y avait apparition de fluorescence verte : le système n'était donc pas étanche. L'étanchéité du système est une caractéristique très importante afin de pouvoir induire la production de notre protéine d'intérêt au moment voulu et à cet unique moment. Quant au clone #26, en absence de doxy, moins de 2-3% de cellules vertes ont été observées, alors qu'en présence de doxy, plus de 95% des cellules induisaient l'expression de la GFP.

3.2 Établissement de lignées cellulaires qui expriment de manière stable la HuR1 ou HuR2

À l'aide du Quixell (Stoelting), nous avons repiqué 24 clones 293rtTa contenant la HuR1 et 16 clones contenant la HuR2. Après une amplification d'environ 15 jours, nous avons obtenu 12 clones HuR1 et 5 clones HuR2.

Nous avons étudié la stabilité de l'insertion des gènes d'intérêt dans les différentes lignées cellulaires en observant le pourcentage de cellules vertes en fonction du temps; le gène de la GFP_Q étant un bon indicateur, car porté par le même plasmide que celui de notre gène d'intérêt (tableau II). On peut observer une rapide diminution de l'expression de la protéine GFP_Q en fonction du temps.

Dans le cadre de notre étude de l'implication de la HuR1 dans la transformation cellulaire, seulement 2 clones (293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8) ont été conservés, car eux seuls demeuraient stables après 90 jours.

Quant à l'étude du rôle de la HuR2 dans la carcinogenèse, très peu de clones ont survécu au repiquage. De plus, parmi ceux-ci, aucun n'est demeuré stable.

Tableau II Stabilité de l'insertion des gènes *HuR1* ou *HuR2* dans les 293 *rtTa*.

Clones	Cellules vertes (%) ^a			
	293 <i>rtTa</i> /R1	15 jours	60 jours	90 jours
#1		100	100	100
#2		100	100	35
#3		100	95	15
#4		100	100	85
#5		100	1	0
#6		100	1	0
#7		100	35	0
#8		100	100	100
#9		100	100	35
#10		100	90	5
#13		100	85	1
#14		100	97	95
<hr/>				
293 <i>rtTa</i> /R2				
#3		30	0	0
#4		100	35	1
#5		15	0	0

^a Pourcentage déterminé par la moyenne sur le compte du nombre de cellules exprimant la GFP_Q dans trois champs 40X au microscope inversé à fluorescence.

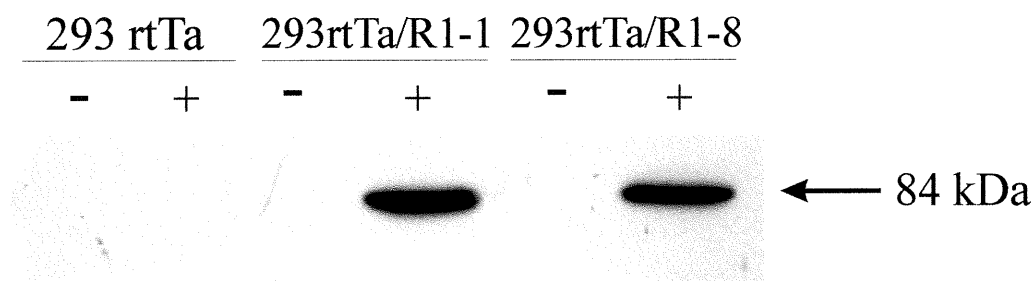


Figure 9 Induction par la doxy de la surexpression de la protéine recombinante HuR1 dans les 293 *rtTa*/R1-1 et les 293 *rtTa*/R1-8.

20 μ g de protéines ont été posés sur un gel SDS-PAGE 7,5%, puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Par la suite, l'immunodétection de la protéine HuR1 a été réalisée avec l'anticorps monoclonal anti-HuR1 (1 : 10 000). Les protéines ont été extraites de cellules induites depuis 48h avec 3 μ g/ml de doxy.

3.3 Caractérisation de la surexpression de HuR1

Lors de l'immunodétection avec un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine HuR1, nous avons observé une forte production de la protéine recombinante HuR1 d'un poids moléculaire de 84 kDa dans les extraits induits par la doxy (figure 9). Il était toutefois impossible d'estimer le niveau de surexpression, car l'expression basale (« - » sans doxy) de HuR1 n'a pu être détectée. Plusieurs essais de détection ont été effectués notamment en variant la quantité de protéines chargée sur gel, et en utilisant des extraits obtenus à partir de cellules induites par de l'hydroxy-urée (HU), mais sans résultats probants.

Nous avons, par la suite, étudié la production de la protéine HuR1 en fonction du temps post-induction. Un gel a été coloré au bleu de Coomassie (figure 10a) et un immunobuvardage a été effectué (figure 10b) sur des extraits induits avec 3µg/ml de doxy depuis 6h, 12h, 24h, 48h et 72h.

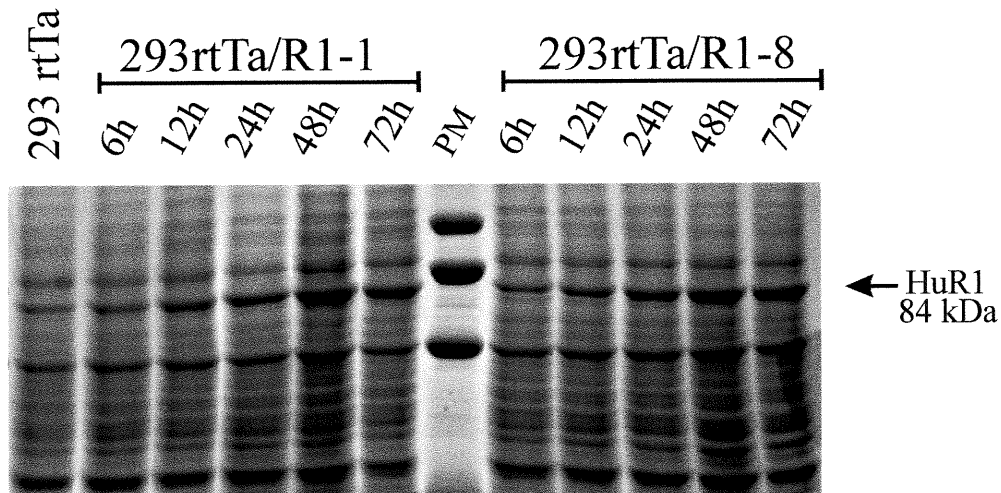
Sur le gel coloré au bleu de Coomassie, il est difficile d'observer le niveau d'expression de la protéine HuR1, car une protéine cellulaire exprimée abondamment co-migre avec elle (figure 10a). Nous pouvons toutefois observer une augmentation graduelle de la largeur de la bande située à 84 kDa. Ce phénomène est mis en évidence par l'immunobuvardage (figure 10b).

Dès 6h post-induction, il est possible de détecter une très faible surexpression de la protéine HuR1 chez le clone 293rtTa/R1-1, mais il faudra attendre 12h chez le clone 293rtTa/R1-8 pour produire une quantité équivalente. Cela suggère fortement que le niveau d'expression de la protéine HuR1 du clone 293rtTa/R1-1 est plus élevée que celui du clone 293rtTa/R1-8. La production de la protéine augmente graduellement pour atteindre un plateau à 48h chez les deux clones.

Il était également important d'étudier le niveau d'expression de la protéine en fonction de la concentration de doxy dans le milieu utilisée lors de l'induction (figure 11 et 12). Cela nous a permis par le fait même de vérifier si l'induction de la protéine recombinante HuR1 était à son maximum lors de l'induction à 3µg/ml de doxy.

On peut observer une augmentation graduelle de la production de HuR1 en fonction de la concentration de doxy dans le milieu. L'immunodétection (figure 11b) met particulièrement en évidence les variations du niveau d'expression de la HuR1. On peut observer une augmentation graduelle de la production de la protéine en fonction de la quantité de doxy utilisée lors de l'induction. La gradation du niveau d'expression de la protéine est particulièrement marquée chez le clone 293rtTa/R1-8. Une légère diminution de la quantité de HuR1 détectée est visible à une induction de 2 µg/ml. Cette diminution ne semble pourtant pas significative, car des résultats préliminaires montraient un plafonnement de la production plutôt

a Bleu de Coomassie



b Immunobuvardage

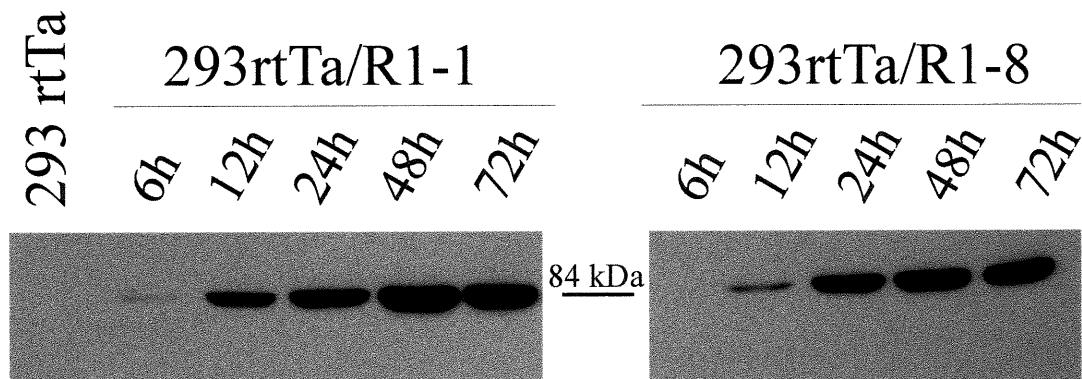


Figure 10 Production de la protéine HuR1 en fonction du temps post-induction.

20 μ g de protéines (**a**) et 10 μ g de protéines (**b**) ont été déposés sur gel SDS-Page de 7,5%. Puis respectivement coloré au Bleu de Coomassie ou transféré sur membrane de nitrocellulose. Une dilution de 1:10 000 de l'anticorps monoclonal anti-HuR1 a été utilisé lors de l'immunodétection de la protéine HuR1. Les protéines ont été extraites de cellules induites depuis 6h, 12h, 24h, 48h et 72h avec 3 μ g/ml de doxy.

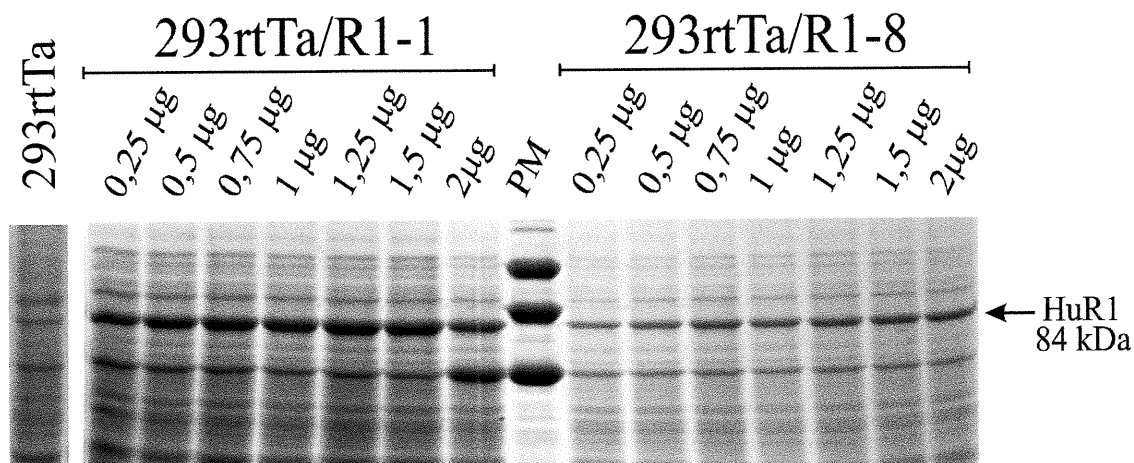
*PM désigne le marqueur de poids moléculaire

qu'une diminution de HuR1 quand on continuait d'augmenter la concentration de doxy lors de l'induction (jusqu'à 3 $\mu\text{g/ml}$ de doxy).

Il est important de noter que le clone 293rtTa/R1-1 semble produire une plus grande quantité de HuR1 pour une même concentration de doxy lors de l'induction, même après ajustement de la quantité de HuR1 produite en fonction de la quantité de protéines totales déposée dans le gel. On observe un maximum de la production de HuR1 dès 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de doxy chez les 293rtTa/R1-1 et à 1,5 $\mu\text{g/ml}$ de doxy chez les 293rtTa/R1-8.

Pour certaines des expériences subséquentes, il a été nécessaire d'évaluer la quantité de doxy nécessaire pour induire la moitié de la production maximale de HuR1. Nous avons déterminé la concentration de doxy nécessaire en nous basant sur les figures 11 et 12 où nous avons étudié la production de HuR1 en fonction de la concentration de doxy lors de l'induction (de 0 $\mu\text{g/ml}$ à 3 $\mu\text{g/ml}$). Le clone 293rtTa/R1-8 produit la moitié de la quantité maximale observée à 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de doxy. Cette dose a été retenue pour l'étude de l'impact d'une faible production de HuR1 sur la croissance des cellules.

a Bleu de Coomassie



b Immunobuvardage

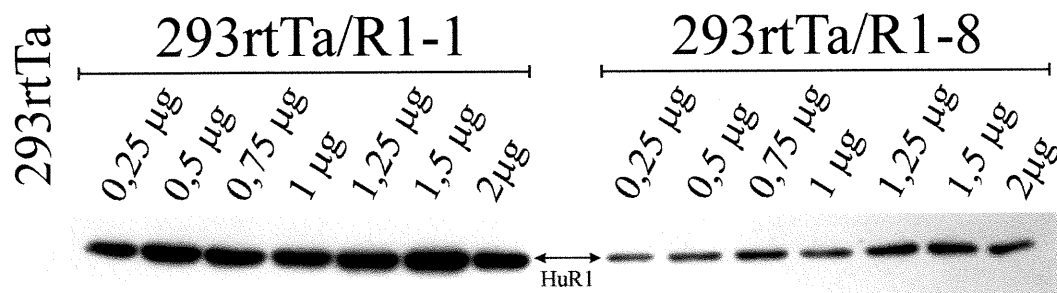
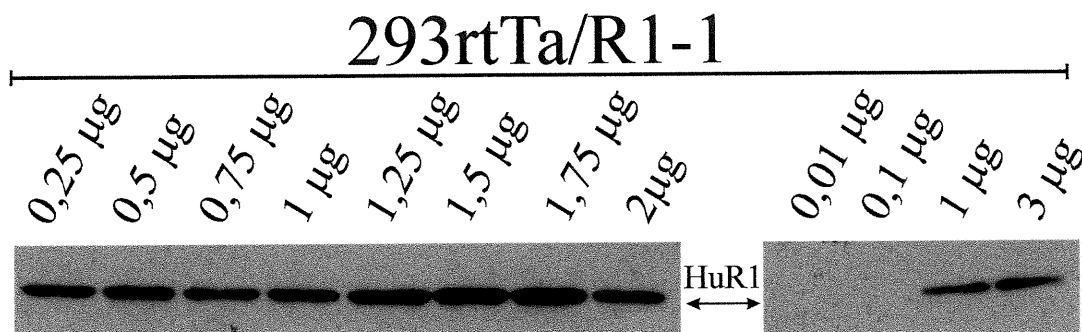


Figure 11 Production de la HuR1 en fonction de la concentration de doxy sur les cellules 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8.

20 μg (R1-1) et 10 μg de protéines (R1-8) ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 7,5%, puis colorés au Bleu de Coomassie (a) ou transférés sur membrane de nitrocellulose et soumis à l'immunodétection (b) Une dilution de 1:10 000 de l'anticorps monoclonal anti-HuR1 a été utilisé lors de l'immunobuvardage. Les protéines ont été extraites de cellules induites depuis 48h avec des concentrations de doxy variant 0,25 à 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de doxy. Le contrôle 293rtTa étant très reproductible d'une expérience à l'autre, nous l'avons omis du gel. Le contrôle que l'on observe ici provient donc d'une expérience précédente.

a 293rtTa/R1-1



b 293rtTa/R1-8

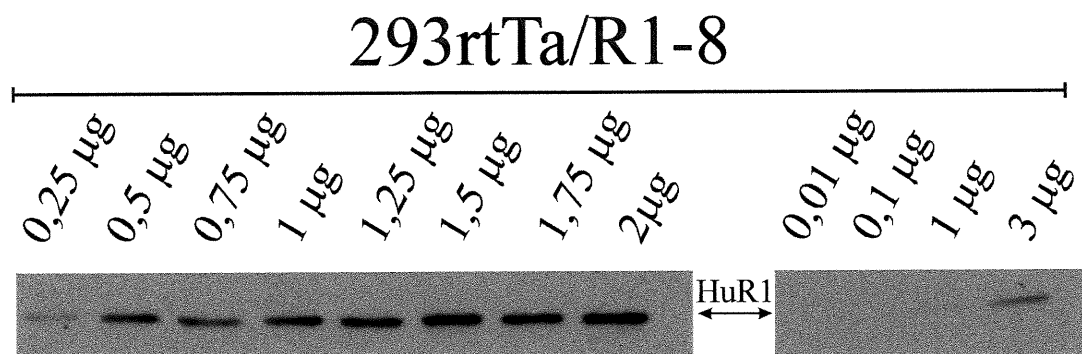


Figure 12 Production de la HuR1 en fonction de la concentration de doxy sur les cellules 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8.

10 µg de protéines ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 7,5%, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose et soumis à l'immunodétection. Une dilution de 1:10000 de l'anticorps monoclonal anti-HuR1 a été utilisé lors de l'immunobuvardage. La durée de l'exposition du film est de 1 min. Les extraits cellulaires proviennent de deux expériences indépendantes. Les protéines ont été extraites de cellules induites depuis 48h avec des concentrations de doxy variant 0,01 à 3 µg/ml de doxy (expérience #1) et de 0,25 à 2 µg/ml de doxy (expérience #2).

3.4 Dosage de l'activité réductase de la HuR1 recombinante

Lors de l'ajout de la doxy, une forte production de la protéine HuR1 recombinante a été observée. L'activité réductase de cette protéine a été dosée de manière spécifique. Il est connu que les deux sous-unités de la RNR doivent absolument interagir ensemble afin de former l'holo-enzyme active ; et que la protéine HuR2 est limitante de par sa durée de vie. Afin de doser la HuR1 recombinante, nous avons ajouté des quantités croissantes de HuR2 de manière à s'assurer que la HuR2 était en excès. La HuR2 utilisée lors du dosage de l'activité réductase a été produite à partir d'un adénovirus construit par le laboratoire du Dr Bernard Massie (IRB, Montréal). De cette manière nous avons pu quantifier la quantité de protéine recombinante fonctionnelle qui a été produite sans pour autant l'activité *in vivo* de la RNR..

Le tableau III résume les résultats obtenus. On peut noter que l'activité de la protéine HuR1 endogène, c'est à dire chez les cellules parentales 293 rtTa, varie entre 1,2 à 1,9 nmol/h/mg selon les différents essais, soit une moyenne de 1,5 nmol/h/mg. Lors de l'induction par la doxy, il y a production de la protéine recombinante (que l'on peut observer en immunobuvardage à la figure 9). Selon le dosage de l'activité réductase, la protéine HuR1 produite lors de cette induction est biologiquement active. L'activité spécifique de la HuR1 produite par le clone 293rtTa/R1-1 est de 290,0 nmol/h/mg (193 fois le niveau d'activité des cellules

parentales), et dans le cas du clone 293rtTa/R1-8, l'activité s'élève à 63,5 nmol/h/mg (42 fois le niveau d'activité des cellules parentales).

Par immunodétection à l'aide de l'anticorps anti-HuR1, il nous était impossible de détecter la HuR1 endogène et donc impossible d'estimer la surexpression engendrée lors de l'induction par la doxy. Grâce aux dosages enzymatiques de la sous-unité HuR1, nous avons pu comparer et estimer la surexpression. Dans le cas du clone 293rtTa/R1-1, l'activité est près de 200 fois plus élevée que l'activité notée chez les cellules parentales. Dans le cas du clone 293rtTa/R1-8, l'activité est environ 40 fois plus élevée.

Tableau III *Activité réductase de la HuR1 (endogène et recombinante), et*

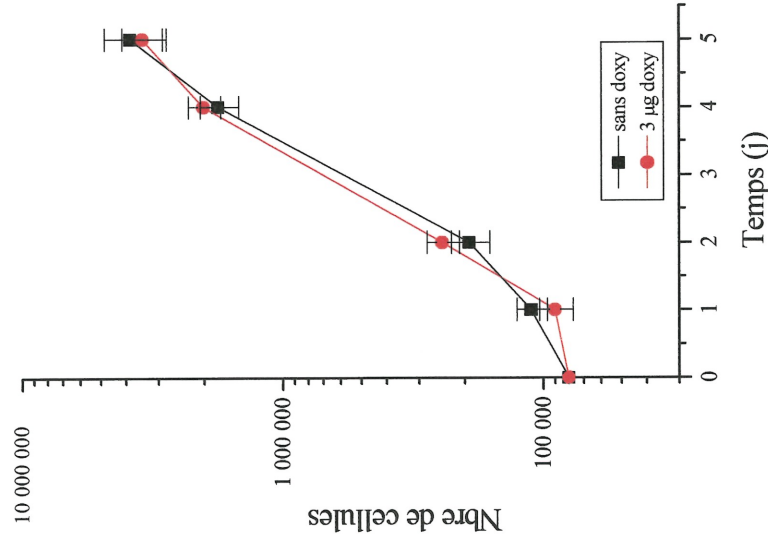
Extraits	Activité réductase (nmol.h.mg)	Surexpression de HuR1 (Nbre de fois)
293rtTa HuR1 endogène	1,5	
HuR1-1 après induction	290,0	193
HuR1-8 après induction	63,5	42

estimation de la surexpression de HuR1 recombinante.

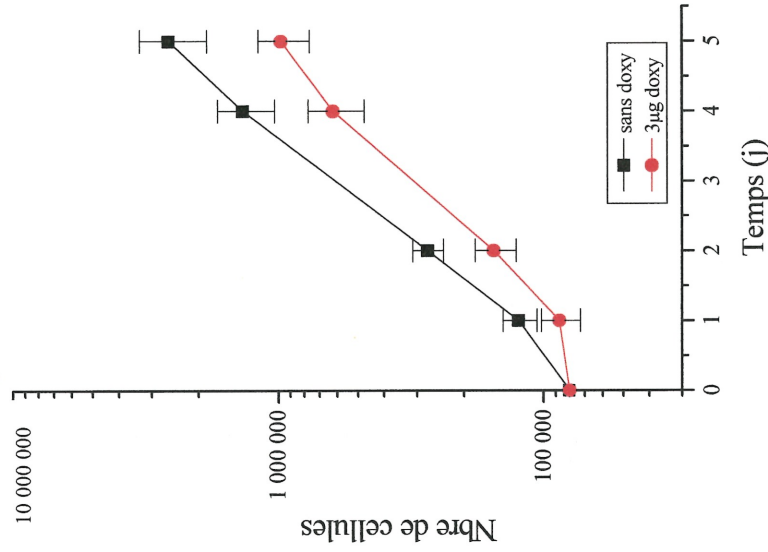
3.5 Effet de la surexpression de la HuR1 sur la croissance cellulaire

Dans une première série d'expériences, l'effet de la surexpression a été étudié en ajoutant de la doxy au moment de l'ensemencement des cellules. Les courbes de croissance obtenues sont présentées à la figure 13.

293rtTa



293rtTa/R1-1



293rtTa/R1-8

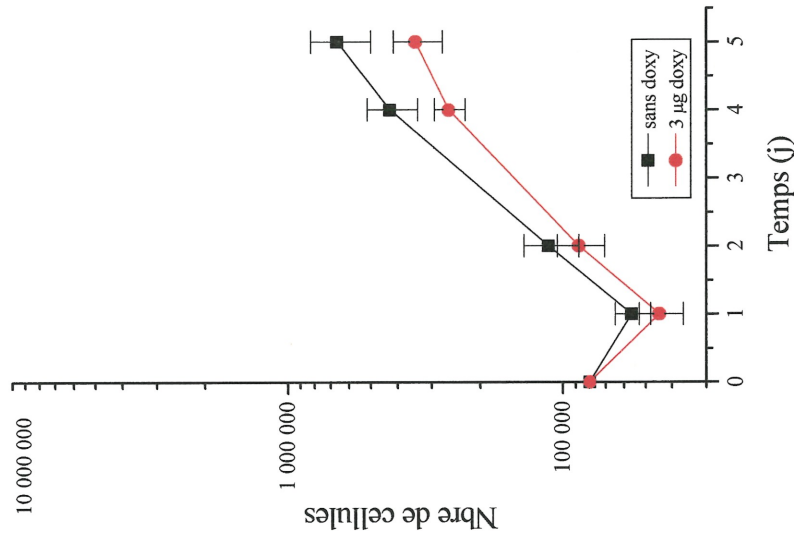


Figure 13 Effet de la surexpression de HuR1 sur la croissance des cellules.

La ligne noire (carrés) représente la croissance des cellules en absence de doxy; alors que la ligne rouge (cercles) représente la croissance en présence de 3 µg/mL de doxy. On peut observer une légère diminution de la croissance cellulaire, lors de l'induction par la doxy, qui s'accroît chez les clones surexprimant la HuR1. L'expérience a été effectuée en triplicata. 8×10^4 cellules/Pétris ont été ensemencées dans trois Pétris de 60mm pour chaque clone cellulaire. 3 µg/mL de doxy ont été ajoutés au moment de l'ensemencement. Les comptes cellulaires ont été effectués à l'hématimètre. Les barres d'erreur affichées représentent l'écart type. Les courbes de croissance avec et sans doxy sont significativement différentes à $p \leq 0,02$ (Test-T de Student)

Grâce aux courbes obtenues, nous avons calculé le temps de doublement (non-illustré) dans la partie linéaire de la phase de croissance cellulaire pour chacun des clones cellulaires. Le temps de doublement des cellules parentales 293rtTa était de 21,8h et celui des clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 non-induits étaient respectivement de 22,0h et 22,1h. Lors de l'induction par la doxy, le temps de doublement des clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 passaient à environ 28h (soit respectivement 27,8h et 28,1h). Le temps de doublement des cellules parentales ne semblent pas modifié par l'ajout de doxy.

On remarque une diminution de la croissance cellulaire chez tous les clones cellulaires, y compris les cellules parentales, 24h après l'induction par la doxy. La croissance semble redevenir normales ou comparables à celles des cellules parentales non-induites par la suite. Par contre, les clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 induits par la doxy conservent une croissance plus lente que les cellules non-induites ou les cellules parentales.

La doxy ne semble donc pas avoir d'effet toxique sur les cellules, sauf peut-être au moment de l'ensemencement ; la doxy ne serait donc pas la cause de la diminution de croissance des clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 induits. Lors de l'ajout de la doxy, l'expression de la protéine recombinante HuR1 est induite. Le ralentissement de la croissance observé lorsque nous ajoutions de la doxy chez les clones possédant la construction codant pour la HuR1 pourrait donc être causé par l'expression de la protéine recombinante.

Les courbes de croissance avec et sans doxy sont significativement différentes d'après un test-T de Student à $p \leq 0,02$, pour les deux clones.

Afin d'écarter l'hypothèse que la surexpression de HuR1 ou l'ajout de la doxy puisse avoir un effet sur l'accolement des cellules, nous avons tracé une courbe de croissance en attendant 24h avant l'ajout de la doxy pour que les cellules aient le temps de s'accoler et d'entrer en phase de croissance exponentielle avant que nous n'induisions l'expression de la HuR1. Cela nous a permis de vérifier que la diminution de la croissance observée n'était pas due à l'ajout de la doxy au moment de l'ensemencement, mais bien à la production de la protéine recombinante. Nous avons également éliminé le ralentissement de croissance observé au jour 1 post-induction de la figure 13.

À la figure 14, on observe une croissance semblable chez les cellules induites et non-induites avant l'induction par la doxy. Au jour 1, la doxy a été ajouté au milieu de culture, une diminution de croissance commence à être visible après 48h post-induction. Ces données suggèrent que le niveau de surexpression de la protéine HuR1 est important et qu'un seuil dans la concentration en protéines HuR1 doit être dépassé pour avoir un effet sur la croissance cellulaire. Les temps de doublement des cellules R1-1 induites et non-induites après 24h, sont les mêmes que lors de la figure 10 soit 22,0h sans induction et 27,9h après induction par la doxy. Les courbes de croissance avec et sans doxy sont significativement différentes à $p \leq 0,02$.

293rtTa/R1-1

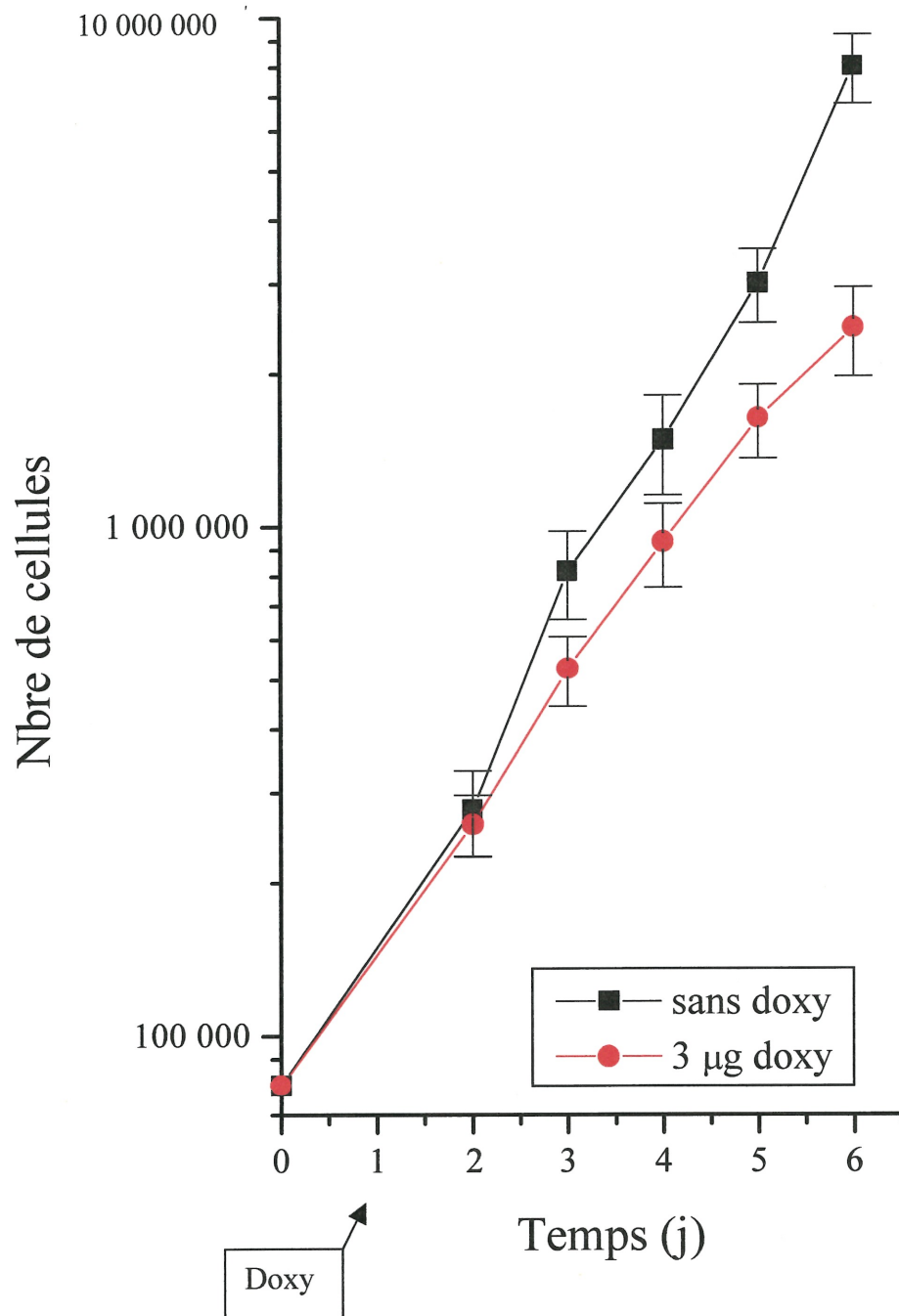


Figure 14 Effet de la surexpression de HuR1 sur la croissance des 293rtTa/R1-1 induites 24h après l'ensemencement.

La courbe noire (carrés) représente la croissance des cellules en absence de doxy; alors que la ligne rouge (cercles) représente la croissance après une induction par 3 µg/mL de doxy. Les comptes cellulaires ont été effectués à l'hématimètre. Un ralentissement de la croissance est observé dès 24h post-induction. Les barres d'erreur affichées représentent l'écart-type. Les courbes sont significativement différentes à $p \leq 0,02$ (Test-T de Student).

Le niveau de surexpression semblant être impliqué dans l'effet sur la croissance cellulaire, nous avons voulu vérifier si une faible surexpression de HuR1 avait des effets semblables à la forte surexpression obtenue lors des expériences antérieures. Nous avons donc étudié la croissance des clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 en présence de 200 ng/ml de doxy (figure 15). Cette concentration a été déterminée précédemment en estimant la quantité de doxy nécessaire pour induire une production de HuR1 représentant environ le quart de la production maximale de HuR1 chez le clone 293rtTa/R1-1 (figure 11 et 12).

À la figure 15, on peut noter que les deux clones réagissent de manière très différente. La croissance du clone 293rtTa/R1-1 en présence de 200 ng/ml de doxy semble affectée de manière intermédiaire par rapport à une induction avec 3 µg/ml de doxy. Alors que la croissance du clone 293rtTa/R1-8 ne semble pas affectée du tout par une induction à 200 ng/ml. Cela suggère qu'il existerait un seuil à partir duquel la protéine HuR1 affecterait la croissance cellulaire. Les temps de doublement sont conservés. Dans le cas des 293rtTa/R1-1, le temps de doublement est 22,1h chez les cellules non-induites, de 26,8h lors d'une induction de 200ng/ml et de 28,1h lors d'une induction à 3 µg/ml de doxy. Alors que dans le cas du clone 293rtTa/R1-8, le temps de doublement est d'environ 22h sans induction et lors d'une induction à 200 ng/ml et d'environ 28h après une induction par 3 µg de doxy. Toutes les courbes sont significativement différentes à $p \leq 0,02$ (test-T de Student) sauf la courbe du clone 293rtTa/R1-8 non-induite versus la courbe induite à 200 ng/mL.

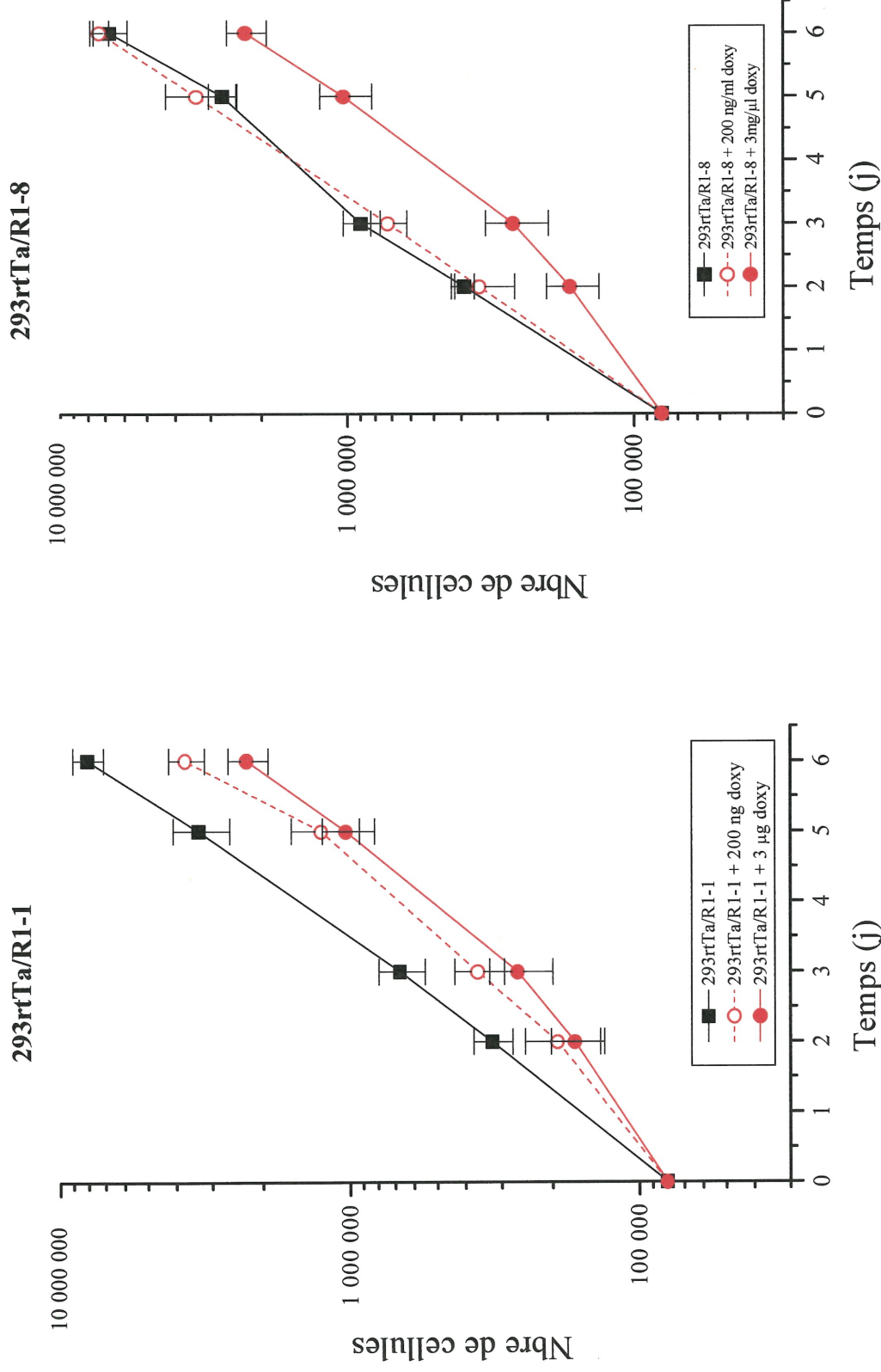
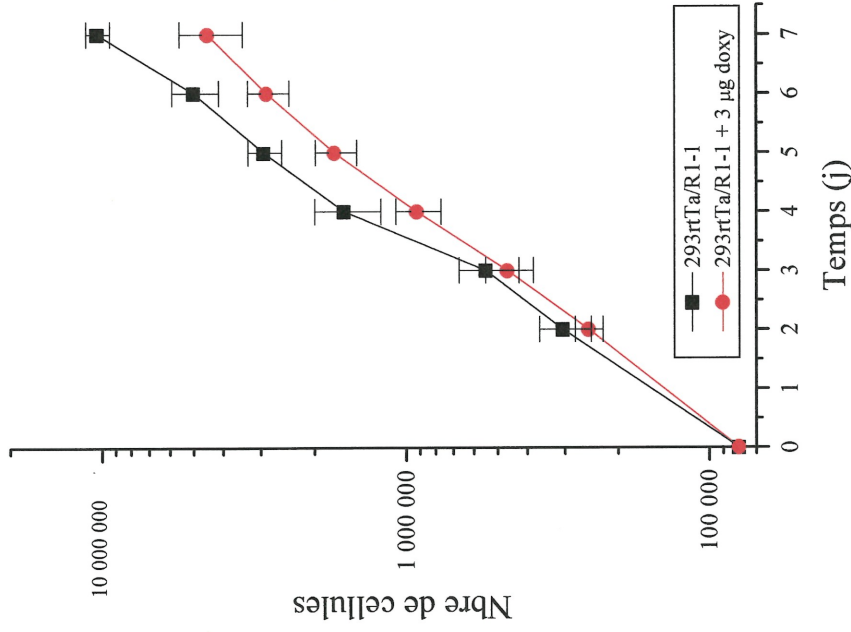


Figure 15 Effet sur la croissance des 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 d'une surexpression de HuR1 induite par 200 ng/ml et 3 µg/ml de doxy. La courbe noire (carrés) représente la croissance des cellules en absence de doxy; alors que la ligne rouge pleine (cercles pleins) représente la croissance en présence de 3 µg/mL de doxy et la ligne pointillée (cercles vides) la croissance avec 200 ng/mL de doxy. Pour chaque clone cellulaire, 8X10⁴ cellules/Pétris ont été ensemencées dans des Pétris de 60mm. Au moment de l'ensemencement, 200 ng/ml ou 3 µg/ml de doxy ont été ajoutés. Les comptes cellulaires ont été effectués à l'hématimètre. Toutes les courbes sont significativement différentes à p≤0,02 sauf la courbe du clone 293rtTa/R1-8 non-induite versus la courbe induite à 200 ng/mL.

293rtTa/R1-1



293rtTa/R1-8

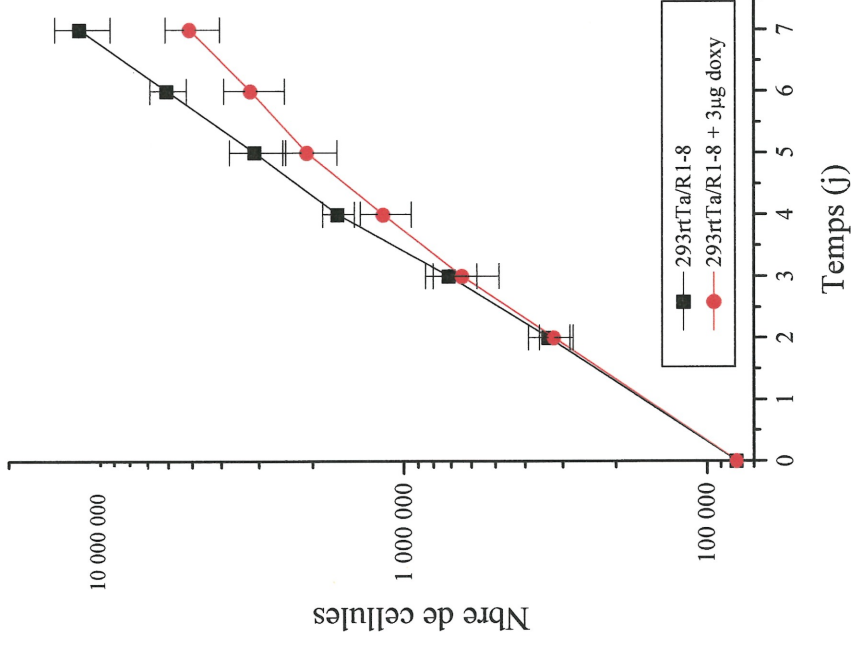


Figure 16 Croissance des clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 surexprimant la HuR1 depuis 1 semaine.

La courbe noire (carrés) représente la croissance des cellules en absence de doxy; alors que la ligne rouge (cercles) représente la croissance cellulaire en présence de 3 µg/ml de doxy. Pour chaque clone cellulaire, 8×10^4 cellules/Pétris ont été ensemencées dans des Pétris de 60mm. Au jour 1, 200 ng/ml ou 3 µg/ml de doxy ont été ajoutés. Les comptes cellulaires ont été effectués à l'hématimètre. On remarque que la surexpression de HuR1 semble avoir un effet sur la croissance cellulaire de la même manière qu'à la figure 12. Les barres d'erreur affichées représentent l'écart-type. La différence entre les droites avec et sans doxy est significative et a été déterminée par un test T de Student où $p \leq 0,01$ et $p \leq 0,02$ respectivement.

Nous avons, par la suite, voulu vérifier si après une induction sur une période de temps prolongée, les cellules s'adaptent à la surexpression de HuR1. Nous avons tracé une courbe de croissance avec des cellules 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 induites depuis une semaine (figure 16). Les cellules utilisées lors de cette expérience étaient induites depuis une semaine par 3 µg/ml de doxy, mais un milieu frais sans doxy a cependant été utilisé lors de l'ensemencement. La doxy n'a été ajoutée que 24h après l'ensemencement.

On remarque que la différence dans la vitesse de croissance n'apparaît qu'après le jour 2, comme vu lors de la figure 14. À partir du 3^{ème} jour, le ralentissement de la croissance augmente légèrement et semble un peu moins important que lors des courbes tracées à la figure 13. Les temps de doublement ne semblent pas différer grandement de la figure 13 soit 22,3h pour les cellules non-induites et 27,1h pour les cellules induites par la doxy. Ces données suggèrent l'absence d'adaptation à une surexpression de HuR1 ou une apparition d'adaptation de manière plus tardive.

3.6 Localisation et distribution de la HuR1

Nous avons voulu vérifier la localisation et la distribution de la protéine recombinante HuR1, afin de voir si celles-ci étaient affectées par rapport à la protéine endogène. Nous avons effectué une localisation par immunofluorescence de la protéine HuR1 endogène et recombinante grâce à un anticorps monoclonal anti-HuR1. Tous les contrôles pour les anticorps primaires et secondaires ont été

effectués afin de s'assurer la spécificité des anticorps. Comme on peut le voir à la figure 17, les anticorps primaires et secondaires se lient de manière très spécifique, il n'y a pas de fluorescence non-spécifique visible.

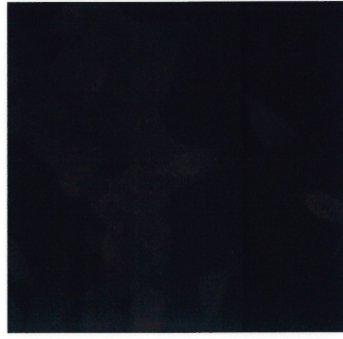
Chez les cellules parentales, que ce soit en présence ou en absence de doxy (figures 17 a et b), on note la présence diffuse de la protéine HuR1 endogène à travers le cytoplasme. Aux figures 17 d et g qui représentent les clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 en absence de doxy, la protéine est également diffuse à travers tout le cytoplasme. Par contre, lorsqu'on induit l'expression de la protéine HuR1 recombinante par la présence de doxy, chez les clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 (figures 17 e et h) on remarque l'apparition d'une grosse accumulation de protéines très fluorescentes. On peut même observer cette accumulation péri-nucléaire de HuR1 en contraste de phase (quelques amas caractéristiques sont pointés par des flèches blanches, figures 17 f et i). Notons également que moins de 2% des cellules sont très fluorescentes chez les clones non-induits alors que la proportion de cellules très fluorescentes monte à plus de 80% dans les cas des clones induits par la doxy. Il n'y a aucune cellule très fluorescente chez les cellules parentales 293rtTa. Après avoir observé la formation d'amas de protéines lors de la surexpression de HuR1 recombinante, nous avons vérifié la solubilité de la HuR1. Lors de l'immunofluorescence, les extraits obtenus à partir de cellules parentales ou des clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 non-induits par la doxy, la protéine HuR1 était répartie uniformément à travers le cytoplasme, nous laissant présager une solubilité complète de la protéine.

Figure 17 Mise en évidence de la protéine HuR1 endogène et recombinante par immunofluorescence et en contraste de phase.

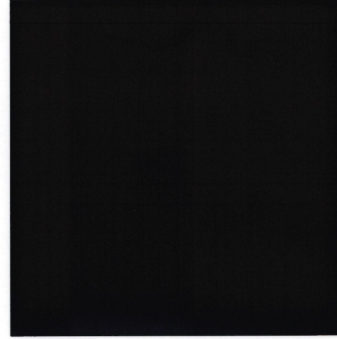
Contrôles de la spécificité des anticorps primaire anti-HuR1(1) et secondaire Alexa Fluor™ 546 (2).

Détection de la protéine HuR1 endogène chez les clones parentaux (a, b) et non-induits (d et g), et apparition d'accumulations de protéines pointés par des flèches blanches chez les clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 induit par la doxy (e et h). Visualisation des agrégats en contraste de phase (flèches blanches en f et i).

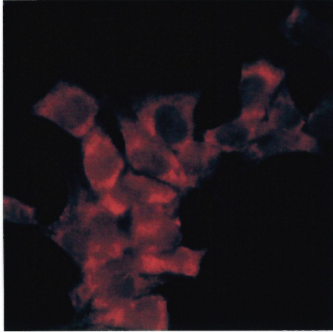
Les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde (7%) avant de subir l'immunofluorescence. L'anticorps anti-HuR1 était dilué 1/500. Et était révélé grâce à un anticorps secondaire anti-souris Alexa Fluor™ 546 (dilution 1/100).



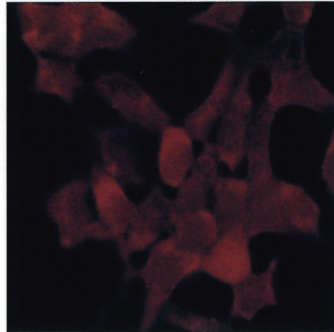
Contrôle 1 - Sans Ac anti-HuR1



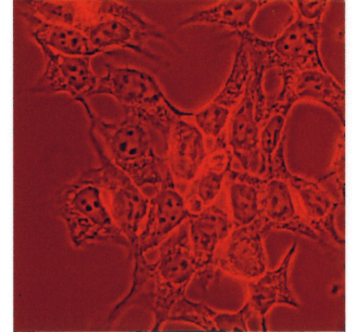
Contrôle 2 - Sans Ac 2^{aire} Alexa



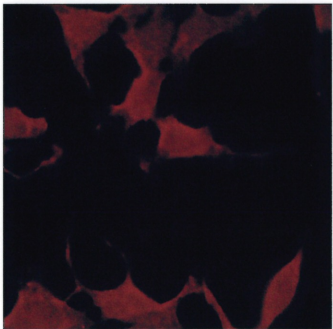
a. 293rtTa sans doxy
Fluorescence
(64X)



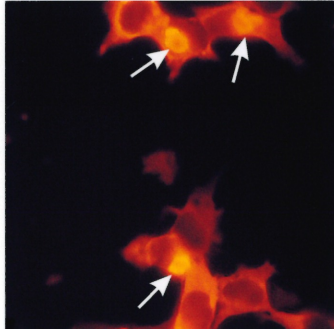
b. 293rtTa + doxy
Fluorescence
(64X)



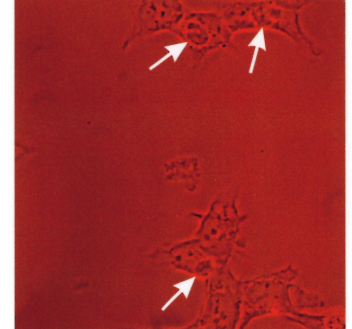
c. 293rtTa + doxy
Contraste de phase
(64X)



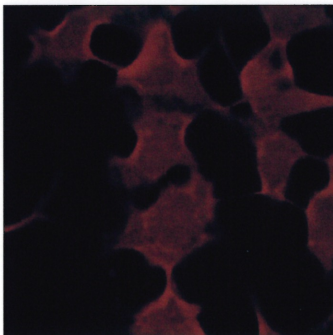
d. 293rtTa/R1-1 sans doxy
Fluorescence
(64X)



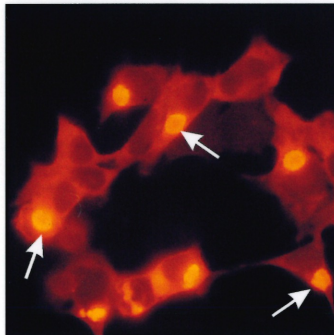
e. 293rtTa/R1-1 + doxy
Fluorescence
(64X)



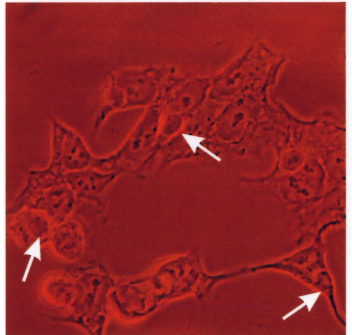
f. 293rtTa/R1-1 + doxy
Contraste de phase
(64X)



g. 293rtTa/R1-8 sans doxy
Fluorescence
(64X)



h. 293rtTa/R1-8 + doxy
Fluorescence
(64X)



i. 293rtTa/R1-8 + doxy
Contraste de phase
(64X)

3.7 Solubilité de la HuR1 recombinante

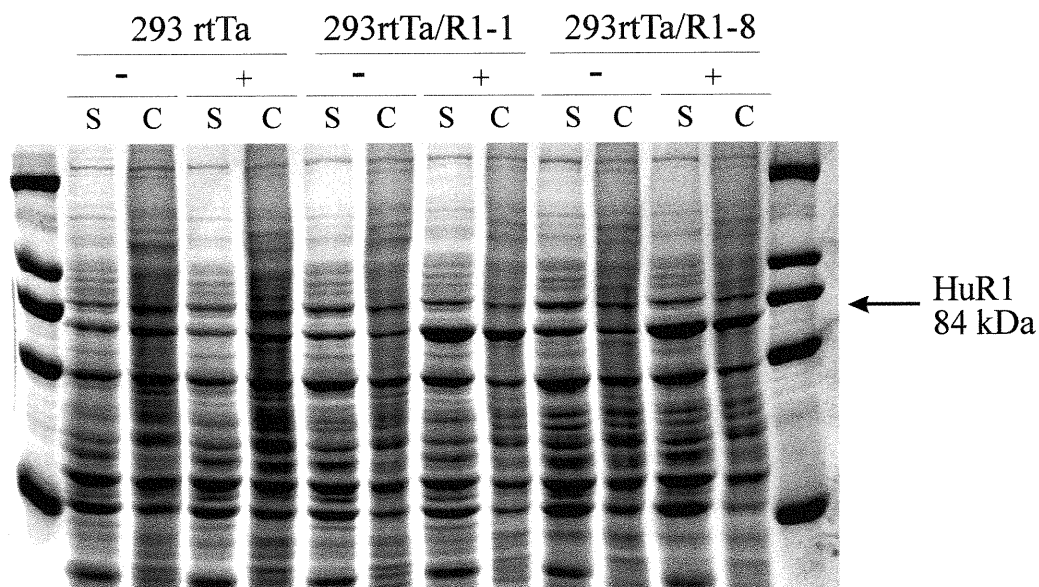
Afin de déterminer le pourcentage de solubilité, nous avons quantifié par densitométrie les tâches obtenues à partir de l'immunodétection effectuée sur les fractions Surnageant (S) et Culot (C) des clones cellulaires induits et non-induits (figure 18 b). Seuls les extraits induits par la doxy et surexprimant la protéine recombinante peuvent être quantifiés, car la HuR1 endogène ne peut être détectée par immunobuvardage. Sur le Bleu de Coomassie (figure 18 a), on peut voir que l'intensité de la bande à 84 kDa varie selon l'extrait. Il est cependant difficile d'interpréter ces bandes, car une protéine cellulaire importante semble co-migrer avec la HuR1. La HuR1 est donc mise en évidence lors de l'immunodétection (figure 18 b). Après calculs, le pourcentage de solubilité de la protéine HuR1 exprimée par les deux clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 atteint environ 65% (tableau IV).

Tableau IV *Pourcentage de solubilité de la protéine recombinante HuR1 déterminé par densitométrie.*

	Protéines solubles
	% ^a
293rtTa/R1-1 induites	64,7
293rtTa/R1-8 induites	65,7

^a Le % de solubilité provient de calculs, à partir des valeurs obtenues au densitomètre sur l'immunodétection de la protéine (figure 18 b).

a Bleu de Coomassie



b Immunobuvardage

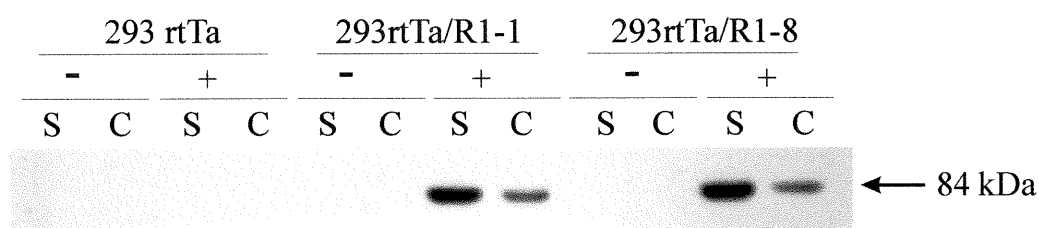


Figure 18 Solubilité de la protéine recombinante HuR1 chez les 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 induits par la doxy.

20 μ g et 10 μ g de protéines ont été déposées sur gels SDS-PAGE 7,5%, puis respectivement colorées au Bleu de Coomassie (a) ou transférées sur membrane de nitrocellulose pour subir un immunobuvardage (b). Une dilution de 1:10 000 de l'anticorps monoclonal anti-HuR1 a été utilisé lors de l'immunodétection de la protéine HuR1. Les fractions S et C proviennent d'extraits ultracentrifugés des différents clones induits et non-induits avec 3 μ g/ml de doxy pendant 48h.

3.8 Caractérisation de l'apoptose induite par la surexpression de HuR1

Ayant observé qu'un nombre assez important de cellules mouraient chez les clones induits par la doxy, nous en avons conclu qu'une surexpression de HuR1 avait un effet sur la croissance cellulaire. Nous avons voulu déterminer quel était cet effet : un blocage à un stade particulier du cycle cellulaire ou de l'apoptose? Nous avons émis l'hypothèse que l'apoptose en était la cause. Nous avons donc effectué un immunobuvardage afin de détecter un des substrats impliqués dans l'apoptose : le produit de clivage de la poly(ADP-ribose). Nous avons également mesuré l'activité de différentes caspases qui peuvent être activées lors de l'apoptose.

La poly(ADP-ribose) polymérase (« PARP ») est un substrat pour la caspase-3 un membre de la famille de protéase ICE. Lors de l'apoptose, la protéine PARP d'un poids moléculaire de 113 kDa est scindée en deux fragments de 89 kDa et 24 kDa. Par la technique d'immunobuvardage, nous avons mis en évidence la dégradation de PARP qui est fortement associée à la mort cellulaire par apoptose (figure 19).

Lors d'un immunodétection, nous avons utilisé un contrôle positif (K7 T/C) afin de mettre en évidence le clivage de PARP. Il s'agissait d'un extrait cellulaire de HeLa tTa induite avec de la cycloheximide et du TNF. Le clivage chez l'extrait

K7 T/C montre deux bandes représentant la protéine PARP non-clivée d'un poids moléculaire de 113 kDa et un des fragments de la protéine clivée d'un poids moléculaire de 89 kDa. On peut observer un faible clivage de PARP dans les extraits des clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 induits par la doxy. Quant aux extraits provenant des cellules parentales et aux cellules non-induites, il n'y a pas de clivage apparent.

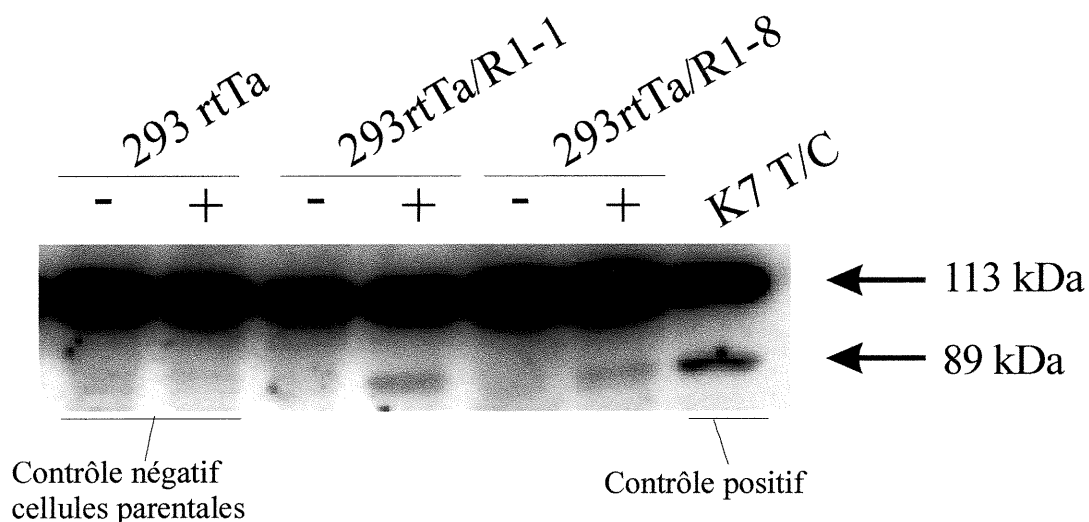


Figure 19 Clivage de la protéine PARP suite à l'induction de l'expression de la protéine HuR1.

Les protéines ont été extraites de cellules induites depuis 72h avec 3 µg/ml de doxy. 10 µg de protéines ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 7,5%, puis transférées sur membrane de nitrocellulose. Une dilution de 1:700 de l'anticorps monoclonal anti-PARP a été utilisé lors de l'immunodétection. Le puits K7 T/C est un contrôle positif pour le clivage de PARP. On peut observer un faible clivage de PARP chez les clones 293rtTa/R1-1 et R1-8 induits par la doxy.

Par la suite, nous avons tenté de déterminer la voie d'apoptose impliquée dans la mort cellulaire causée par la surexpression de la HuR1 recombinante, nous avons effectué le dosage de l'activité enzymatique de différentes caspases. Il s'agit

des caspases initiatrices 1, 6, 8, 9 et de la caspase effectrice 3. Parmi tous les essais effectués (tableau V), seule la caspase-3 semble activée; les activités spécifiques des autres caspases demeurant nulles ou non-significatives. On remarque qu'il y a des variations dans l'activité de la caspase-1 à 72h, mais celles-ci semblent non-significatives, car elles n'apparaissent que lors d'un seul dosage d'activité spécifique. La figure 19 illustre l'augmentation de l'activité enzymatique spécifique de la caspase-3 en fonction du temps post-induction. On note une augmentation de l'activité spécifique de la caspase 3 dans les extraits 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 induits par la doxy dès 48h, alors que dans les extraits provenant des cellules parentales ou non-induites, l'activité demeure indétectable ou très faible. L'activité spécifique des 293rtTa/R1-1 atteint un maximum à 79,25 nmol/min/mg après 48h, puis semble diminuer à 72h. Quant au clone 293rtTa/R1-8, son activité spécifique continue d'augmenter jusqu'à 77,32 nmol/min/mg à 72h.

Tableau V Dosage des activités spécifiques des caspases 1, 3, 6, 8 et 9.

Durée de l'induction (doxy) (h)		Doxy présente (+) ou absente (-)	Caspase 1 (60 µg) (nm/min/mg)	Caspase 3 (60 µg) (nm/min/mg)	Caspase 6,9 (60 µg) (nm/min/mg)	Caspase 8 (60 µg) (nm/min/mg)
24h	293	-	0,00	0,00	0,00	
		+	0,36	0,00	0,00	0,0000
	R1 1	-	0,00	0,96	0,00	
		+	0,00	21,01	0,00	0,0000
	R1 8	-	0,14	0,00	0,00	
		+	0,00	1,80	0,00	0,0000
48h	293	-	0,00	0,00	0,00	
		+	0,00	2,02	0,00	0,0000
	R1 1	-	0,00	0,00	0,00	
		+	0,00	79,25	0,00	0,0000
	R1 8	-	0,00	0,00	0,00	
		+	0,00	26,81	0,00	0,0000
72h	293	-	3,30	1,38	0,00	
		+	2,51	0,09	0,00	0,0000
	R1 1	-	10,12	1,98	0,00	
		+	1,52	41,40	0,00	0,0000
	R1 8	-	0,73	0,00	0,00	
		+	5,94	77,32	0,00	0,0000

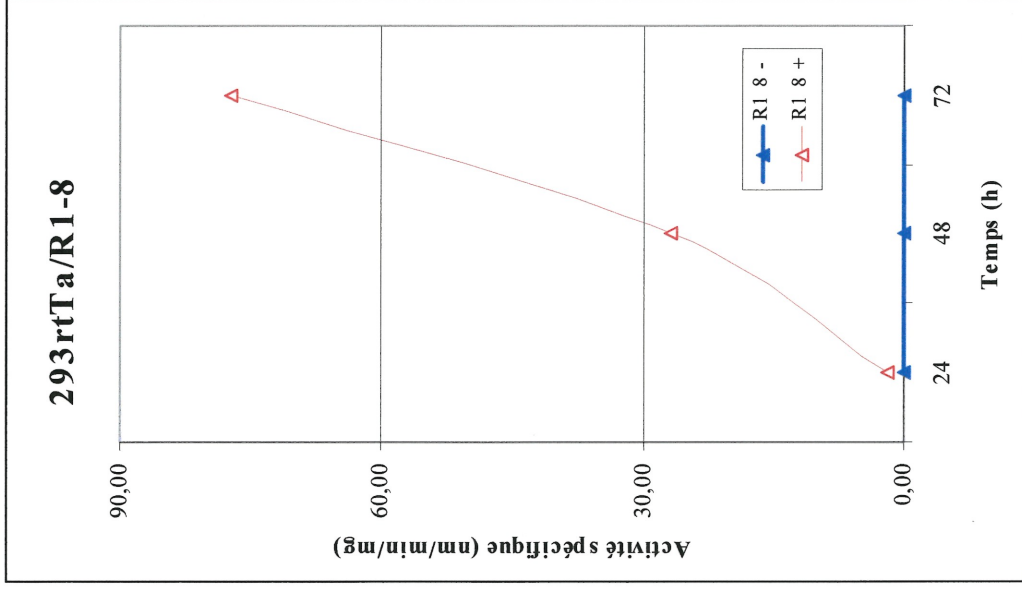
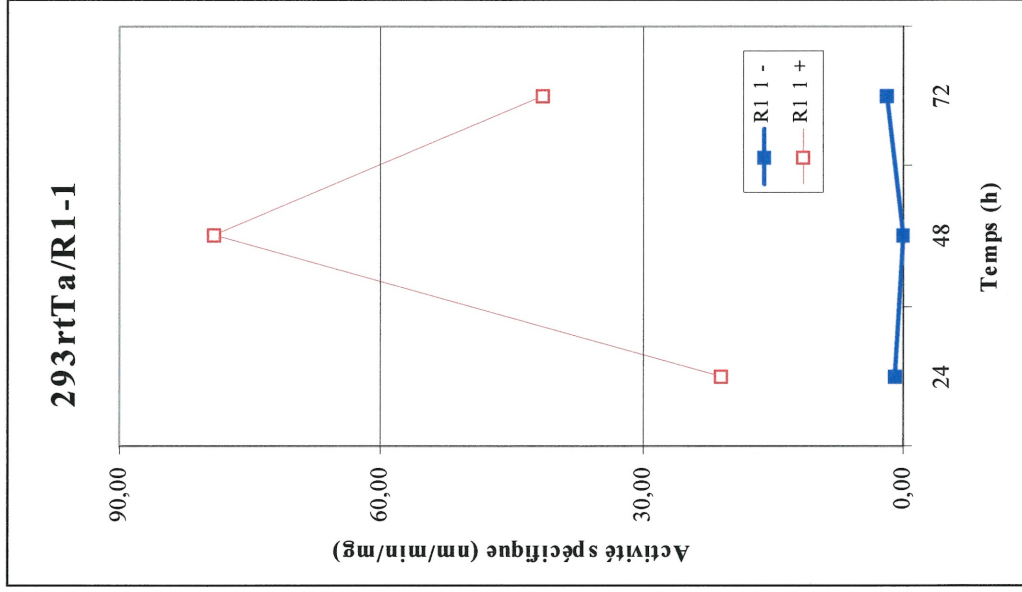
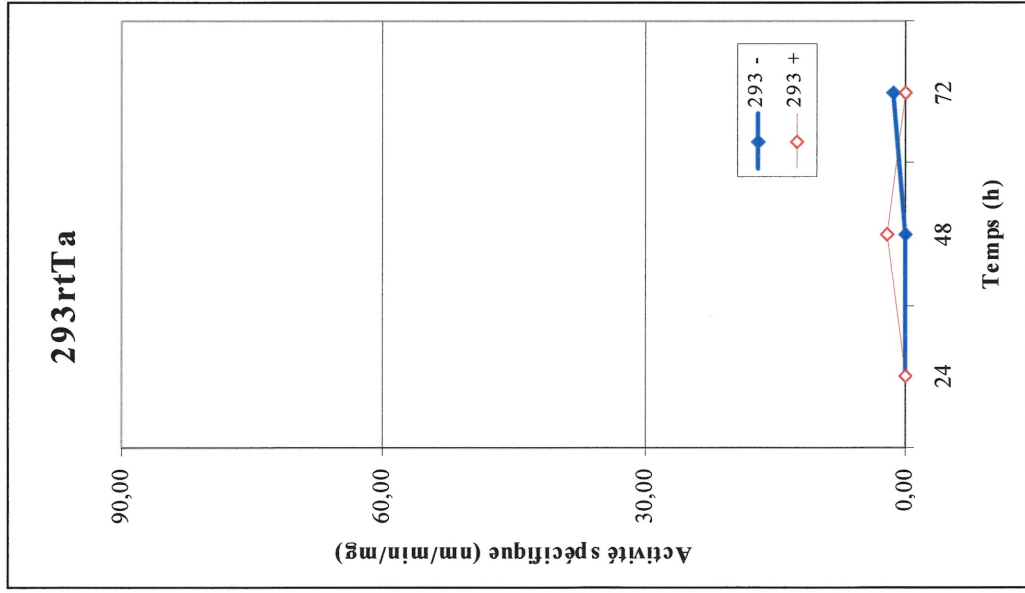


Figure 20 Activité enzymatique spécifique de la caspase-3 sur des extraits induits et non-induits pendant 24h, 48h et 72h. Les 293 rtTa, 293rtTa/R1-1 et les 293rtTa/R1-8 non-induites (courbes bleues, symboles pleins) et induites (courbes rouges, symboles ouverts) par 3 µg/mL de doxy pendant 24h, 48h et 72h. Les cellules ont été récoltées, resuspendues dans du tampon Clontech puis centrifugées à 12 000 rpm. Les extraits ont été obtenus à partir du surnageant recueilli. On observe une activité spécifique de la caspase-3 chez les clones induits 293rtTa/R1-1 et R1-8.

4 Discussion

Notre projet consistait donc en la mise au point de lignées cellulaires du sein exprimant de manière stable la protéine régulatrice rtTa, et en des études préliminaires du rôle éventuel de chacune des sous-unités composant la RNR dans la tumorigénèse.

Nous avons réussi à mettre au point une lignée cellulaire MCF-10A qui exprimait de manière stable la protéine rtTa, ainsi qu'une lignée cellulaire 293rtTa qui exprimait de manière stable la sous-unité HuR1 de la RNR.

Nous avons par la suite caractérisé la surexpression de HuR1 et étudié les effets de différents niveaux de surexpression sur la croissance cellulaire. Nous avons observé qu'une forte surexpression de HuR1 entraînait un ralentissement de la croissance cellulaire. Alors qu'une faible surexpression ne semblait pas avoir d'impact sur la croissance. Nous avons tenté de déterminer le mécanisme par lequel la sous-unité HuR1 affectait la croissance des cellules transformées. Nous avons pour cela vérifié si ce ralentissement était dû au potentiel de la protéine à induire l'apoptose en entraînant une diminution du potentiel de malignité.

Nous avons également vérifié l'activité et la solubilité de la protéine HuR1 recombinante.

4.1 Établissement de lignées cellulaires du sein exprimant de manière stable la protéine rtTa

Nous avons réussi à établir une lignée cellulaire MDA-MB-231rtTa. Sans doxy, 2-3% des cellules peuvent induire l'expression de la protéine d'intérêt, et en présence de doxy, l'expression augmente jusqu'à plus de 95% des cellules. Ces cellules servent à l'étude de l'implication de la HuR1 dans la carcinogenèse mammaire.

Quant aux cellules MCF-10A, nous ne sommes pas parvenus à isoler et amplifier de clones intéressants. Ces cellules sont difficilement transfectables, nous avons donc optimisé l'efficacité de transfection. Une autre difficulté a été rencontrée lors de l'établissement de MCF-10A exprimant de manière stable la protéine rtTa, il s'agissait de la faible efficacité d'étalement de cette lignée cellulaire. À faible confluence, elles cessaient de croître, d'où la difficulté à amplifier les rares clones résistants au G-418. Ces cellules non-transformées exprimant la protéine rtTa auraient servi de modèle idéal pour l'étude du rôle de la HuR2 dans la transformation cellulaire.

4.2 Établissement de lignées cellulaires qui expriment de manière stable la HuR1 ou la HuR2

Parallèlement à nos essais de transfections sur les cellules du sein, nous avons débuté des études préliminaires sur le rôle des deux sous-unités composant la RNR dans la carcinogénèse. Nous avons introduit les constructions pAd-TR5F-K7-HuR1-GFP_Q ou pAd-TR5F-K7-HuR2-GFP_Q dans des 293rtTa, et avons obtenu assez rapidement des clones ayant intégré la construction de manière stable.

L'expression de HuR1 (ou de HuR2) était liée à l'expression de GFP_Q, car les deux gènes étaient portés par un même plasmide. Ce plasmide double-cassette codait pour la GFP_Q et la sous-unité HuR1 bien que les deux gènes étaient sous le contrôle de promoteurs différents. Nous avons sélectionné plusieurs clones qui exprimaient fortement la GFP_Q, estimant qu'une expression de GFP_Q serait signe d'un grand nombre de copie du plasmide pAd-TR5F-K7-GFP_Q.

Avec le temps, plusieurs des clones sélectionnés tant 293rtTa/HuR1 que 293rtTa/HuR2 ont perdu graduellement, mais à des vitesses différentes, l'expression de la GFP_Q. Plusieurs raisons peuvent expliquer le phénomène. Tout d'abord, le repiquage a été effectué de manière précoce (9 jours après la transfection), ce qui est relativement tôt et a permis la sélection de cellules qui n'avaient pas intégré de manière stable la construction. La construction pouvait donc n'être exprimée que de façon transitoire, car elle se maintenait dans la cellule

sous l'état de transgène, c'est à dire qu'elle n'était pas intégrée au génome de la cellule. À chaque réplication, l'expression du transgène disparaissait donc un peu plus (Scangos et Ruddle, 1981).

Une deuxième possibilité est que la construction s'était bien intégrée, mais dans une région peu accessible à la machinerie cellulaire et aux facteurs de transcription (effet de position). On sait qu'un recrutement de certaines régions chromosomiques vers l'hétérochromatine centromérique mène à la répression de leur expression (Cremer et *al*, 2000). Il peut également y avoir eu une reconfiguration chromosomique suite à l'intégration du plasmide dans une région qui aurait induit une modification du patron naturel.

Finalement, l'état de méthylation de la chromatine a un impact très important sur l'expression des gènes (phénomène épigénétique) (Razin et Cedar, 1991). Il peut s'agir d'un phénomène stochastique d'inactivation de certaines régions chromosomiques. Les cellules vont méthyler certaines régions lors de l'absence de pression de sélection. On peut alors observer la disparition de l'expression d'une protéine sans utilité biologique (ici la GFP).

Nous avons toutefois conservé deux clones 293rtTa/HuR1 qui demeuraient stables après 90 jours et qui exprimaient fortement la GFP_Q. Ce sont les clones 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 sur lesquels toutes nos études subséquentes ont été basées. Aucun des clones 293rtTa/R2 n'est demeuré stable. Du point de vue

statistique cela semble logique, car nous avons isolé moins de clones 293rtTa/R2 (16) que de clones 293rtTa/R1-1 (24). De plus, comme les cellules 293rtTa étaient des cellules déjà transformées et ne formaient donc pas un modèle d'étude idéal pour observer l'implication de la HuR2 dans la transformation et la croissance cellulaire, nous n'avons pas poursuivi les expériences de ce côté-là. Nous attendions d'avoir obtenu des cellules du sein non-transformées (MCF-10A) qui exprimaient de manière stable la protéine rtTa.

4.3 Étude la protéine recombinante HuR1

Nous avons étudié l'expression, la distribution ainsi que l'activité de la HuR1 recombinante et d'analyser les effets de différents niveaux d'expression de cette protéine sur la croissance cellulaire.

Lors de l'immunodétection de la HuR1, il nous était impossible d'estimer la surexpression de HuR1 induite par la présence de doxy, car le niveau de HuR1 endogène était indétectable, même après de longues heures d'exposition. Nous nous sommes donc fiés à l'activité réductase de la sous-unité HuR1 recombinante afin d'estimer la surexpression induite par la présence de doxy. Par calcul, nous avons comparé l'activité spécifique de la HuR1 des cellules parentales à celle des deux clones exprimant la protéine recombinante. Nous avons mesuré une activité presque 200 fois plus élevée chez le clone 293rtTa/R1-1 et près de 40 fois plus élevée chez le clone 293rtTa/R1-8. De cette manière, nous avons pu quantifier la

quantité de protéine recombinante fonctionnelle qui a été produite. Nous devons toutefois rappeler que sans la HuR2, il n'y a pas de formation du complexe actif *in vivo*. C'est donc par un mécanisme tout autre que son activité enzymatique que la HuR1 a un impact sur la croissance cellulaire

Cette différence de niveau de surexpression est en accord avec les résultats obtenus dans les expériences de la production de HuR1 en fonction du temps post-induction ainsi que de la production de HuR1 en fonction de la concentration de doxy lors de l'induction. En effet, nous avons vu que les bandes observées chez les clones 293rtTa/R1-1 apparaissaient plus précocement et étaient toujours plus intenses que celles des 293rtTa/R1-8 pour une induction à la même concentration de doxy. Le clone 293rtTa/R1-1 produit donc une plus grande quantité de HuR1 recombinante que le clone 293rtTa/R1-8. Il était possible de détecter de la HuR1 dès 6h post-induction chez le clone 293rtTa/R1-1, alors qu'il fallait 12h avant d'être en mesure de détecter une quantité semblable chez les 293rtTa/R1-8.

L'expression de la protéine recombinante était à son maximum 48h après l'ajout de doxy. La concentration de doxy nécessaire pour induire l'expression maximale était de 0,5 µg/ml de doxy chez les 293rtTa/R1-1 et à 1,5 µg/ml de doxy chez les 293rtTa/R1-8. La différence de surexpression entre les deux clones est probablement due à une différence dans le nombre de copies du plasmide intégrées dans le génome (copies intégrées en tandem). Un plus grand nombre de copies dans le génome équivaldrait à une plus grande expression de la protéine recombinante.

Une autre possibilité peut expliquer la différence de surexpression : la production de la protéine rtTa est peut-être plus importante chez le clone 293rtTa/R1-1 que chez le clone 293rtTa/R1-8. En effet, il est connu que dans une population d'origine clonale, on peut observer différents phénomènes épigénétiques qui influencent quelquefois de manière subtile le programme d'expression des gènes.

4.3.1 Effets de différents niveaux d'expression de la HuR1 sur la croissance cellulaire

Lors d'une induction des différents clones à 3 µg/ml, nous avons observé un ralentissement de la croissance cellulaire autant chez les 293rtTa/R1-1 que les 293rtTa/R1-8 : le temps de doublement passait d'environ 22h à environ 28h. Différentes hypothèses ont été émises afin d'expliquer le phénomène.

Nous avons tout d'abord vérifié que ce n'était pas l'ajout de la doxy au moment de l'ensemencement qui empêchait les cellules de s'accoler convenablement et qui entraînait par la suite un décalage dans la croissance cellulaire. La figure 13 nous a confirmé que la doxy ne semblait pas impliquée dans le ralentissement de la croissance engendré. En effet, lorsque la doxy était ajoutée 24h après l'ensemencement, soit quand les cellules étaient bien accolées et en phase de croissance exponentielle, l'effet sur la croissance cellulaire était toujours présent.

Nous avons effectué une courbe de croissance en induisant les cellules avec différents niveaux de doxy. Nous voulions vérifier si une faible surexpression de HuR1 affectait de manière semblable la croissance cellulaire. Les cellules ont été induites avec 200 ng/ml et 3 µg/ml de doxy. Dans le cas du clone 293rtTa/R1-1, la croissance cellulaire a été affectée autant par une induction de la surexpression à 200 ng/ml que lors d'une induction à 3 µg/ml de doxy. Le clone 293rtTa/R1-8 réagissait de manière différente. Lors de l'induction à 200 ng/ml, la croissance était affectée de manière intermédiaire entre l'induction à 3 µg/ml et le contrôle sans doxy. Cela peut s'expliquer par le fait que le niveau de surexpression du clone 293rtTa/R1-1 est supérieur à celui du clone 293rtTa/R1-8 (voir figure 11 et 12). Cette expérience semble donc suggérer qu'il existerait un niveau seuil à partir duquel la HuR1 affecterait la croissance cellulaire.

Nous avons supposé que la surexpression de la protéine recombinante avait un impact véritable sur la croissance des cellules. Une grande quantité de HuR1 pouvait entraîner l'apparition d'apoptose qui diminuait le nombre de cellules viables donc la croissance; ou un blocage pouvait survenir à une des phases du cycle cellulaire entraînant donc un ralentissement général de la croissance cellulaire. Ces points là seront d'ailleurs discutés plus tard. Par contre, nous avons exclu l'hypothèse qu'une simple surexpression de la protéine recombinante (en terme de quantité produite) causait la mort cellulaire, car rien dans la littérature ne semble appuyer cette hypothèse. Les surexpressions amenant la mort cellulaire sont généralement associées à un potentiel de toxicité de la protéine recombinante plutôt

qu'à la quantité de protéine produite. Dans notre cas, nous pensons qu'une surexpression de HuR1 fonctionnelle *in vivo* deviendrait toxique pour la cellule.

Nous avons par la suite vérifié si, après avoir surexprimé la HuR1 plusieurs jours, les cellules finissaient par s'adapter ou bien si la croissance cellulaire était toujours affectée. Nous avons donc induit des cellules pendant une semaine avant d'effectuer une courbe de croissance. On note à la figure 15 que la croissance des cellules semble très similaire à celle observée sur les courbes de la figure 13. Le temps de doublement passe de 22,3h chez les cellules non-induites, à 27,1h chez les cellules 293rtTa/R1-1 et 293rtTa/R1-8 induites par la doxy. Il ne semble donc pas y avoir d'adaptation des cellules lors d'une surexpression de HuR1 chez des cellules induites depuis une semaine. Toutefois, il est important de noter qu'une induction d'une semaine n'est peut-être pas suffisante pour provoquer l'apparition d'une adaptation des cellules à la surproduction de la protéine recombinante. Il serait donc intéressant de vérifier la croissance de cellules induites depuis une plus longue période, par exemple 2 mois.

4.4 Solubilité de la protéine HuR1 recombinante

4.4.1 Immunofluorescence sur lamelles

La présence diffuse de la protéine HuR1 endogène a pu être observée dans le cytoplasme telle que rapportée dans la littérature (Engstrom et Rozell, 1988) chez les cellules parentales et chez les cellules non-induites. Par contre, lors de

l'induction par la doxy, nous avons pu observer la présence d'une accumulation de protéines localisée en pourtour du noyau. Ces observations ont démontré que le système rtTa utilisé était fiable. Aucune différence dans l'intensité de la fluorescence n'a pu être observée entre les cellules parentales et les cellules non-induites, nous confirmant ainsi l'étanchéité du système d'expression.

Il serait également important de vérifier si les amas de protéines observés dans les cellules induites par la doxy étaient composés de protéines agrégées ou bien s'il s'agissait d'une grande accumulation de protéines dans un organe spécifique. Un immunobuvardage pourrait nous permettre de voir si la protéine HuR1 recombinante était co-localisée un organe tel le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi (Molinari, A. et *al.* 1998). On sait également que la présence d'agrégats intracytoplasmiques ou nucléaires sont fortement associés à la présence d'apoptose (Hackam et *al.*, 1998).

4.4.2 Solubilité de la protéine HuR1

Après avoir observé de grandes accumulations de protéines qui se formaient lors de la forte surexpression de HuR1 recombinante, nous avons évalué la solubilité de la protéine. Vu qu'il était impossible de quantifier la solubilité de la protéine endogène (car non-détectable par immunobuvardage à la figure 17), nous n'avons que la solubilité de la protéine recombinante. Chez les deux clones 293rtTa/HuR1-1 et 293rtTa/HuR1-8, la protéine était soluble à environ 65%, c'est

à dire que l'on retrouvait 35% des protéines dans le culot après une ultracentrifugation. Aucune conclusion probante ne peut être tirée de cette expérience, car on retrouve beaucoup de protéines ayant le même niveau de solubilité et qui ne semblent pas pour autant induire la mort cellulaire.

4.5 Détermination des mécanismes par lesquels une surexpression de HuR1 affecte la croissance cellulaire

4.5.1 Clivage de la protéine PARP

Le clivage de PARP observé lors de l'immunobuvardage à la figure 18 nous indique qu'il y a eu de l'apoptose lors de l'induction de la production de HuR1 recombinante par la doxy. Mais cette seule expérience n'est pas suffisante pour affirmer que la diminution de la croissance observée est totalement due à de la mort cellulaire programmée.

En effet, un arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 pourrait amener un ralentissement de la croissance (Yoshizawa et *al*, 2000) ou une susceptibilité des cellules à la mort cellulaire (Linke et *al*, 1996). Une autre possibilité serait qu'un arrêt durant la phase S du cycle cellulaire pourrait avoir des effets similaires en favorisant la mort des cellules par la voie du p53 (Nakano et *al*, 2000). Il serait donc intéressant de vérifier si la surexpression de HuR1 coïncide avec un arrêt à une phase spécifique du cycle cellulaire, et si l'on observe de l'apoptose à un cycle particulier du cycle cellulaire.

4.5.2 Dosage enzymatique des activités caspase-1, 3, 6, 8 et 9

Nous avons donc tenté de confirmer la présence d'apoptose par le dosage de l'activité enzymatique de différentes caspases. En plus de confirmer la présence d'apoptose, cette expérience avait également pour but de tenter d'élucider la voie métabolique impliquée. De toutes les caspases testées (caspases-1, 3, 6, 8 et 9), nous n'avons observé qu'une faible activation de la caspase-3. Les résultats obtenus demeurent complexes à interpréter.

Première interprétation possible, il y a effectivement activation de la caspase-3 mais aucune activité n'a été détectée chez les caspases-1, 6, 8 et 9. Il a été observé que certains agrégats cellulaires formés de peptides contenant un motif-RDG pouvait cliver directement la procaspase-3 (Buckley et *al*, 1999). Il serait donc possible que l'accumulation de HuR1 observé lors de l'immunofluorescence arrivent à activer directement la caspase-3 par un mécanisme non-élucidé jusqu'à maintenant.

Une deuxième interprétation possible est que l'activation des autres caspases telles la caspase-9 ou la caspase-8 était trop faible pour être détectés. Un nouveau dosage en utilisant de plus grandes quantités d'extrait cellulaire pourrait donc être effectué. On peut également effectuer une immunodétection à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre la procaspase-8 et de la procaspase-9 ainsi que leurs produits de clivage.

5 Conclusion

Nous avons observé un ralentissement de la croissance des cellules transformées (293rtTa) qui surexprimaient la sous-unité HuR1, ce qui semblait corrélérer avec les observations du groupe de Wright (Fan et *al*, 1997). En effet, Wright avait observé qu'une expression stable de la R1 ectopique active biologiquement dans des lignées de fibroblastes 10T1/2 transformé, menait à une réduction significative du nombre de colonies formées en agar mou. Cette diminution de la capacité à former des colonies en agar mou pourraient être associée en partie à l'apparition de mort cellulaire et au ralentissement de la croissance cellulaire que nous avons observé chez les 293rtTa qui surexprimaient la sous-unité HuR1. Comme le groupe de Wright, nous pensons que la sous-unité HuR1 joue un rôle important dans le mécanisme de malignité des cellules. Pourtant notre avis sur l'implication de la sous-unité R1 dans la carcinogénèse ainsi que le mécanisme d'action de la R1 dans la diminution de la malignité diffère du groupe de Wright. Nous pensons qu'une surexpression de HuR1 deviendrait toxique pour les cellules et induirait un blocage lors du cycle de division cellulaire ou encore la mort programmée de la cellule. Contrairement à Wright, nous ne pensons pas que le gène codant pour la sous-unité HuR1 soit un gène suppresseur de tumeur. Une étude du groupe de Pitterle semble réfutée le fait que la HuR1 soit un gène suppresseur de tumeur, car bien que 75% des cancers du poumon montrent une perte d'hétérozygotie dans la région 11p15.5, 63% des échantillons ne présentaient pas de mutations dans le gène codant pour la HuR1 (Pitterle et *al*, 1999)

Sans études plus approfondies, il nous est toutefois impossible d'affirmer que la diminution de la croissance cellulaire observée chez ces cellules, est uniquement due à de l'apoptose. En effet, un arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 pourrait amener une diminution de la croissance. Il serait donc important de vérifier si l'expression de la HuR1 ne coïncide pas avec un arrêt des cellules à un stade particulier du cycle cellulaire (études au FACS). Il faudrait également effectuer d'autres expériences principalement des dosages des différentes caspases afin de confirmer si la diminution de croissance est bien due à de l'apoptose, et si c'est le cas, déterminer la voie impliquée.

De plus, il serait intéressant de déterminer soit par microscopie électronique et par co-localisation (immunofluorescence), si les accumulations de protéines observées lors de l'immunofluorescence sont en fait des protéines agrégées ou une accumulation de la protéine recombinante dans un organite spécifique.

5.1 Perspective d'avenir

Il semble important de continuer ces études préliminaires sur la surexpression de la HuR1 dans des 293rtTa, car cela pourrait fournir des détails importants sur les effets induits par la surexpression de la protéine recombinante HuR1.

Mais, notre principal but étant d'étudier l'implication des deux sous-unités de la RNR dans la carcinogenèse mammaire, il serait très important de reproduire ces expériences dans les cellules normales et transformées du sein. Nous nous attendons à obtenir bientôt des cellules MCF-10A qui exprimeront de manière stable la protéine rtTa.

Les cellules transformées du sein MDA-MB-231 rtTa étant disponibles, il serait intéressant d'y introduire la construction pAd-TR5F-K7-HuR1-GFP_Q, afin de tenter de reproduire les observations faites chez les 293rtTa, ainsi que pour vérifier si nous observons les mêmes phénomènes que le groupe de Wright, c'est à dire une diminution du potentiel de malignité des cellules transformées.

6 Références bibliographiques

. Agrawal, K.C., Schenkman, J.B., Denk, H., Mooney, P.D., Moore, E.C., Wodinsky, I. et Sartorelli, A.C. 1977. 4-methyl-5-amino-1-formylisoquinoline thiosemicarbazone, a second-generation antineoplastic agent of the alpha-(N)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazone series. *Cancer Res.* **37**(6):1692-6.

. Anderson, D., Richardson, C.R. et Davies, P.J. 1981. The genotoxic potential of bases and nucleosides. *Mutat. Res.* **91**(3):265-72

. Bjorklund, S., Skog, S., Tribukait, B. et Thelander, L. 1990. S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 and R2 subunit mRNAs. *Biochemistry.* **29**(23):5452-8.

. Byrne, J.A., et Smith, P.J. 1993. The 11p15.5 ribonucleotide reductase M1 subunit locus is not imprinted in Wilms' tumour and hepatoblastoma. *Hum. Genet.* **91**(3):275-277

. Brissenden, J.E., Caras, I., Thelander, L. et Francke, U. 1988. The structural gene for the M1 subunit of ribonucleotide reductase maps to chromosome 11, band p15, in human and to chromosome 7 in mouse. *Experim. Cell Res.* **174**:302-308

. Brockman, R.W., Shaddix, S.C., Williams, M., Nelson, J.A., Rose, L.M. et Schabel, F.M. Jr. 1975. The mechanism of action of 3-deazauridine in tumor cells sensitive and resistant to arabinosylcytosine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **255**(751106-751230-2):501-21.

. Buckley, C.D., Pilling, D., Henriquez, N.V., Parsonage, G., Threlfall, K., Scheel-Toellner, D., Simmons, D.L., Akbar, A.N., Lord, J.M. et Salmon, M. 1999. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature.* **397**(6719):534-9.

- . Burnett, R.C., Espinosa, R. 3rd, Shows, T.B., Eddy, R.L., LeBeau, M.M., Rowley, J.D. et Diaz, M.O. 1993. Molecular analysis of a t(11;14)(q23;q11) from a patient with null-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. **7**(1):38-46
- . Choy, B.K., McClarty, G.A., Chan, A.K., Thelander, L. et Wright, J.A. 1988. Molecular mechanisms of drug resistance involving ribonucleotide reductase: hydroxyurea resistance in a series of clonally related mouse cell lines selected in the presence of increasing drug concentrations. *Cancer Res*. **48**(8):2029-35.
- . Cremer, T., Kreth, G., Koester, H., Fink, R.H., Heintzmann, R., Cremer, M., Solovei, I., Zink, D. et Cremer, C. 2000. Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. Review *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*. **10**(2):179-212..
- . Engstrom, Y. et Rozell, B. 1988, Immunocytochemical evidence for the cytoplasmic localization and differential expression during the cell cycle of the M1 and M2 subunits of mammalian ribonucleotide reductase. *EMBO J*. **7**(6):1615-20
- . Eriksson, S., Graslund, A., Skog, S., Thelander, L. et Tribukait, B. 1984. Cell cycle-dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase. The S phase-correlated increase in subunit M2 is regulated by de novo protein synthesis. *J. Biol. Chem*. **259**(19):11695-700.
- . Fan, H., Villegas, C. et Wright J.A. 1996. Ribonucleotide reductase R2 component is a novel malignancy determinant that cooperates with activated oncogenes to determine transformation and malignant potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**(24):14036-14040

- . Fan, H., Huang, A., Villegas, C. et Wright J.A. 1997. The R1 component of mammalian ribonucleotide reductase has malignancy-suppressing activity as demonstrated by gene transfer experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**(24):13181-13186
- . Fan, H., Villegas, C., Huang, A. et Wright J.A. 1998. The mammalian ribonucleotide reductase R2 component cooperates with a variety of oncogenes in mechanisms of cellular transformation. *Cancer Res*. **58**(8):1650-1653
- . Goncalves, O., Drobetsky, E. et Meuth, M.. 1984. Structural alterations of the apt locus induced by deoxyribonucleoside triphosphate pool imbalances in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell Biol*. **4**(9):1792-9
- . Gordon, HL., Bardos, TJ. et Ambrus, JL. 1970. Comparative study of ribonucleotide reductase activities in normal and neoplastic human tissue. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol*. **1** (6) :749-756
- . Gossen, M. et Bujard, H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**(12):5547-51.
- . Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. et Bujard, H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**(5218):1766-9.
- . Gu, Y., Alder, H., Nakamura, T., Schichman, S.A., Prasad, R., Canaani, O., Saito, H., Croce, C.M. et Canaani, E. 1994. Sequence analysis of the breakpoint cluster region in the ALL-1 gene involved in acute leukemia. *Cancer Res*. **54**(9):2326-30

- . Hackam, A.S., Singaraja, R., Wellington C.L., Metzler, M., McCutcheon, K., Zhang, T., Kalchman, M. et Hayden, M.R. J. 1998. The Influence of Huntingtin Protein Size on Nuclear - Localization and Cellular Toxicity. *J. Cell Biol.*, 141(5) :1097-1105
- . Harkin, D.P., Bean, J.M., Miklos, D., Song, Y.H., Truong, V.B., Englert, C., Christians, F.C., Ellisen, L.W., Maheswaran, S., Oliner, J.D., Haber, D.A. 1999. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*. **97**(5):575-86.
- . Hillen, W. et Wissman, A. 1989. Protein-nucleic Acid interactions. Topics in molecular and structural biology, Eds. Saenger W. et Heinemann U. (MacMillan London), Vol 10. pp. 143-162
- . Jensen, R.A., Page, D.L. et Holt, J.T. 1994. Identification of genes expressed in premalignant breast disease by microscopy-directed cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**(20):9257-9261
- . Jordan, A. et Reichard, P. 1998. Ribonucleotide reductases. Review. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:71-98.
- . Kalatzis, V., Peters, G.B., et Dobrovic, A. 1993. Mapping of the chromosome 11 breakpoint of the t(4;11)(q21;p14-15) translocation. *Cancer Genet. Cytogenet.* **69**(2):122-125
- . Knecht, D.A. et Dimond R.L. 1984. Visualization of antigenic proteins on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**(1):180-4
- . Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**(259):680-5

. Langelier, Y., Champoux, L., Hamel, M., Guilbault, C., Lamarche, N., Gaudreau, P. et Massie, B. 1998. The R1 subunit of herpes simplex virus ribonucleotide reductase is a good substrate for host cell protein kinases but is not itself a protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**(3):1435-43.

. Lee, P., Morley, G., Huang, Q., Fischer, A., Seiler, S., Horner, J.W., Factor, S., Vaidya, D., Jalife, J. et Fishman, G.I. 1998. Conditional lineage ablation to model human diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**(19):11371-6.

. Lei, H.X., Li, Z.S., Xie, D.Y., Liu, B.C. et Fang, F.D. 1998. Role of deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs) in cell transformation. *Biomed. Environ. Sci.* **11**(4):354-62

. Lewis, W.H., Kuzik, B.A. et Wright, J.A. 1978. Assay of ribonucleotide reduction in nucleotide-permeable hamster cells. *J. Cell Physiol.* **94**(3):287-98.

. Linke, S.P., Clarkin, K.C., Di Leonardo, A., Tsou, A. et Wahl, G.M. 1996. A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev.* **10**(8):934-47.

. Loeb, K.R. et Loeb L.A. 1999. Genetic instability and the mutator phenotype. Studies in ulcerative colitis. *Am. J. Pathol.* **154**(6):1621-6

. Louis, N., Eveleigh, C. et Graham, F.L. 1997. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology.* **233**(2):423-9.

. Massie, B., Dionne, J., Lamarche, N., Fleurent, J. et Langelier, Y. 1995. Improved adenovirus vector provides herpes simplex virus ribonucleotide reductase R1 and R2 subunits very efficiently. *Biotechnology (N Y).* **13**(6):602-8.

- . Mendelman L.V., Petruska, J. et Goodman, M.F. 1990. Base mispair extension kinetics. Comparison of DNA polymerase alpha and reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **5**;265(4):2338-46
- . Molinari, A., Calcabrini, A., Meschini, S., Stringaro, A., Del Bufalo, D., Cianfriglia, M. et Arancia, G. 1998. Detection of P-glycoprotein in the Golgi apparatus of drug-untreated human melanoma cells. *Int. J. Cancer.* **75**(6):885-93.
- . Moore, E.C. et Loo, T.L. 1984. Inhibition of ribonucleotide reductase by caracemide. *Cancer Treat. Rep.* **68**(10):1293-4.
- . Nakano, K., Balint, E., Ashcroft, M. et Vousden, K.H. 2000. A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* **19**(37):4283-9
- . Nordlund, P. et Eklund, H. 1993. Structure and function of the Escherichia coli ribonucleotide reductase protein R2. *J. Mol. Biol.* **232**(1):123-64.
- . Nordlund, P., Uhlin, U., Westergren, C., Joelsen, T., Sjoberg, B.M. et Eklund, H. 1989. New crystal forms of the small subunit of ribonucleotide reductase from Escherichia coli. *FEBS Lett.* **258**(2):251-4.
- . Nutter, L.M. et Cheng, Y.C. 1984. Nature and properties of mammalian ribonucleoside diphosphate reductase. Review. *Pharmacol. Ther.* **26**(2):191-207.
- . Pavloff, N., Rivard, D., Masson, S., Shen, S.H. et Mes-Masson, A.M. 1992. Sequence analysis of the large and small subunits of human ribonucleotide reductase. *DNA Seq.* **2**(4):227-34.
- . Pitterle, D.M., Kim, YC., Jolicoeur, E.M., Cao, Y., O'Briant, K.C. et Bepler, G. 1999. Lung cancer and the human gene for ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1). *Mamm. Genome* **10**(9):916-22

- . Razin, A. et Cedar, H. 1991. DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Rev.*, **55** : 451-458
- . Reichard, P. 1978. From deoxynucleotides to DNA synthesis. (Review) *Fed. Proc.* **37**(1):9-14
- . Reichard, P. 1993. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science*. **260**(5115):1773-7.
- . Scangos, G. et Ruddle, FH. 1981. Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review. *Gene* **14**(1-2):1-10
- . Shapiro, A.L., Vinuela, E. et Maizel, J.V. Jr. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**(5):815-20
- . Smith, S.A. et Ponder, B.A. 1993. Predisposing genes in breast and ovarian cancer: an overview. Review. *Tumori* **79**(5):291-6.
- . Stubbe, J. et Riggs-Gelasco, P. 1998. Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase. Review. *Trends Biochem. Sci.* **23**(11):438-43.
- . Takeda, E. et Weber, G. 1980. Role of ribonucleotide reductase in expression of the neoplastic program. *Life Sciences* . **28**:1007-1014.
- . Thelander, L. et Reichard, P. 1979. Reduction of ribonucleotides. Review. *Annu. Rev. Biochem.* **48**:133-58.

- . Tonin, P.N., Stallings, R.L., Carman, M.D., Bertino, J.R., Wright, J.A., Srinivasan, P.R. et Lewis, W.H. 1987. Chromosomal assignment of amplified genes in hydroxyurea-resistant hamster cells. *Cytogenet. Cell Genet.* **45**(2):102-8.
- . Tovar, K. et Hillen, W. 1989. Tet repressor binding induced curvature of tet operator DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**(16):6515-22.
- . Wallar, B.J. et Lipscomb, J.D. 1996 Dioxygen activation by enzymes containing binuclear non-heme iron clusters. *Chem. Rev.* **96**, 2625-2657.
- . Weber, G. 1983. Biochemical strategy of cancer cells and the design of chemotherapy: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. Review. *Cancer Res.* **43**(8):3466-92.
- . Wooster, R., Neuhausen, S.L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D., et al. 1994. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science.* **265**(5181):2088-90.
- . Wright, J.A., Chan, A.K., Choy, B.K., Hurta, R.A., McClarty, G.A. et Tagger, A.Y. 1990. Regulation and drug resistance mechanisms of mammalian ribonucleotide reductase, and the significance to DNA synthesis. Review. *Biochem. Cell Biol.* **68**(12):1364-71.
- . Yang-Feng, T.L., Barton, D.E., Thelander, L., Lewis, W.H., Srinivasan, P.R. et Francke, U. 1987. Ribonucleotide reductase M2 subunit mapped to four different chromosomal sites in humans and mice: functional locus identified by its amplification in hydroxyurea-resistant cells lines, *Genomics.* **1**:77-86.

. Yoshizawa, T., Yamagishi, Y., Koseki, N., Goto, J., Yoshida, H., Shibasaki, F., Shoji, S. et Kanazawa, I. 2000. Cell cycle arrest enhances the in vitro cellular toxicity of the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Hum. Mol. Genet.* 9(1):69-78.

. Zhou, B.S., Tsai, P., Ker, R., Tsai, J., Ho,R., Yu, J., Shih,J. et Yen,Y. 1998. Overexpression of transfected human ribonucleotide reductase M2 subunit in human cancer cells enhances their invasive potential. *Clin. Exp. Metastasis* 16(1):43-49.