

Université de Montréal

Caractérisation de HTDE et de son potentiel oncogénique *in vitro* et *in vivo*

Par
François Veillette

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 Science (M.Sc.)
En Biologie Moléculaire

Août 2004

©François Veillette, 2004



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation de HTDE et de son potentiel oncogénique *in vitro* et *in vivo*

Présenté par :
François Veillette

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Anne-Marie Mes-Masson
Directeur de recherche

Isabelle Royal
Président-rapporteur

Yves St-Pierre
Membre du jury

Mémoire accepté le :

Sommaire

Les souris transgéniques porteuses de l'antigène grand T du virus de polyome (PyLT-Ag) développent des tumeurs testiculaires entre 8 et 12 mois d'âge. La latence avec laquelle apparaissent ces tumeurs suggère l'existence d'événements secondaires à l'expression de PyLT-Ag qui peuvent être impliqués dans la tumorigénèse. Grâce à ce modèle de souris, un nouveau gène différentiellement exprimé, codant pour la protéine HTDE, a été identifié. HTDE est une protéine composée de 473 acides aminés dont la fonction est aujourd'hui inconnue. Elle fait partie d'une nouvelle famille de protéines avec des homologues conservés de la levure à l'humain. Nous avons généré une protéine de fusion HTDE/GFP et nous avons montré que cette protéine est localisée à la membrane plasmique dans des cellules HEK293 et A549. Nous avons transfecté HTDE dans des fibroblastes embryonnaires de rat (REFs) et nous avons déterminé qu'elle n'a pas de potentiel immortalisant *in vitro* comparée à PyLT-Ag. Par contre, nous avons montré que HTDE peut induire la formation de foyers, une des caractéristiques des cellules transformées *in vitro*. Des xénogreffes chez la souris *nu* ont montré que HTDE peut accélérer la formation de tumeurs, donc qu'elle joue un rôle dans la transformation *in vivo*. L'étude des modifications post-traductionnelles de HTDE montre que la protéine est glycosylée. Nous développons présentement une nouvelle souris transgénique exprimant HTDE sous le contrôle de la kératine 19 (K19) afin d'améliorer notre compréhension de son potentiel oncogénique *in vivo* et de mieux définir son rôle dans la tumorigénèse. Mots-clés : Souris transgéniques, PyLT-Ag, progression tumorale, foyers, xénogreffes, immortalisation, K19.

Abstract

Transgenic mice harboring Polyoma Virus Large T Antigen (PyLT-Ag) develop testicular tumors between 8 to 12 months after birth. The latency of tumor development suggests that secondary events, in addition to the expression of PyLT-Ag could be implicated in tumor development. Using this mouse model, we have previously identified HTDE, a differentially expressed novel gene product. The HTDE protein is composed of 473 amino acids and to date no definitive function has been assigned to this protein. Subsequently, it has been demonstrated that HTDE is part of a new protein family with homologous proteins conserved from yeast to human. Here, we have generated a HTDE/GFP fusion protein and demonstrated that this protein localizes to the plasma membrane in HEK293 and A549 cell lines and post-transcriptional studies have shown that HTDE protein is glycosylated. A rat embryo fibroblast (REF) immortalizing assay demonstrates that HTDE, contrary to PyLT-Ag, lacks immortalizing potential *in vitro*. We also show that HTDE induces foci formation, thus confirming that it confers at least one *in vitro* trait related to neoplastic transformation. More significantly, injection of cells expressing HTDE in nude mice demonstrates that HTDE can accelerate tumor formation, thereby confirming a role for HTDE in tumorigenesis. We are currently developing a new transgenic mouse model expressing HTDE under the control of the K19 promoter. This approach will lead to better understanding of HTDE's *in vivo* oncogenic potential. Key words : Transgenic mice, PyLT-Ag, multistep tumorigenesis, foci formation, nude mice, immortalization.

Table des matières

| | |
|--|------|
| Sommaire | iii |
| Abstract | iv |
| Liste des figures | viii |
| Liste des abréviations | ix |
| Remerciements | xi |
| Dédicace | xii |
| | |
| 1.0 Introduction | 2 |
| 1.1 Le cancer | 3 |
| 1.2 Les événements-clés dans le développement d'un cancer | 5 |
| 1.3 Les virus, un système modèle de la transformation cellulaire | 9 |
| 1.4 L'immortalisation cellulaire | 10 |
| 1.5 Les caractéristiques des cellules transformées <i>in vitro</i> | 12 |
| 1.6 Les souris transgéniques | 13 |
| 1.7 La modélisation du cancer à l'aide des souris transgéniques | 13 |
| 1.8 La progression néoplasique des souris transgéniques PyLT | 15 |
| 1.9 La découverte d'un nouveau gène, mTDE | 15 |
| 1.10 La découverte de l'homologue humain, hTDE | 17 |
| 1.11 Les autres protéines membres de la famille de HTDE | 20 |
| 1.12 Les objectifs de ce mémoire | 24 |
| | |
| 2.0 Matériels et méthodes | 26 |
| 2.1 La biologie moléculaire | 27 |
| 2.2 La PCR | 28 |
| 2.3 Les constructions plasmidiques | 29 |
| 2.3.1 PGKH-HTDE/GFP | 29 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.3.2 | PGKH-HTDE | 30 |
| 2.3.3 | K19-HTDE/GFP | 32 |
| 2.4 | La culture cellulaire | 33 |
| 2.5 | Les transfections | 34 |
| 2.6 | La microscopie en fluorescence | 35 |
| 2.7 | Les immunobuvardages Western | 35 |
| 2.8 | Les buvardages Northern | 37 |
| 2.9 | L'étude de la glycosylation | 39 |
| 2.10 | Les essais d'immortalisation | 40 |
| 2.11 | Les essais de perte de l'inhibition de contact | 41 |
| 2.12 | Les xéno greffes chez la souris <i>nu</i> | 41 |
| 2.13 | L'immunohistochimie | 42 |
| 2.14 | La souris transgénique K19-HTDE/GFP | 43 |
| 2.15 | Le génotypage de souris par buvardage Southern | 44 |
| 2.16 | Les tests statistiques | 45 |
| 3.0 | Résultats | 46 |
| 3.1 | La localisation cellulaire de HTDE/GFP | 47 |
| 3.2 | La caractérisation des clones stables par buvardage Northern | 50 |
| 3.3 | La caractérisation des clones stables par buvardage Western | 52 |
| 3.4 | Une modification post-traductionnelle, la glycosylation | 54 |
| 3.5 | La caractérisation du potentiel immortalisant <i>in vitro</i> | 56 |
| 3.6 | La caractérisation du potentiel transformant <i>in vitro</i> | 58 |
| 3.7 | La caractérisation du potentiel transformant <i>in vivo</i> | 61 |
| 3.8 | La caractérisation des xéno greffes chez la souris <i>nu</i> | 63 |
| 3.9 | Le génotypage de la première ronde de microinjections | 68 |
| 4.0 | Discussion | 70 |
| 4.1 | La localisation cellulaire de la protéine de fusion | 71 |

| | |
|---|------|
| 4.2 La caractérisation des clones stables exprimant HTDE | 73 |
| 4.3 La glycosylation | 74 |
| 4.4 L'immortalisation | 76 |
| 4.5 La perte de l'inhibition de contact | 78 |
| 4.6 La formation de tumeurs chez la souris <i>nu</i> | 79 |
| 4.7 L'analyse immunohistochimique des xénogreffes | 80 |
| 4.8 Des travaux parallèles de caractérisation <i>in vitro</i> | 81 |
| 4.9 Le rôle de l'environnement | 82 |
| 4.10 La coopération entre les oncogènes | 84 |
| 4.11 La création d'une souris transgénique K19-HTDE/GFP | 85 |
| 4.12 Les autres séquences de HTDE | 86 |
| 4.13 Les conclusions finales | 88 |
| 5.0 Bibliographie | 90 |
| 6.0 Annexe | xiii |

Liste des Figures

- Figure 1 Les caractéristiques acquises d'une cellule cancéreuse
- Figure 2 Représentation graphique du plasmide PGKH-HTDE/GFP
- Figure 3 Représentation graphique du plasmide PGKH-HTDE
- Figure 4 Représentation graphique du plasmide K19-HTDE/GFP
- Figure 5 Localisation cellulaire de la protéine de fusion HTDE/GFP
- Figure 6 Buvardage Northern des clones Rat-1_PGKH-HTDE/GFP et des clones Rat-1_PGKH-HTDE
- Figure 7 Immunobuvardage Western des clones Rat-1_PGKH-HTDE
- Figure 8 Glycosylation de HTDE/GFP dans des cellules Rat-1
- Figure 9 Immortalisation de REFs par PyLT/GFP et HTDE/GFP
- Figure 10 Essai de perte de l'inhibition de contact par les clones stables exprimant les constructions PGKH-HTDE/GFP ou PGKH-HTDE dans les cellules Rat-1
- Figure 11 Xénogreffes chez la souris *nu* de clones stables exprimant la protéine HTDE ou HTDE/GFP dans les cellules Rat-1
- Figure 12 Détection de marqueurs de croissance cellulaire par immunohistochimie dans les tumeurs induites par les xénogreffes
- Figure 13 Génotypage par buvardage Southern des souriceaux nés du premier essai de microinjection avec K19-HTDE/GFP

Liste des abréviations

| | |
|---------|---|
| ADN : | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc : | ADN complémentaire |
| ARN : | Acide ribonucléique |
| ARNm : | ARN messenger |
| BSA : | <i>Bovine Serum Albumin</i> |
| CRL : | <i>Charles Rivers Laboratory</i> |
| DAB : | Diaminobenzidine |
| DEPC : | Diethylpyrocarbonate |
| DMEM : | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO : | Dimethylsulfoxyde |
| EDTA : | <i>Ethylenedinitrotetraacetic acid</i> |
| EST : | <i>Expressed Sequence Tag</i> |
| FBS : | <i>Fetal Bovine Serum</i> |
| GAPDH : | Glycéraldéhyde 6-Phosphate déshydrogénase |
| GFP : | <i>Green Fluorescent Protein</i> |
| HA : | Hémagglutinine A du virus de l'Influenza |
| HRP : | <i>Horse Radish Peroxidase</i> |
| HTDE : | <i>Human Tumor Differentially Expressed</i> |
| K19 : | Kératine 19 |
| Kb : | Kilobase |
| kDa : | Kilodalton |
| LB : | Lurian-Bertani |

| | |
|-----------|--|
| LOH : | Loss of heterozygosity |
| MMTV : | <i>Mouse Mammary Tumor virus</i> |
| MT : | Métallothionéine |
| NSCLC : | <i>Non Small Cell Lung Cancer</i> |
| Nt : | Nucléotide |
| O/N : | <i>Overnight</i> |
| ORF : | <i>Open Reading Frame</i> |
| OSE : | <i>Ovarian Surface Epithelium</i> |
| PAGE : | <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> |
| PBS : | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PCNA : | <i>Proliferation Cell Nuclear Antigen</i> |
| PCR : | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| Pb : | Paire de bases |
| PyLT-Ag : | <i>Polyoma Virus Large Tumoral Antigen</i> |
| QRT-PCR : | <i>Quantitative Real-Time PCR</i> |
| RPM : | Rotation par minute |
| RT-PCR : | <i>Reverse Transcription PCR</i> |
| SDS : | Sodium Dodecyl Sulfate |
| SNC : | Système Nerveux Central |
| SSC : | Tampon de citrate de sodium |
| SV40 : | <i>Simian Virus 40</i> |
| TUNEL : | <i>Terminal Uridine Nick-End Labelling</i> |

Remerciements

Voilà, c'est terminé! Plus de 1000 jours après le début de cette aventure que sont les études graduées, me voici rendu au fil d'arrivé avec le produit final : un simple résumé d'une petite centaine de pages à double interligne. Ce n'est que la version écrite de ce qu'est une maîtrise. Ce que mémoire ne peut pas transmettre, c'est : la passion de la découverte, les expériences durant les fins de semaine, la guerre pour avoir une place en salle de culture, l'excitation devant les résultats positifs, le découragement devant les résultats négatifs, l'empressement de devoir reproduire un résultat et finalement la découverte du sens très large et peu agréable de l'expression 'Troubleshooting'.

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, Dre Anne-Marie Mes-Masson, de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire, et pour avoir pris le temps de discuter de mon projet de recherche. Je la remercie également pour m'avoir converti aux ordinateurs Apple-MacIntosh et je tiens à m'excuser encore pour celui que j'ai fait exploser!

Un chaleureux 'MERCI' à tous les membres du laboratoire qui étaient là pour partager ces moments creux et ces joies ponctuelles que représentent le merveilleux monde de la recherche scientifique académique. Je tiens à remercier plus spécialement les gens qui ont eu une influence sur mon développement scientifique à force de discussions stimulantes et j'ai nommé : Francis Rodier, Michela Bossolasco, Christine Maugard, Cécile Le Page, Sylvain Foisy, Érik Joly, Serge Hardy, Stéphane Bergeron et Kevin Little.

Finalement, un gros merci à mon père pour ses encouragements, son support, son écoute active et ses conseils judicieux. Merci également à mes amis de la 'Sherbrooke Connection' (JF, Dom, Alex, Annie, Sam, Julie, Isabelle) pour votre amitié inconditionnelle et vos partys légendaires.

À la tendre mémoire de Martine Simoneau,
Ton combat contre le cancer m'a inspiré
Et m'a donné une toute autre appréciation de l'expression :
'Never give up'!

1.0 Introduction

1.0 Introduction :

Notre laboratoire s'intéresse à l'étude de gènes pouvant être impliqués dans la progression tumorale et utilise le modèle des souris transgéniques exprimant l'antigène grand T du virus de polyome (PyLT). Ces souris développent des tumeurs, et même si l'expression de PyLT est nécessaire, elle n'est probablement pas suffisante pour engendrer des tumeurs dans ce modèle. Cela suggère que des événements secondaires doivent contribuer à la tumorigénèse. Notre hypothèse de départ suppose que des gènes qui sont différemment exprimés entre un tissu sain et une tumeur peuvent être impliqués dans la tumorigénèse. Notre but est de découvrir et caractériser davantage de nouveaux gènes candidats identifiés dans notre modèle et de définir leurs rôles dans la tumorigénèse. Le présent mémoire se concentre sur la caractérisation d'un nouveau gène candidat, *htde* (*human tumor differentially expressed*), dont l'expression est modulée pendant l'oncogénèse des souris transgéniques exprimant PyLT (Bossolasco 1999). Notre but à plus long terme est également de créer une nouvelle souris transgénique exprimant le gène *htde* afin de mieux définir son rôle dans la tumorigénèse. Afin de mettre en contexte les travaux de ce mémoire, nous traiterons d'abord des sujets suivant : le cancer, la progression tumorale à plusieurs étapes, le concept d'oncogène, l'immortalisation et l'utilisation des souris transgéniques pour modéliser la progression tumorale.

1.1 Le cancer :

Le cancer, dû à l'importance du nombre de personnes qu'il atteint, représente un problème majeur de santé publique et il constitue la deuxième cause de mortalité au Canada après les maladies du coeur. Le mot cancer est dérivé du grec '*karkinos*' qui signifie crabe ou pincés. Le mot latin, cancer, désigne aussi un crabe ou écrevisse. Ce n'est qu'à la fin du *XV^e* siècle en français qu'il prend le sens de tumeur qu'on lui connaît aujourd'hui. Le cancer est un terme qui s'apparente à près de 150 maladies, avec diverses appellations spécifiques, qui ont au moins deux caractéristiques en commun : une croissance incontrôlable et nuisible de cellules et une capacité de ces cellules d'envahir et d'endommager des tissus sains. Chaque cancer est unique et est issu d'une seule cellule qui a échappée aux restrictions de la croissance auxquelles sont soumises les cellules normales. Ces modifications sont ainsi transmises à chacune des cellules-filles et une famille de cellules anormales se constitue et pourra éventuellement progresser vers une tumeur bénigne ou maligne. Un des problèmes à la source du cancer survient lorsqu'un gène est altéré d'une manière telle que ce gène ne soit plus capable de fabriquer ou réguler une protéine donnée de façon normale. Ces altérations peuvent être dues à des réarrangements chromosomiques, des délétions, des mutations ou des amplifications dans l'ADN génomique. Le cancer est dû à la multiplication anarchique (non contrôlée) de cellules dans un organisme multicellulaire,

multiplication qui, par l'envahissement de l'individu, va désorganiser sa physiologie et éventuellement mener jusqu'à la mort. Les cellules cancéreuses qui sont issues d'organes solides peuvent provoquer des tumeurs. Le processus tumoral est très complexe et il implique généralement plusieurs événements génétiques et épigénétiques.

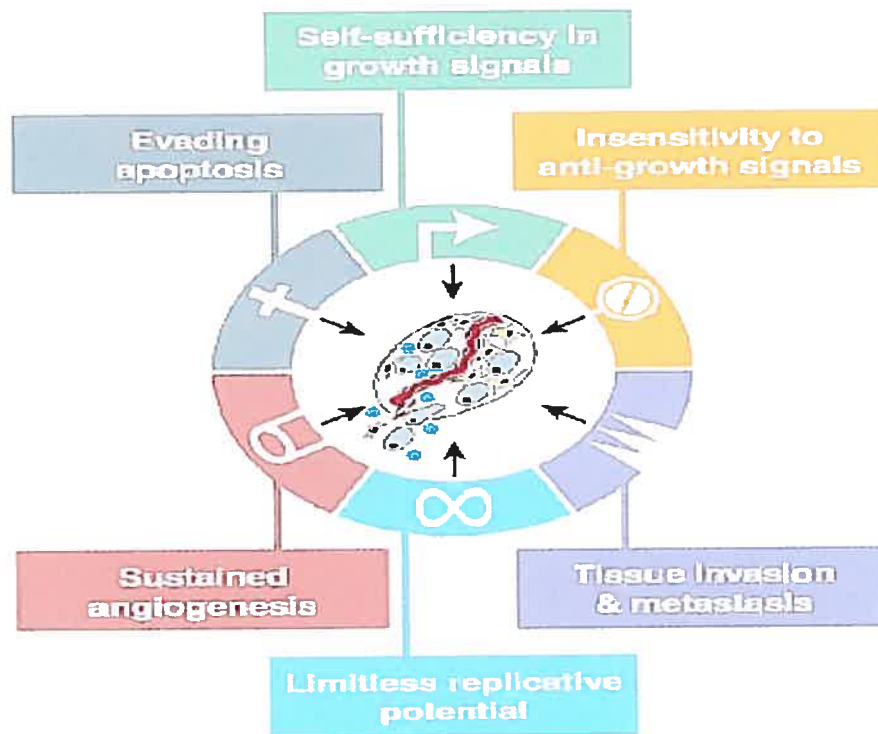
La division cellulaire est un processus biologique extrêmement régulé, positivement et négativement, par l'expression de nombreux gènes. On y distingue deux grandes catégories de gènes importants soient les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes sont ceux qui stimulent la division cellulaire, car ils codent pour des protéines qui induisent généralement la prolifération cellulaire. Tout gène susceptible de devenir transformant i.e. permettre l'acquisition d'un phénotype tumoral (voir section caractéristiques des cellules transformées *in vitro*) à la suite d'une modification qualitative (mutation, délétion, réarrangement) ou quantitative (surexpression, amplification génique) est un oncogène. Les gènes suppresseurs de tumeurs (ou anti-oncogènes), codent pour des protéines qui ralentissent ou inhibent la prolifération cellulaire. C'est un équilibre subtil entre ces deux catégories de gènes qui induit une harmonie du développement et des fonctions de l'organisme (homéostasie). Le cancer perturbe cet équilibre dynamique et entraîne de sérieuses conséquences pour l'organisme.

1.2 Les événements-clés dans le développement d'un cancer :







Après un quart de siècle d'avancées rapides, la recherche sur le cancer a généré un savoir riche et complexe révélant le cancer comme une maladie impliquant des changements dynamiques dans le génome (Hanahan 2000). Les principes sous-jacents au développement d'un cancer ont été simplifiés et illustrés dans la figure suivante :

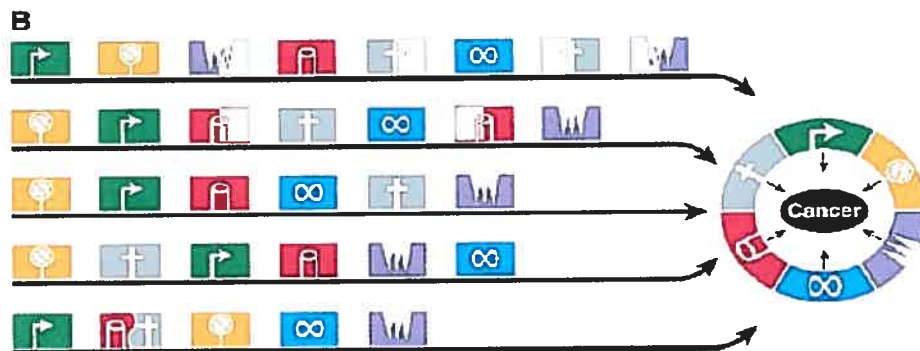
Figure 1. Les caractéristiques acquises d'une cellule cancéreuse. Figure tirée de Hanahan et al. dans la revue Cell (janvier 2000). Énumération des différentes caractéristiques acquises par une cellule cancéreuse lors de son développement tumoral peu importe la stratégie ou le mécanisme parallèle pour y arriver.

Figure 1



A

| Component | Acquired Capability | Example of Mechanism |
|---|--------------------------------------|--------------------------------|
|  | Self-sufficiency in growth signals | Activate H-Ras oncogene |
|  | Insensitivity to anti-growth signals | Lose retinoblastoma suppressor |
|  | Evading apoptosis | Produce IGF survival factors |
|  | Limitless replicative potential | Turn on telomerase |
|  | Sustained angiogenesis | Produce VEGF inducer |
|  | Tissue invasion & metastasis | Inactivate E-cadherin |



L'indépendance et l'insensibilité aux facteurs de croissance, l'évasion de l'apoptose, l'immortalité, l'angiogénèse et l'invasion du tissu sont les principes qui gouvernent la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses et malignes (Figure 1). Ces 'capacités acquises' partagées par la plupart des types de cancers humains dérivent directement de nos connaissances sur la biologie cellulaire affirmant que toutes les cellules possèdent une machinerie cellulaire semblable régulant la prolifération, la différenciation et la mort (Hanahan 2000). De là l'idée qu'une cellule cancéreuse doit nécessairement emprunter des circuits cellulaires communs et les déréguler afin de croître et devenir un cancer.

Plusieurs évidences portent à croire, et il est largement accepté, que la tumorigénèse est un processus à plusieurs étapes qui impliquent et/ou qui sont le reflet d'une série d'altérations génétiques et épigénétiques telles que l'activation d'un oncogène dominant, de l'inactivation d'un suppresseur de tumeur ou d'une anomalie dans le fonctionnement des gènes, par exemple ceux qui sont responsables de la réparation de l'ADN (Wu 2001, Hanahan 2000). Il est généralement accepté que la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale maligne est dépendante d'un petit nombre de ces altérations génétiques. Ce nombre est compris dans une fourchette allant de deux à sept événements-clés limitants (Herzig 2002). Ces mutations séquentielles de gènes-clés contrôlant la croissance dans les cellules somatiques et leur descendance sont généralement vues comme des altérations multiples dans diverses voies de

signalisation essentielles au fonctionnement normal de la cellule (Wu 2001). Les événements critiques et/ou altérations essentielles dans l'évolution de la maladie néoplasique se manifestent notamment par la perte du contrôle de la prolifération cellulaire, par l'insensibilité aux signaux d'arrêt de la croissance, ou encore par la l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance. La progression du cancer peut être due à l'absence et/ou l'évasion de la mort cellulaire programmée (apoptose) et ainsi qu'à l'acquisition d'un pouvoir répliatif illimité. Finalement, la progression peut aussi être due à l'apparition d'une angiogénèse soutenue, au remodelage du tissu, à l'invasion du tissu environnant par les cellules tumorales, et à la dissémination de ces cellules tumorales dans des organes à distance, cellules alors appelées métastases (Hanahan 2000, Herzig 2002). Collectivement, les observations sur les cancers humains et les animaux modèles suggèrent que le développement tumoral progresse selon un procédé analogue à la sélection naturelle de Darwin, dans le sens qu'une succession de changements génétiques, chacun conférant un avantage à la cellule tumorale, peuvent mener à la conversion progressive d'une cellule normale en une cellule cancéreuse par une pression sélective (Hanahan 2000).

Les données épidémiologiques montrent que l'exposition à un carcinogène n'entraîne un risque de cancer cliniquement décelable qu'avec un délai de plusieurs années. Ceci laisse supposer que cette période de latence entre l'altération cellulaire fondamentale et la formation d'une tumeur maligne, correspond à la survenue d'événements cellulaires aux effets carcinogènes cumulatifs. L'apparition d'un clone cellulaire malin procède de l'accumulation

dans une seule cellule d'événements rares et non liés entre eux. Cette nécessité d'une succession dans le temps de multiples altérations cellulaires se reflète bien dans l'inégalité de fréquence de survenue d'un cancer en fonction de l'âge (Knudson 1975). On estime entre 2 et 7 le nombre d'événements indépendants, non obligatoirement tous mutagènes, nécessaires dans une même cellule pour entraîner sa transformation en cellule maligne. Chaque étape correspond au franchissement d'un des obstacles qui s'opposent physiologiquement, et en permanence, au développement d'une prolifération cellulaire anarchique. Le système immunitaire peut également s'opposer à cette prolifération. Voilà somme toute pourquoi l'apparition d'un cancer demeure un événement relativement rare.

1.3 Les virus, un système modèle de la transformation cellulaire :

Dans les années '60, la virologie subit un très grand essor et l'étude des virus fut le moteur d'une génération de chercheurs en biologie moléculaire travaillant sur des sujets variés allant de l'étude de la transcription, à la réplication et la régulation de l'ADN, en passant par les interactions ADN-protéines, sans oublier la transformation cellulaire. Nombreuses aujourd'hui sont les connaissances de biologie moléculaire qui sont dérivées de l'étude des virus. Ces derniers ont été utilisés comme système modèle à cause de leur manipulation facile *in vitro* comparé aux essais en animaux. Le potentiel oncogénique de certains virus de la famille des petits virus à ADN comme le Simian Virus 40 (SV40) et le Polyoma Virus (Py) ont été largement utilisés comme

système modèle pour étudier la tumorigénèse. Le virus du polyome peut induire la transformation de cellules de rongeurs *in vitro*. Dans ce contexte, les auteurs ne pouvaient pas les distinguer des cellules tumorales *in vivo* et ces cellules transformées donnaient des tumeurs lorsqu'elles étaient injectées dans des animaux permissifs (Vogt 1962). Les années qui suivirent furent le lieu d'intenses recherches pour identifier et caractériser les diverses protéines responsables de ce potentiel transformant induit par le virus. La transformation ne résulte pas de l'intégration du virus en tant que telle, mais bien de l'addition d'un gène viral spécifique (oncogène viral) au génome de la cellule. Il existe quatre protéines distinctes (grand T, moyen T, petit T et minuscule T) codées par une alternance du cadre de lecture de la région précoce du virus du polyome (Benjamin 2001). La protéine virale nommée antigène grand T est une protéine d'expression précoce qui est nécessaire et suffisante à l'établissement et à la maintenance de l'immortalisation de cellules primaires de rat (Rassoulzadegan 1983), bien qu'il ne soit pas le responsable *per se* de la transformation. Il s'agit donc d'un gène immortalisant, mais non transformant. Cette dernière caractéristique fait de PyLT un puissant outil *in vitro* pour l'étude de la progression tumorale.

1.4 L'immortalisation cellulaire :

L'immortalisation est un concept *in vitro* pour définir une population de cellules qui peuvent se diviser indéfiniment. Alors que l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, a été mise en place au cours de l'évolution pour limiter la

taille des populations cellulaires et éliminer certaines cellules indésirables, la sénescence est une autre forme de contrôle, qui se manifeste par un arrêt irréversible de la croissance cellulaire, connue sous le nom de sénescence répllicative. Les cellules animales ont le plus souvent un potentiel prolifératif limité. Après un certain nombre de générations, elles cessent de se multiplier, acquièrent un phénotype sénescant, entrent en crise et finissent par mourir. Par contre, certaines cellules peuvent acquérir la capacité de proliférer indéfiniment *in vitro*. On dit qu'elles sont établies en lignées, ou immortalisées. Trois types de cellules immortelles peuvent être distinguées : les cellules immortalisées spontanément *in vitro* (post-crise), les cellules tumorales, et les cellules immortalisées *in vitro* par l'introduction d'un ou plusieurs oncogènes viraux ou cellulaires. Dans le cas particulier d'une immortalisation induite par le virus du polyome, l'expression de l'antigène grand T semble suffisante pour immortaliser les cellules de rongeurs (Rassoulzadegan 1983), tandis que l'immortalisation des cellules humaines nécessite plusieurs événements indépendants (Newbold 1982). L'action immortalisante de l'antigène grand T du virus du polyome est corrélée à sa capacité de lier et d'inactiver une protéine cellulaire oncosuppressive très importante pour le contrôle du cycle cellulaire, la protéine du rétinoblastome (pRB) (Larose 1991). La capacité de certaines protéines virales de permettre l'immortalisation de cellules normales *in vitro* et de former des tumeurs dans les animaux modèles suggère que l'immortalisation pourrait être une des étapes précoces du processus pouvant conduire à la transformation néoplasique (Land 1983).

1.5 Les caractéristiques des cellules transformées *in vitro* :

Les cellules cancéreuses possèdent de nombreuses caractéristiques *in vitro* qui les distinguent des cellules normales. À l'aide de diverses expériences classiques (respectivement entre parenthèses), nous pouvons aisément exposer ces différentes caractéristiques des cellules dites 'transformées'. Les cellules néoplasiques poussent généralement plus rapidement que les cellules normales (courbe de croissance); elles peuvent pousser sans la présence d'un support solide (croissance en agar mou); elles peuvent envahir le milieu environnant (passage à travers une couche de matrigel); elles forment des foyers de cellules qui s'empilent au-dessus de la monocouche de cellules à confluence parce qu'elles ont subi une perte de l'inhibition de contact (essai de foyers); elles peuvent pousser dans un milieu pauvre en sérum et en facteurs de croissance de par leur indépendance face aux stimuli mitogéniques (croissance en milieu minimum) et elles peuvent aussi résister à l'apoptose et/ou s'évader de la mort cellulaire programmée (essai d'apoptose). De plus, les cellules transformées peuvent former des tumeurs (xénogreffes) lorsqu'injectées dans des souris *nu*, i.e. des souris ayant un système immunitaire déficient (formation de tumeurs en souris *nu*). Cette dernière expérience étant la plus '*stringente*' et la plus importante puisqu'elle conjugue un peu toutes les précédentes en plus d'être dans un contexte *in vivo*. Ces diverses caractéristiques des cellules cancéreuses représentent autant d'expériences que l'on peut effectuer pour prouver qu'une cellule a subi une 'transformation' vers le phénotype malin. Il est

important de noter qu'un gène peut être qualifié d'oncogène même s'il ne confère pas toutes les caractéristiques mentionnées ci-haut. Selon la force de cet oncogène ou du contexte cellulaire, un gène peut agir préférentiellement au niveau d'une ou plusieurs caractéristiques.

1.6 Les souris transgéniques :

Une souris transgénique est une souris dont le patrimoine génétique a été modifié afin de lui conférer des caractéristiques spécifiques telles que la capacité de reproduire les symptômes d'une maladie humaine. En d'autres termes, la souris possède un nouvel ADN intégré dans un chromosome de chacune de ces cellules. Ce nouvel ADN, aussi appelé transgène, provient généralement d'une autre espèce. Les techniques utilisées pour la production de souris transgéniques font appel à l'introduction de matériel génétique dans des ovules fertilisés (stade pré-embryonnaire). Ces modifications étant inscrites dans le patrimoine génétique des individus, elles sont transmissibles à leur descendance. Comme le transgène code pour une protéine particulière, la souris acquiert parfois une nouvelle fonction ou trait caractéristique.

1.7 La modélisation du cancer à l'aide des souris transgéniques :

Une leçon importante apprise de l'expérimentation sur des souris transgéniques qui modèlent la carcinogénèse est : un gène humain ou un oncogène candidat qui transforme les cellules *in vitro* peut amorcer un cancer *in*

vivo chez une souris transgénique. Cela supporte fortement l'hypothèse du rôle de ce gène dans la tumorigénèse humaine (Rangarajan 2003). Au cours des dernières années, la modélisation des cancers humains chez la souris a permis une incroyable percée dans l'étude des mécanismes sous-jacents à la pathogénèse du cancer, à la fonction des gènes reliés au cancer et à leurs interactions dans la tumorigénèse à plusieurs étapes (Wu 2001). Les modèles transgéniques de la tumorigénèse ont, à maintes reprises, appuyé la conclusion que la tumorigénèse chez la souris impliquait aussi plusieurs événements-clés limitant (Hanahan 2000). Les souris de laboratoire représentent un puissant outil expérimental pour comprendre la complexité de la pathogénèse des cancers humains. En fait, la plupart des concepts courants sur comment la tumorigénèse apparaît chez l'homme sont fortement influencés par le développement des souris modèles de cancer (Rangarajan 2003). Un des avantages majeurs des souris qui sont utilisées pour modéliser la tumorigénèse est l'isolation de tous les stades tumoraux, incluant le tissu normal, qui peuvent être analysés du point de vue pathologique, génétique et biochimique et deviennent des instruments d'investigation des gènes reliés au cancer et de leurs rôles dans la carcinogénèse (Herzig 2002). Bien qu'il existe des cas où l'utilisation de souris transgéniques n'est pas le meilleur système modèle, et bien qu'il s'agisse d'un système développant des tumeurs de façon forcée par l'homme, il n'en demeure pas moins un outil puissant de l'étude de la tumorigénèse *in vivo*.

1.8 La progression néoplasique des souris transgéniques PyLT :

Parmi les nombreux modèles de souris transgéniques décrites dans la littérature, notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement aux souris transgéniques porteuses de l'antigène grand T du virus de polyome (PyLT) parce qu'elles développent des tumeurs testiculaires avec une latence de 6 à 8 mois (Lebel 1994a). Parce que l'expression de PyLT est présente dès la naissance, cela suggère que la tumorigénèse est une progression en plusieurs étapes et qu'il existe des événements secondaires à l'expression de l'antigène grand T nécessaires à la transformation cellulaire et à la formation d'une tumeur. Ce modèle de souris transgéniques représente un bon système parce qu'il sert de substrat pour découvrir et étudier des événements qui sont impliqués dans la progression tumorale en générale de plusieurs types de cancer et pas seulement les cancers observés chez ce modèle. Un des avantages certains de ce modèle est de pouvoir plus facilement établir des lignées cellulaires immortelles à différents stades de la progression tumorale (même le tissu normal) dû aux propriétés immortalisantes de PyLT.

1.9 La découverte d'un nouveau gène, mTDE :

Le gène mTDE (*mouse Tumor Differentially Expressed*) a été cloné à partir d'un étalement différentiel de produits de PCR (*differential display*) entre des lignées cellulaires dérivées de tissus pré- et post-néoplasiques (*i.e.* avant et après l'apparition de tumeurs) (lignées nommées D37 et D4 respectivement) de

testicules de souris transgéniques porteuses de l'antigène PyLT sous le contrôle du promoteur de la métallothionéine-1 (MT) (Lebel 1994a). Ce promoteur peut être induit par la présence de métaux lourds. Dans ces souris, l'expression de PyLT a été détectée dans les reins, les vésicules séminales et les testicules. Chez ces souris, malgré l'expression de PyLT dès la naissance, des tumeurs testiculaires apparaissent vers l'âge de 8 à 15 mois. Selon le concept de latence déjà mentionné, cela suggère que d'autres événements sont nécessaires à la formation d'une tumeur. Le niveau d'expression de l'ARNm de mTDE s'accroît de 2 à 15 fois plus dans les lignées cellulaires dérivées de tumeurs testiculaires (D4) comparé à des lignées cellulaires dérivées de testicules pré-adénomateuses (D37) (Lebel 1994b). De plus, lorsque réinjectées dans des souris *nu* (athymiques), la lignée D4 forme constamment des tumeurs et non pas la lignée D37. Il est à noter que ces deux dernières lignées sont des populations mixtes de cellules Leydig et Sertoli et que ces deux types cellulaires sont nécessaires pour la formation de tumeurs en souris *nu* (Lebel 1994a). Un autre modèle de souris transgéniques exprimant l'antigène grand T du virus du polyome sous le contrôle du promoteur MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*), les souris MMTV-PyLT, développent entre autre des adénomes testiculaires et le gène mTDE est aussi surexprimé (4 fois plus) dans ces tumeurs (Lebel 1994b). Ces résultats suggèrent que le niveau de l'ARNm de mTDE augmente pendant la transition des testicules normaux à testicules adénomateux dans plus d'un modèle de souris transgéniques exprimant PyLT dans les testicules et que cet événement n'est pas un phénomène restreint au premier modèle de souris

(Lebel 1994b). De plus, l'expression de mTDE a été détectée par buvardage Northern dans les tissus normaux des organes murins suivants : le cerveau, le cœur, les poumons, le foie, l'estomac, l'intestin, le colon, la rate, les reins et les testicules. Ce qui suggère que son expression est ubiquitaire. Enfin, la surexpression de mTDE dans les lignées dérivées des tissus tumoraux et puisque le laboratoire était le premier à le décrire dans la littérature, a engendré la poursuite de l'étude de ce candidat intéressant et de son rôle dans la tumorigénèse.

1.10 La découverte de l'homologue humain, hTDE :

Puisque le gène mTDE a été identifié comme étant un candidat potentiel dans la progression tumorale chez la souris, le laboratoire voulait déterminer si le gène homologue humain pouvait aussi jouer un rôle dans le développement du cancer chez l'humain. Des amorces déduites à partir de deux séquences d'EST (*Expressed Sequence Tag*) provenant de bibliothèques fœtales d'ADNc et de placentas humains ont permis d'isoler un clone partiel du gène TDE humain qui a été utilisé pour cribler une banque d'ADNc de placentas humains (Bossolasco 1999). Plusieurs clones ont été isolés et séquencés. La compilation des séquences de ces clones suggère plusieurs points sur la séquence du gène : 1) qu'il existe deux signaux possibles de polyadénylation, 2) qu'il existe une forme tronquée en 3' du gène dû à un épissage alternatif, 3) que la moitié des clones possèdent un polymorphisme ponctuel à la position nt1386. Néanmoins, le plus long cadre de lecture (ORF) a 1419 nucléotides avec une séquence Kozak, un

codon de départ et un codon d'arrêt (Bossolasco 1999). La protéine de ce dernier produit contient 473 acides aminés et elle possède une masse moléculaire estimée à environ 52 kDa. Il est très important de noter que le présent mémoire ne fait état que du travail effectué avec cette dernière séquence, dite de la protéine pleine longueur, et que dorénavant dans le texte, cette séquence porte le nom par défaut de HTDE.

L'ADNc qui se veut l'homologue humain de mTDE (hTDE) code une protéine qui est 78% homologue à la séquence en acides aminés de la souris (86% d'homologie avec la séquence en acides nucléiques). Comme pour la séquence de souris, l'analyse de la séquence humaine prédit plusieurs domaines hydrophobes en hélices-alpha caractéristiques des protéines transmembranaires de type récepteurs serpentins et des protéines formant un canal ionique. Selon l'algorithme de prédiction utilisé, la protéine peut posséder jusqu'à 11 domaines transmembranaires. C'est pourquoi nous postulons que la protéine HTDE est associée à une membrane et nous proposons de déterminer sa localisation cellulaire. Au moment du clonage, ces deux protéines (murine et humaine) constituaient de nouvelles protéines qui n'avaient aucune homologie de séquences et/ou de domaines caractéristiques communs avec des protéines connues par l'analyse bioinformatique et le criblage des banques de données (Swissprot) disponibles à cette époque. Évidemment, la fonction de ces protéines n'est pas connue.

Le patron d'expression de l'ARNm de HTDE a permis de déterminer que comme chez la souris, des ARNm spécifiques à HTDE sont synthétisés par tous

les tissus humains examinés tels que : la prostate, les ovaires, le colon, le foie, les glandes mammaires et les poumons. En utilisant l'hybridation *in situ* par fluorescence (*Fluorescence In Situ Hybridization* = FISH), le gène TDE humain a été localisé dans la région q13.11 sur le long bras du chromosome 20 humain. Le projet de séquençage du génome humain a d'ailleurs confirmé ce résultat. Plus tard, le projet de séquençage du génome de la souris a permis d'identifier la position du gène mTDE sur le chromosome 2. Plusieurs gènes qui se localisent sur le chromosome 2 de souris sont syngéniques sur le chromosome 20 humain. HTDE est aussi situé dans une région du chromosome 20 connue pour être réarrangée (délétion, amplification, LOH) dans plusieurs types de cancers, notamment le cancer du sein. Des analyses de buvardage Southern ont permis de déterminer que l'amplification génique ne semble pas être le mécanisme de surexpression de HTDE dans les lignées tumorales examinées. Des analyses de buvardage Northern ont montré que l'expression relative de HTDE n'était pas augmentée dans plusieurs lignées cellulaires tumorales humaines différentes. Par contre, des analyses de buvardage Northern sur des tissus de cancer du poumon humain, ont montré une différence d'expression relative (de 4 à 10 fois plus) de l'ARNm de HTDE comparativement aux tissus normaux chez 3 des 5 patients examinés. Avec cet échantillonnage limité, aucun lien n'a pu être établi entre l'expression du gène et le type histopathologique de cancer du poumon chez ces patients (Bossolasco 1999). Ces observations intéressantes nous laissent croire que HTDE est un gène candidat prometteur vu qu'il est peut-être aussi impliqué dans la tumorigénèse du poumon chez l'humain.

1.11 Les autres protéines membres de la famille de HTDE :

Récemment, il a été possible d'identifier une nouvelle famille de protéines (incluant TDE murin et humain) avec de nombreuses séquences homologues de gènes codant pour des protéines membranaires avec une topologie à plusieurs domaines transmembranaires dans plusieurs eucaryotes allant de la levure à l'humain. Cependant, aucune fonction précise n'a pu être démontrée clairement pour les protéines de cette nouvelle famille, mais leur conservation suggère qu'elles ont un important rôle biologique. Dans le contexte de l'étude de HTDE, il devient important de savoir ce qui a été fait sur d'autres membres de la famille afin d'entrevoir s'il existerait des caractéristiques communes à ces différentes protéines.

Le deuxième membre (le premier étant mTDE/hTDE décrit par notre laboratoire) de la famille décrit dans la littérature est TPO1. Identifiée à partir d'une librairie de cDNA d'oligodendrocytes de rat, il a été postulé que la protéine TPO1 est potentiellement impliquée dans le développement et la différenciation des oligodendrocytes (Lee 1995) et la biogénèse de la myéline (Krueger 1997). L'expression de TPO1 a été démontrée dans le foie, les poumons et le cœur. Un maximum d'expression a été détecté dans le cerveau au jour P17-20 chez le rat. L'analyse d'une protéine TPO1 fusionnée à l'épitope myc a été transfectée dans des cellules COS-7. Ce résultat révèle une localisation cellulaire au niveau des structures du réticulum endoplasmique (RE) (Krueger 1997). Les auteurs n'ont

rien mentionné sur le fait que dans ce modèle, la protéine pouvait tout simplement être trop exprimée.

D'autres membres de cette nouvelle famille ont été identifiés comme TMS1 et TMS2. Retrouvés chez la souris, leur distribution tissulaire est la suivante : TMS1 a été détecté dans le cerveau, le thymus, les reins, le foie et les testicules, tandis que le signal de TMS2 est restreint au système nerveux central (SNC). Leur localisation cellulaire a été déterminée à l'aide de protéines fusionnées avec un épitope (*myc*, Flag ou HA) dans des cellules HEK293. Elles semblent visibles à la membrane plasmique (Grossman 2000). Une interruption ou abolition de l'expression (*Knock-Out*) du gène homologue de TMS1 chez la levure n'a pas permis d'observer un phénotype significatif sous les diverses conditions de stress testées, suggérant une redondance métabolique, une adaptation physiologique ou une divergence évolutive (Grossman 2000).

Après avoir procédé à une axotomie (coupure chirurgicale d'un axone, *in vivo*) et grâce à un criblage de NGS-DD-PCR (*N-linked glycosylation signal differential display PCR*), le groupe de Wada et ses collègues ont identifié chez la souris une protéine membre de la famille qu'ils ont appelée AIGP1 pour '*Axotomy Induced Glycosylated Protein 1*' (Aoki 2002). Inopinément, cette protéine est 100% identique à mTDE, mais ces chercheurs ont décidé de la nommer AIGP1 pour mettre l'accent sur la méthode utilisée pour l'identifier qui révèle une de ses modifications post-traductionnelles, la glycosylation. Ce groupe a été le seul jusqu'à maintenant à pouvoir générer un anticorps spécifique (ABEP56) contre un peptide qui reconnaît la protéine native avec une

bande du poids moléculaire attendu d'environ ~52 kDa, soit le poids estimé de la protéine déglycosylée détectée par immunobuvardage Western. Par immunohistochimie, ils ont montré que la protéine était localisée dans les neurones corticaux de cerveaux de souris en culture et qu'elle colocalisait avec des marqueurs spécifiques de l'appareil de Golgi par microscopie confocale dans la lignée cellulaire PC12. Toujours dans le but de trouver le rôle de cette nouvelle protéine, le même groupe a testé différentes conditions de stress sur les cellules neuronales corticales *in vitro*, et ils ont démontré, par des expériences de QRT-PCR (*Quantitative Real Time PCR*), que la bréfeldine A augmentait l'expression de AIGP1 de 6 fois. La bréfeldine A est une drogue qui perturbe très fortement les structures membranaires et bloque le processus sécrétoire dans toutes les cellules eucaryotes, est un outil très couramment utilisé pour étudier la dynamique des membranes associée aux processus de transport intracellulaire des protéines (Peyroche 1999). Ils ont aussi remarqué une augmentation de l'apoptose, par des expériences dites de 'TUNEL', de 3 fois dans des cellules Cos7 transfectées avec différentes constructions de AIGP1 comparativement au contrôle, β -galactosidase. De plus, ils ont déterminé grâce à différents mutants de délétions que la portion C-terminale de la protéine, surtout les domaines extramembranaires en boucle 8 et 9 étaient importants pour l'activité biologique de AIGP1. Ils proposent donc que AIGP1 est une protéine induite par l'axotomie dans les neurones chez la souris, qu'elle réside dans l'appareil de Golgi, que sa surexpression augmente l'apoptose, et qu'elle serait une protéine 'baromètre' du niveau de stress au niveau du RE et du Golgi.

Le groupe de Xu et ses collègues a cloné, à partir d'une librairie foetale humaine de cDNA, un membre de la famille TMS/TDE dont le gène s'appelle C5ORF12 (Xu 2003). Ils proposent que ce nouveau gène, localisé sur le chromosome 5p13, est l'homologue humain du gène TPO1 chez le rat. L'expression de C5ORF12 a été détectée par RT-PCR dans les tissus suivants : le placenta, les muscles squelettiques, la rate, le thymus, les testicules, les leucocytes périphériques, le cœur et le foie. Curieusement, aucun signal n'a été détecté avec la même méthode dans le cerveau adulte et, seulement un très faible signal a été vu dans une librairie d'ADNc humains provenant de cerveau foetal (Xu 2003).

Récemment, le groupe de Jen et ses collègues ont découvert un nouveau gène humain qui code pour une protéine différente mais très semblable, environ 50% d'homologie, avec HTDE. Tenant compte de cette ressemblance, ils ont appelé leur gène, TDE2 (Player 2003). TDE2 a été isolé grâce à une approche SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) de cancer de poumon de type NSCLC (*Non Small Cell Lung Cancer*). L'approche SAGE nous renseigne sur la distribution statistique de la population d'ARNm d'une cellule à un moment donné sans sélection préalable des gènes qui seront étudiés (Ladanyi 2003). Donc, les collègues de Player ont déterminé par hybridation *in situ*, par RT-PCR semi-quantitatif et par QRT-PCR que le niveau du transcrit de TDE2 est plus élevé dans les tumeurs que dans les tissus adjacents non malins de cancer du poumon. Toujours par QRT-PCR, ils ont observé des hauts niveaux d'expression de TDE2 dans les tissus normaux suivants : la vessie, les reins et

les muscles. Un niveau d'expression allant de faible à modéré a aussi été observé dans ces autres tissus normaux : l'estomac, le foie, la peau, le placenta et les ovaires. Aucun transcrit n'a été détecté dans le cerveau, la rate et le cœur. Le gène tde2 est localisé sur le chromosome 1p35.1. Aucune fonction n'a été trouvée pour le gène tde2, mais il demeure un candidat intéressant potentiellement impliqué dans la tumorigénèse du cancer du poumon chez l'humain.

1.12 Les objectifs de ce mémoire:

Les nombreux travaux effectués par les différents groupes présentés plus haut, nous apprennent que les protéines membres de la famille de TDE ont une certaine homologie entre elles (~30%), que leur localisation cellulaire exacte, bien que controversée, semble être associée à une membrane étant donné leur topologie avec plusieurs domaines transmembranaires et finalement que leurs fonctions restent obscures même si elles sont potentiellement impliquées dans la tumorigénèse de différents tissus. Dans le contexte de l'étude de HTDE, ces informations nous ont permis de comparer nos résultats avec ceux obtenus par d'autres groupes sur des protéines semblables et de déterminer la meilleure approche pour mieux caractériser la protéine HTDE.

L'objectif principal du travail présenté dans ce mémoire était de caractériser le potentiel oncogénique de cette nouvelle protéine qu'est HTDE

(*Human Tumor Differentially Expressed*). Les objectifs spécifiques de cette étude consistaient en :

1. La caractérisation de la protéine au niveau de sa localisation cellulaire et d'une de ses modifications post-traductionnelles, la N-glycosylation.
2. La détermination de son potentiel immortalisant *in vitro*.
3. La définition de son potentiel oncogénique *in vitro et in vivo*.
4. La génération d'une nouvelle souris transgénique exprimant le gène HTDE sous le contrôle du promoteur de la kératine 19.

La kératine 19 est présente en quantité significative dans les épithélia simples, stratifiés et/ou squameux et ce, dans une large distribution d'organes incluant l'épithélium ductal de la glande mammaire, les bronchioles, les alvéoles pulmonaires, la vessie, le colon et le petit intestin. C'est pourquoi le promoteur de la kératine 19 semble être le promoteur idéal pour diriger l'expression de notre gène d'intérêt dans une population cellulaire qui est susceptible et connue pour être un lieu privilégié pour le développement néoplasique (Lebel 1995) (Brembeck 2001).

Ces objectifs devraient nous permettre d'augmenter nos connaissances sur cette nouvelle protéine et d'étudier son rôle dans la tumorigénèse en général.

2.0 Matériels et Méthodes

2.1 La Biologie Moléculaire :

À moins d'indication contraire, les digestions de vecteurs décrites dans cette section ont été faites avec 10 unités d'enzyme de restriction approprié selon les conditions de tampons suggérées par les manufacturiers (Fermentas, New England Biolabs, Invitrogen) dans un volume final de 20 à 30 μ l à 37°C pendant 1 heure ou O/N (pendant la nuit). Les produits de digestion ont été purifiés sur gel d'agarose 1% (Invitrogen) contenant un tampon 0.5X TBE (45 mM Tris-Cl, 45 mM acide borique, 25 mM EDTA pH 8.0). Les bandes d'intérêt ont été extraites avec le *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Les ligations ont été effectuées dans un volume de 20 μ l à la température de la pièce pendant 5 minutes avec une ligase concentrée (Roche, 5 min Ligation Kit). Les produits de ligation ont été transformés dans des bactéries chimiocompétentes *E. coli* DH5 α (Invitrogen) par la méthode du choc thermique conformément aux instructions du manufacturier. Les bactéries transformées ont été sélectionnées à 37°C O/N sur des pétris LB avec l'antibiotique approprié *i.e.* avec ampiciline 100 μ g/ml ou avec kanamycine 30 μ g/ml. Les colonies bactériennes sélectionnées ont été cultivées dans du milieu LB (volume 2 à 5 ml) avec l'antibiotique approprié à 37°C O/N dans un incubateur (Labline, modèle Orbit) avec agitation à 250 rpm. Les ADN_s plasmidiques ont été récupérés par une méthode de lyse standard avec le *Qiagen Mini-Prep Kit* (Qiagen) et resuspendus dans un volume de 50 μ l de tampon TE (1 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0). Les plasmides d'intérêt, vérifiés par digestion enzymatique et électrophorèse sur gel d'agarose, ont été amplifiés de la façon décrite ci-haut sauf pour l'utilisation du *Qiagen Midi-Prep Kit*

(Qiagen) lorsqu'une quantité plus grande d'ADN était désirée. Toutes les constructions ont été séquencées à l'aide de paires d'amorces spécifiques synthétisées par la compagnie Alpha DNA inc., et ensuite analysées par le service de séquençage de l'Hôpital Notre-Dame à l'aide d'un séquenceur automatique (ABI Prism 3100). Pour toutes les manipulations requérant des bactéries, nous avons utilisé un milieu LB (Lurian-Bertani) composé de 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g NaCl, ajusté à pH 7.5, complété à 1 L, puis autoclavé 20 min. Afin de faire des pétris LB-agar, nous avons utilisé la même recette que précédemment puis ajouté 15 g d'agar avant de stériliser. Quand le milieu est refroidi à $\pm 50^{\circ}\text{C}$, l'antibiotique est ajouté (ampiciline ou kanamycine) à la concentration désirée (100 $\mu\text{g/ml}$ ou 30 $\mu\text{g/ml}$ respectivement), puis versé aseptiquement dans des boîtes de pétris stériles de 100 mm.

2.2 La PCR (Polymerase Chain Reaction) :

La PCR a été faite dans les conditions suivantes : 5 μl de tampon 10X Taq Pol, 250 ng de chaque amorce, 5 μl 2mM dNTPs, 0.5 μl d'enzyme Taq polymérase (Amersham) le tout complété à 50 μl avec de l'eau déionisée (Elga, Maxima Ultra Pure) dans des microtubes de 0.5 ml (Sarsted). Les produits de PCR ont été amplifiés (Stratagene, modèle Robotcycler Gradient 40) selon le programme suivant : 1) 94°C 5 min, 2) 94°C 1 min, 3) 58°C 1 min, 4) 72°C 1 min, 5) 34 cycles des étapes 2 à 4, 6) 72°C 5 min, 7) conservation des échantillons à 4°C . Vingt-cinq microlitres des produits d'amplification ont été visualisés sur un gel d'agarose 1%. La séquence pleine longueur de HTDE a été amplifiée à partir

de la librairie plasmidique originale d'ADN de placenta. La paire d'amorces utilisée est la suivante : l'amorce en 5' est 5'-CACGAGCTCAGCTGGCAGTTA-3' et l'amorce 3' anti-sens est 5'-CCGGATCCCACCTGAACTCCCGAC-3'. L'amorce 3' anti-sens a été élaborée afin d'éliminer le codon stop original et ajouter un site pour l'enzyme de restriction *BamHI*. La taille de l'amplicon est de 1495 pb.

2.3 Les constructions plasmidiques

2.3.1 PGKH-HTDE/GFP

La première construction décrite se nomme : PGKH-HTDE/GFP. Il s'agit d'une construction plasmidique du gène HTDE, en fusion avec la GFP, sous le contrôle du promoteur de la phosphoglycérate kinase (PGK) et contenant un gène de résistance à l'hygromycine. Le promoteur PGK est un promoteur fort et s'exprime dans plusieurs types cellulaires. Le plasmide contenant le promoteur PGK a déjà été décrit ailleurs (McBurney 1987). La construction a été effectuée à partir de la séquence pleine longueur d'un ADNc correspondant au gène HTDE cloné dans un vecteur pBlueScript (Bossolasco 1999). Il est à noter qu'une mutation a été introduite par PCR (voir section 2.2 PCR) dans cette dernière séquence en C-terminus, pour enlever le codon stop à la fin de HTDE et ajouter un site de restriction *BamHI*, afin de permettre la poursuite du cadre de lecture et de créer une protéine de fusion. Une digestion *SacI/BamHI* a permis d'isoler un fragment de 1.5 Kb correspondant à l'ADNc de HTDE. Le sous-clonage de ce dernier fragment dans le plasmide PGKH-GFP (Rodier 2004) digéré *SacI/BamHI*

a permis de créer une protéine de fusion HTDE/GFP sous le promoteur PGK, en plus de posséder un gène de résistance à l'hygromycine (dérivé du plasmide commercial pCEP4 de la compagnie Invitrogen) pour la sélection. Cette construction est schématisée dans la figure suivante :

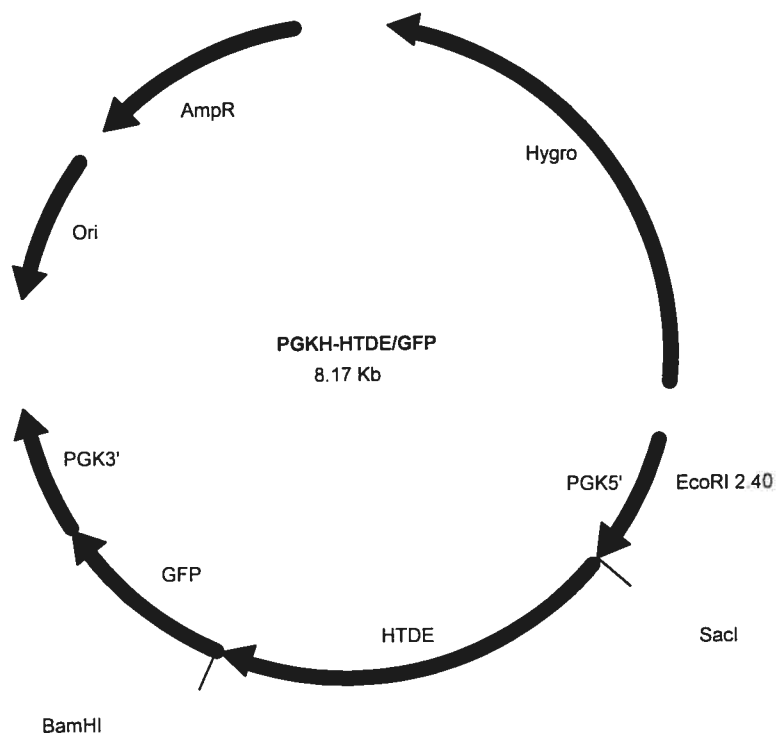


Figure 2. Représentation graphique du plasmide PGKH-HTDE/GFP.

2.3.2 PGKH-HTDE

Cette construction contient le gène HTDE pleine longueur sous le contrôle du promoteur PGK, mais cette fois sans la fusion avec GFP. La stratégie de clonage a été la suivante : le fragment de 1.5 kb correspondant à l'ADNc de

HTDE, contenant son ATG et son codon 'stop', a été obtenu de par la digestion enzymatique du plasmide (pBlueScript) original de la librairie de placenta humain avec les enzymes *SacI* et *SspI*. Le plasmide PGKH-GFP a été digéré avec l'enzyme *BsrGI*, les extrémités ont été remplies avec la T4 DNA polymérase et le plasmide a été digéré avec l'enzyme *SacI* afin d'éliminer le fragment correspondant à la GFP. Le fragment *SacI/SspI* de HTDE a été sous-cloné dans le vecteur PGKH-GFP digéré *SacI/BsrGI* pour devenir PGKH-HTDE. Cette construction est schématisée dans la figure suivante :

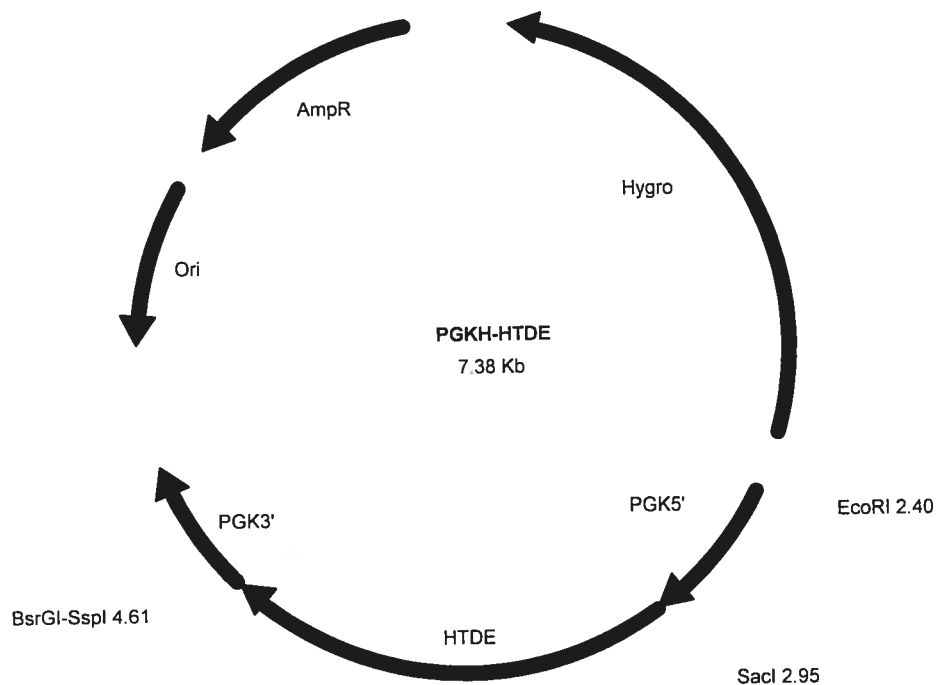


Figure 3. Représentation graphique du plasmide PGKH-HTDE.

2.3.3 K19-HTDE/GFP

Le vecteur pK19-HTDE/GFP encode la protéine HTDE en fusion avec la protéine GFP, sous le contrôle du promoteur de la kératine 19 (K19). Cette construction fut réalisée par le remplacement du promoteur du CMV (*Cytomegalovirus*) par le promoteur K19 dans le vecteur commercial d'origine : pEGFP-N1 (Clontech). Le plasmide pEGFP-N1 fut digéré avec les enzymes *AseI/NheI* et les extrémités (5' *overhangs*) ont été remplies à l'aide de 1 μ l (~5 unités) de l'ADN polymérase T4 (Fermentas) directement dans le tampon de digestion avec l'ajout de dNTPs 0.1 mM (concentration finale) à 11°C pendant 15 min avant d'arrêter la réaction par chauffage à 75°C pendant 20 min. Le plasmide p12A (Royal 1996) a été digéré avec l'enzyme *BamHI* afin d'isoler un fragment de 2.1 Kb représentant le promoteur K19. Les extrémités ont été remplies avec le même traitement à la T4 DNA Polymerase décrit ci-haut (voir section 2.1 Biologie Moléculaire) et la ligation a été effectuée telle que mentionnée ci-haut avec une ligase concentrée (Roche). Cette construction est schématisée dans la figure suivante :

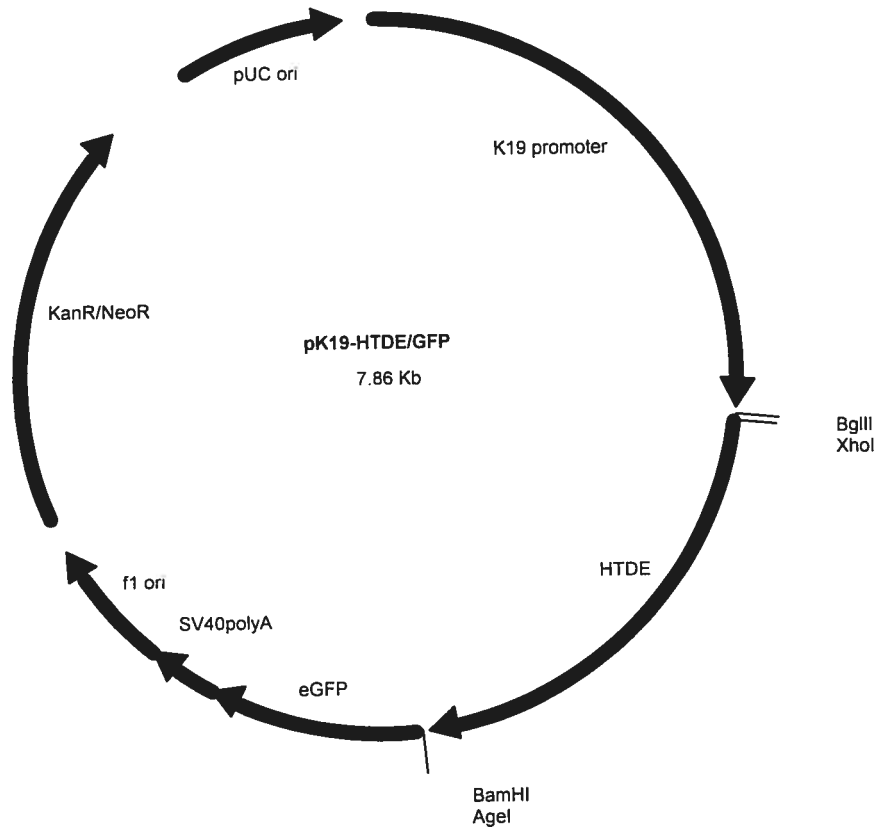


Figure 4. Représentation graphique du plasmide K19-HTDE/GFP.

2.4 La Culture Cellulaire :

La lignée cellulaire Rat-1 a été achetée de l'ATCC (*American Type Culture Collection*) et elle a été testée pour la présence de pathogènes par les services diagnostiques en recherche animale Muradil inc (*Missouri State University, USA*). La lignée HEK293 est un don généreux du Dr Mark Prentki (Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Notre-Dame), Québec). La lignée cellulaire humaine TOV112D (Provencher 2000) a été dérivée au

laboratoire à partir d'une tumeur maligne endométrioïde d'un cancer épithélial de l'ovaire. La lignée TOV112D a été cultivée dans du milieu OSE (*Ovarian Surface Epithelium*) contenant 4.95 g/L de Med199 (Sigma), 7.25 g/L de Med105 (Sigma), 12 mM de bicarbonate de sodium, le tout ajusté à pH 7.4 et supplémenté avec 10% sérum bovin fœtal (Gibco), 50 µg/ml gentamycine (Wisent) et 5 µg/ml amphotéricine B (Gibco). Les autres lignées cellulaires ont toutes été cultivées dans le milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) supplémenté avec 10% sérum bovin fœtal, 50 µg/ml gentamycine et 5 µg/ml amphotéricine B. Les cellules ont été maintenues à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ (Heraeus, modèle Heracell). En général, les cellules étaient passées par dilution avant qu'elles n'atteignent la confluence environ tous les trois jours. Pour une conservation à plus long terme, un culot de cellules (Baxter Biofuge, 2500 rpm, 5 min) étaient mélangées avec 70% v/v de sérum bovin fœtal et 30% v/v DMSO (50% DMSO, 250 mM Tris-Cl, 70 mM dextrose, 60 mM citrate de sodium) avant d'être congelées à -80°C (Revco) puis conservées dans un réservoir à azote liquide (Thermoline, Locator 8).

2.5 Les Transfections :

Les lignées cellulaires ont été transfectées à environ 70% de confluence (NIKON eclipse TE300) avec 4 µg d'ADN avec le réactif Lipofectamine (Invitrogen) ou 2 µg d'ADN avec le réactif Fugene (Roche) selon les recommandations des manufacturiers. L'efficacité de transfection était jugée satisfaisante (≥30-40% des cellules transfectées) après la visualisation par

microscopie en fluorescence (Nikon modèle TEDH100W) de l'expression de la GFP 48 h après la transfection du vecteur contrôle PGKH-GFP. Afin d'obtenir des clones stables, les cellules devaient subir une sélection (48 h après la transfection) avec 75 $\mu\text{g/ml}$ d'hygromycine (Roche) pendant deux à trois semaines avant d'être repiquées à l'aide d'anneaux de clonage (Fisher) et amplifiées séquentiellement dans des plaques de 24, 12, 6 puits et finalement dans des pétris 100 mm (Falcon).

2.6 La microscopie en fluorescence :

Les cellules des lignées cellulaires HEK293, TOV112 ou A549 ont été transfectées avec HTDE/GFP et elles ont été étalées sur des petites lamelles rondes de 12 mm (Fisher) dans le fond d'un pétri 100 mm. En transfection transitoire après 48 h, les lamelles ont été prélevées avec des pinces stériles et déposées sur des lames de verre (Corning). Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope (Nikon, modèle TEDH100W, λ 365-420nm) à inversion à fluorescence avec un objectif 40-100X à l'huile. Les photos des cellules ont été prises avec un appareil photo numérique (Nikon Coolpix 990) en mode macro automatique.

2.7 Les immunobuvardages Western :

Une monocouche de cellules Rat-1 transfectées avec HTDE/GFP a été lavée deux fois avec du PBS (10 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM Na_2HPO_4 , 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, pH 7.4) et récoltée avec un policeman (Sarsted). Les cellules ont

été transférées dans un microtube avant d'être lysées sur glace pendant 10 min avec 100 μ l d'un tampon contenant : 50 mM Tris-Cl pH 6.8, 100 mM dithiothréitol, 2% SDS, 10% glycérol (aussi appelé tampon de chargement). Les protéines ont été resuspendues par pipetage et passées brièvement au désintégrateur sonique (Scientific Instruments, modèle KS212, puissance 10-12 pendant 30 sec sur glace), puis centrifugées 10 min à 13000 rpm à 4°C (Biofuge 13, Baxter) et les surnageants contenant les protéines ont été transférés dans un autre tube. La concentration des extraits de protéines totales a été déterminée à l'aide du réactif (Bradford Reagent 5X, Bio-Rad) selon la méthode de Bradford par colorimétrie à λ 595nm (Pharmacia, modèle UltroSpec Plus LKB). Une quantité égale de lysats de protéines totales (généralement de 20-50 μ g), ou bien un volume de 10 μ l d'un marqueur moléculaire (full range Rainbow marker, Amersham), ont été dilués dans la solution de chargement (tampon de chargement + colorant bleu de bromophénol 0,1%), bouillis 5 min avant d'être chargés et séparés sur un gel (9% acrylamide) SDS-PAGE et transférés sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) en utilisant une cuve à transfert (Bio-Rad) à 100 Volts, ~200 mA, 1 heure, à 4°C dans un tampon de transfert contenant : 24 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol. L'uniformité du transfert a été vérifié en colorant les membranes avec du rouge Ponceau (0.25% w/v Ponceau S, 0.5% acide acétique glacial) et en rinçant ensuite avec du PBS. Les membranes ont été bloquées dans une solution de 5% de lait sans gras (poudre diluée dans du PBS 1X, 0.1% Tween 20 ; PBST) pendant la nuit à 4°C. L'immunobuvardage a été réalisé comme suit : les membranes ont été incubées avec une dilution

dans le PBST de l'anticorps primaire monoclonal de souris anti-GFP 1:8000 (JL-8, Clontech) ou β -actine 1:10000 (AC-14, Abcam) pendant 3 h et 45 min respectivement. L'anticorps secondaire anti-souris IgG conjugué à la peroxidase HRP (*Horseradish Peroxidase*) (Santa Cruz Antibodies) a été utilisé à une dilution de 1:12000. Les membranes ont été lavées après chaque incubation avec les anticorps avec une solution de PBS avec 0.2% Tween 20 pendant 30 min en remplaçant fréquemment la solution de lavage. Les bandes spécifiques ont été révélées par ECL (Amersham) selon les recommandations du manufacturier et exposées, sur une période variant de 15 sec à 5 min, à des films X-Omat (Kodak), développés à l'aide d'une machine à développement automatique (M35A, Kodak).

2.8 Les buvardages Northern :

Afin d'extraire les ARN totaux (Sambrook et al.), une monocouche de cellules Rat-1, rincée 2 fois au PBS, a été récoltée à l'aide d'un policeman (Sarsted) et resuspendue dans 1 ml de réactif Trizol (Gibco), suivi d'une extraction au phénol:chloroforme, d'une précipitation à l'isopropanol et d'un lavage à l'éthanol 70%. Les culots d'ARN obtenus après centrifugation ont été resuspendus dans l'eau DEPC pour éviter toute dégradation. La quantité des ARNs a été estimée par spectrométrie à $\lambda 260$ nm (Pharmacia, Ultrospec Plus LKB). La qualité des ARNs a été vérifiée par électrophorèse sur gel de 1 μ g d'ARN. Dix μ g d'ARN totaux ont subi une électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% dans un tampon contenant : 20 mM MOPS (acide sulfonique propane 3-(N-

morpholine) pH 6.8), 8 mM d'acétate de sodium, 1 mM EDTA et 2.2 M formaldéhyde pendant 3 heures à 125 Volts, ~115 mA (Pharmacia LKB, GPS 200/400). Les échantillons ont été chargés dans un tampon contenant : 2.2 M formaldéhyde, 1 M formamide, 25 mM NaP, avant d'être dénaturés à 55°C pendant 5 min, placés 5 min sur glace et ajoutés à 5 µl d'un mélange de colorant de chargement orange 10X (0.15 g Orange G, 50% glycérol) contenant 0.625 mg/ml de bromure d'éthidium (EtBr). Une fois la migration terminée, le gel a subi un traitement 2 X 10 min avec une solution de SSC 1X (0.15 M NaCl, 0.15 M citrate de sodium pH 7.0), 0.05 M NaOH, suivi d'un traitement de 1 X 20 min avec une solution de SSC 10X. Les ARNs ont ensuite été transférés sur une membrane de nylon chargée (Genescreen Plus, NEN) par capillarité dans un tampon de SSC 10X (Maniatis et al.). Les ARNm ont été fixés à la membrane par un traitement aux rayons ultra-violet (0.12 Joules/cm²) pendant 40 sec (UV Stratalinker 2400, Stratagene). Un jour avant l'hybridation, environ 50 ng d'un ADNc de 1.6 Kb correspondant au fragment complet *XhoI/BamHI* de HTDE a été utilisé pour faire une sonde radiomarquée (Rediprime™ II, Amersham) avec 50 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP. La sonde a été purifiée des nucléotides non-incorporés et resuspendue dans 50 µl du tampon d'éluion (Nucleotide Removal Kit, Qiagen). La membrane a été insérée dans une bouteille et incubée dans la solution d'hybridation suivante : 1% SDS, 1 M NaCl, 10% sulfate de dextran et 100 µg/ml d'ADN dénaturé de sperme de saumon en plus de la sonde radioactive dénaturée, pendant 24 h à 60°C dans un four rotatif à hybridation (Hybaid). La membrane a ensuite subi les lavages suivants : 1 X 5 min dans une solution de

SSC 2X à température de la pièce, 1 X 15 min SSC 1X à 60°C et finalement 1 X 15 min SSC 1X, 0.1% SDS à 60°C. Puis la membrane a été exposée à des films XAR-5 (Kodak) dans une cassette avec un écran amplificateur à une température de -80°C pendant 4-7 jours avant le développement. Pour réhybrider avec une autre sonde spécifique, la membrane était traitée avec une solution de SDS 0.1% bouillant, puis incubée pendant une heure à 80°C dans un four rotatif à hybridation (Hybaid). Pour s'assurer de l'élimination du premier signal, la membrane était exposée O/N dans une cassette avec un film XAR-5 et un écran amplificateur à une température de -80°C.

2.9 L'étude de la glycosylation :

Différents clones stables de cellules Rat-1 exprimant le vecteur HTDE/GFP ont été traités avec 10 ng/ml de tunicamycine (Sigma). La tunicamycine est un agent inhibant la N-glycosylation des protéines lorsqu'il est ajouté au milieu de culture (Seifert 2003) pendant 48 h. Les protéines totales des cellules ont été récoltées et lysées pendant 30 min sur glace dans un tampon contenant : 10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM dithiothréitol (DTT), 0.5% Nonidet P40 (NP-40), 0.5 mM phénylméthylsulfonyl (PMSF), 1 µg/ml leupeptine, 1 µg/ml pepstatine, 5 µg/ml aprotinine, 10 mM NaF, 0.4 mM Na₃VO₄, 1.5 mM Na₂MoO₄ et 1 mM β-glycérophosphate. Ensuite, ces protéines ont été utilisées pour procéder à un immunobuvardage Western selon la méthode déjà décrite ci-haut (voir section 2.7 immunobuvardage Western).

2.10 Les essais d'immortalisation :

Les cultures primaires d'embryons de rat ont été isolées à partir d'embryons de 16 jours de rat Fisher (Charles Rivers Laboratories, St-Constant, Qc). Les embryons ont été récoltés par dissection après avoir euthanasié la mère par asphyxie au CO₂. Les embryons ont été émincés au ciseau, débarrassés de la tête et du foie, et placés dans du milieu DMEM avec 200 U d'extrait brut de collagénase pendant une heure à 37°C. Les cellules ont été dispersées par pipetage, lavées et étalées dans du milieu complet. Les cellules ont été ensemencées à une densité de 3×10^5 cellules par pétris de 100 mm avant d'être transfectées avec le réactif Fugene (Roche). L'efficacité de transfection a toujours été vérifiée par fluorescence puisque les constructions codaient pour des protéines fusionnées à la GFP. Les constructions suivantes ont été transfectés : PGKH-GFP, PGKH-LT/GFP et PGKH-HTDE/GFP. Les cellules ont été lavées avec du PBS 48 h après la transfection, passées à une dilution 1:3 avant d'être soumises à une sélection à l'hygromycine (35 µg/ml) pendant deux à trois semaines avant de pouvoir isoler des clones résistants. Les clones résistants (20 à 100 clones/constructions) ont été repiquées avec la même méthode des anneaux de clonage déjà décrite ci-dessus (voir section 2.5) et transférées dans des plaques de 24 puits avec du milieu complet. Ces clones ont été maintenus en culture et amplifiés avant qu'ils n'atteignent la confluence. Les colonies étaient considérées immortelles si elles pouvaient être passées à une dilution 1:5 au moins cinq fois dans des pétris 100 mm (Pilon et al.).

2.11 Les essais de perte de l'inhibition de contact :

Selon une adaptation du protocole d'essai de foyers (Rassoulzadegan 1982 et Land 1983), 5×10^5 cellules Rat-1 représentant un clone stable transfecté avec la construction PGKH-HTDE/GFP ont étéensemencées dans des pétris de 100 mm. Les cellules ont atteint la confluence en quelques jours et elles ont ensuite été laissées à confluence pendant au moins 21 jours (28 jours au maximum). Les cellules ont été cultivées dans du DMEM complet supplémenté avec 75 µg/ml d'hygromycine et le milieu de culture a été changé au moins deux fois par semaine. Les cellules ont ensuite été fixées au PBS : méthanol (1 :1) et colorées avec 5 ml de bleu de Giemsa 1:5 (solution mère, VWR) avec une faible agitation (VWR rocking platform modèle 200 vitesse 4) toute la nuit. Les pétris ont ensuite été lavés avec de l'eau distillée pendant 24 h pour enlever l'excédant de colorant toujours avec une faible agitation. Les pétris de cellules séchées ont été pris en photo avec une caméra numérique (Nikon CoolPix 990) en mode macro automatique.

2.12 Les xénogreffes chez la souris *nu* :

Des souris *nu* (CRL : Nu/Nu Br) âgées de 4-7 semaines (Charles Rivers, St-Constant, Qc) ont été injectées une seule fois (six souris différentes par condition) sur le flanc supérieur de la cuisse gauche avec $2,5 \times 10^6$ cellules représentant des clones stables de cellules Rat-1 transfectées avec différentes

constructions, la lignée cellulaire Rat-1 non-transfectée ou du PBS stérile. Des clones stables des constructions suivantes ont été utilisés : PGKH-HTDE, PGKH-HTDE/GFP, PGKH-GFP. Les volumes des tumeurs ont été mesurés deux fois par semaine sur une période de quatre mois. Les souris étaient sacrifiées lorsque la tumeur atteignait le point limite ou causait un préjudice sérieux à la santé de l'animal selon la procédure standard C11 des règlements du Conseil Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA).

2.13 L'immunohistochimie :

Les échantillons des tumeurs ont été fixés dans la formaline (Tissue Fix), inclus dans la paraffine, puis coupés et colorés à l'aide d'une méthode utilisant l'immunoperoxydase (Shi 1991). Les tissus ont été réhydratés et traités avec une solution de H_2O_2 3% pour éliminer l'activité de la peroxydase endogène. Ensuite, ils ont été incubés 10 min dans un tampon citrate pH 6.0 à 95°C afin de révéler les antigènes. Les tissus ont été bloqués en utilisant le réactif de blocage (LSAB2 Kit, DAKO), 1% w/v BSA et du sérum normal de chèvre. Les anticorps primaires de lapin suivants ont été utilisés : anti-GFP (un don du Dr Bernard Massie de l'Institut de Recherches en Biotechnologie, Montréal, Qc), anti-Ki67 (Ab-3, Neomarkers), anti-PCNA (FL-261, Santa Cruz) et anti-Cycline E (C19, Santa Cruz). Les anticorps primaires ont été incubés pendant une heure à la température de la pièce dans une chambre humide et les dilutions optimales d'anticorps ont été évaluées par dilutions en série. Un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-GFP a été utilisé pour la détection de la protéine de

fusion HTDE/GFP sur les coupes histologiques (Leika RM2125) de tumeurs formées par xénogreffes (voir section souris *nu*) de différents clones stables. Un anticorps secondaire anti-lapin conjugué à la biotine (Jackson Immuno Research Laboratories) a été utilisé à une concentration de 1:500 pendant 20 min avec chacun des anticorps primaires. L'anticorps tertiaire conjugué à la streptavidine (LSAB2 Kit, DAKO) a été utilisé tel quel pendant 20 min pour toutes les conditions. Les zones immunodétectées ont été révélées à l'aide de diaminobenzidine (DAB) contenant 0.3% de peroxyde d'hydrogène comme substrat de la peroxidase. Les noyaux ont été contre-colorés avec l'hématoxyline. La substitution de l'anticorps primaire par du PBS a servi de contrôle négatif. La coloration des lames et la localisation des signaux ont été évalués par microscopie en lumière visible à un grossissement 200X (Zeiss) par trois observateurs différents.

2.14 La souris transgénique K19-HTDE/GFP :

La construction plasmidique pK19-HTDE/GFP a été microinjectée (10 ng/ml) (Leika) dans des pronoyaux de souris pseudo-gestantes FVB par le personnel du service de souris transgéniques de l'animalerie (Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Hôpital Notre-Dame), Montréal, Qc) et ont été réimplantés dans des femelles porteuses CD1 (Transgenesis Techniques, 2002). Le génotypage a été effectué au laboratoire par une extraction d'ADN de queues de souris et par buvardage Southern avec une sonde spécifique au transgène (Voir section 2.15).

2.15 Le géotypage de souris par buvardage Southern :

Afin d'effectuer le géotypage des souris, un bout de queue a été récolté par dissection et digéré O/N dans un tampon contenant : 10% SDS (w/v), 10 mM Tris pH 7.9, 2 mM EDTA, 40 mM NaCl et 200 µg/ml de protéinase K dans un bain à 55°C avec agitation (Julabo SW-20C) pendant 16 h avant d'effectuer une extraction par phénol:chloroforme et une précipitation de l'ADN à l'éthanol froid. Dix µg d'ADN génomique ont été digérés (à 37°C O/N) avec un total de 16 unités des enzymes de restriction *XhoI* et *NotI* dans 30 µl (3 µl tampon 10X NEB3, 0.5 µl RNase A, 0.03 µl 100X BSA). Le jour précédent l'hybridation, approximativement 50 ng d'un fragment d'ADN d'environ 2.2 Kb correspondant à l'ADNc de HTDE en fusion avec GFP a été digéré avec *XhoI/NotI*, purifié sur gel (Gel Extraction Kit, Qiagen), afin d'être utilisé comme sonde radiomarquée avec 50 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (Rediprime II, Amersham). La sonde a été purifiée des nucléotides non incorporés et resuspendue dans 50 µl du tampon d'éluion (Nucleotide Removal Kit, Qiagen). Après avoir subi une électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%, le gel a été traité 1 X 10 min avec 0.25 M HCl, puis 2 X 15 min avec 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH suivi de 2 X 15 min avec 1.5 M NaCl, 1 M Tris-Cl (pH 8.0) à la température de la pièce. Les ADNs ont ensuite été transférés par capillarité (O/N) sur une membrane de nylon chargée (Genescreen Plus, Perkin Helmer) dans un tampon SSC 10X (Maniatis et al.). Les ADNs ont été fixés à la membrane par un traitement aux rayons ultraviolets (UV Stratalinker 2400, Stratagene). La membrane a été roulée et incubée dans une bouteille et un four

à hybridation à 65°C (Hybaid) O/N dans la solution d'hybridation suivante : 1% SDS, 1 M NaCl, 10% sulfate de dextran et 100 µg/ml d'ADN dénaturé de sperme de saumon en plus de la sonde radioactive dénaturée. Une hybridation témoin a été faite selon la même méthode contre le gène de la β -actine. La membrane a été lavée de la façon suivante : 1 X 5 min avec une solution de SSC 2X à la température de la pièce, 1 X 30 min avec une solution de SSC 1X avec 0.1% SDS à 65°C et finalement 1 X 30 min avec une solution de SSC 0.5X avec 0.2% SDS à 65°C. La membrane a ensuite été exposée à des films XAR-5 (Kodak) avec un écran amplificateur pendant 4-5 jours à une température de -80°C avant le développement.

2.16 Les tests statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA à l'aide du logiciel InStat3™ (version 3.0) distribué par GraphPad sur www.graphpad.com

3.0 Résultats

3.1 La localisation cellulaire de HTDE/GFP :

Le premier objectif dans la caractérisation de la protéine HTDE était de déterminer sa localisation cellulaire. Connaître la localisation cellulaire d'une protéine et savoir dans quel compartiment cellulaire elle est située représente un indice important de sa fonction. L'analyse bioinformatique de la séquence en acides aminés de HTDE prédit que la protéine possède plusieurs domaines hydrophobes potentiellement transmembranaires. Afin d'investiguer la localisation cellulaire de HTDE, nous avons créé une protéine de fusion avec la protéine GFP. Nous avons généré et transfecté la construction PGKH-HTDE/GFP (figure 5), de façon transitoire, dans des cellules HEK293, A549 et TOV112D. Nous avons observé la localisation cellulaire de la protéine de fusion en microscopie à fluorescence sur des cellules non fixées. La figure 5 présente des photos numériques qui montrent la localisation cellulaire de la protéine de fusion HTDE/GFP dans quelques types cellulaires dont les HEK293, A549 et TOV112D. Les cellules HEK293 sont couramment utilisées dans la littérature pour l'expression de protéines de type récepteur avec plusieurs domaines transmembranaires. Les cellules de la lignée A549 sont des cellules ayant un cytoplasme abondant permettant une meilleure visualisation de ce compartiment cellulaire. Les cellules de la lignée TOV112D sont des cellules ovariennes humaines épithéliales. Dans ces trois types cellulaires, nous constatons qu'une proportion du signal correspondant à la protéine de fusion HTDE/GFP se localise à la membrane plasmique (photos de droite). La transfection du vecteur vide contenant seulement la protéine GFP (PGKH-GFP ou K19-GFP) donne un signal

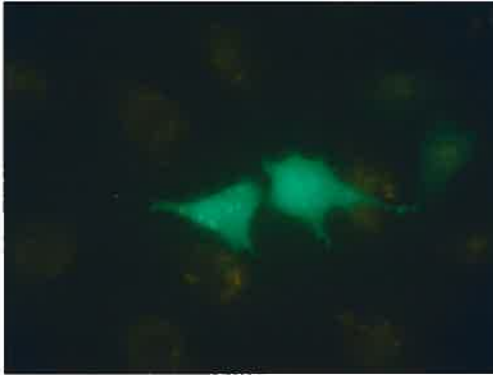
uniformément distribué à travers le cytoplasme et le noyau de la cellule (photos de gauche). Nous avons également observé la localisation à la membrane plasmique de la protéine HTDE/GFP dans les autres lignées cellulaires suivantes : Rat-1, NIH3T3, TM4, Cos-1 et CV1 (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que la localisation de la protéine de fusion HTDE/GFP est située à la membrane plasmique et ce, dans plus d'un type cellulaire.

Figure 5. Localisation cellulaire de la protéine de fusion HTDE/GFP, dans les lignées cellulaires HEK293, A549 et TOV112D. Les photos de gauche représentent la localisation de la protéine GFP seule alors que les photos de droite montrent les cellules transfectées avec la protéine de fusion HTDE/GFP. Le grossissement est de 400X pour toutes les photos sauf pour HTDE/GFP dans les HEK293 (panneau A de gauche) qui est de 1000X.

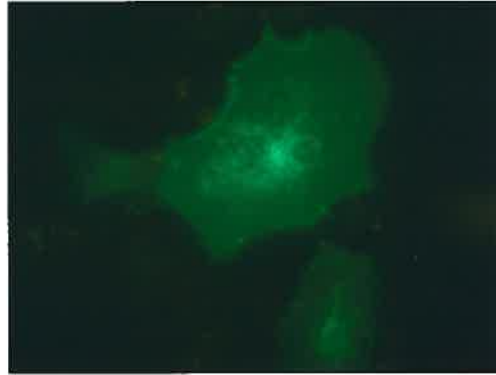
FIGURE 5

Localisation cellulaire de la protéine de fusion HTDE/GFP

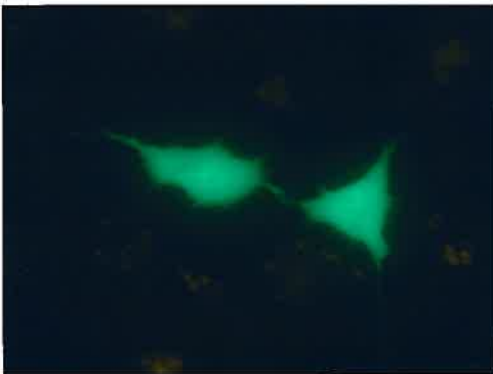
HEK293 + PGKH-GFP



HEK293 + PGKH-HTDE/GFP



A549 + PGKH-GFP



A549 + PGKH-HTDE/GFP



TOV112D + K19-GFP



TOV112D + K19-HTDE/GFP



3.2 La caractérisation des clones stables par buvardage Northern :

La génération de clones stables exprimant le gène htde était une étape préalable à la réalisation des études fonctionnelles présentées dans ce mémoire. Nous avons transfecté des cellules Rat-1 avec les constructions PGKH-HTDE/GFP et PGKH-HTDE (figure 6) afin d'obtenir des clones stables exprimant la protéine HTDE. Afin de caractériser le niveau d'expression de l'ARNm de HTDE dans ces clones stables, nous avons effectué un buvardage Northern. La figure 6 montre le niveau d'expression de l'ARNm de HTDE dans les différents clones stables des constructions suivantes : PGKH-HTDE/GFP (panneau A) et PGKH-HTDE (panneau B). On peut également observer, pour chaque buvardage, l'expression du gène β -actine servant de contrôle interne pour déterminer l'expression relative. Dans le panneau A, on remarque que la lignée cellulaire Rat-1 non-transfectée ou transfectée seulement avec le vecteur vide (PGKH-GFP) n'expriment pas le gène d'intérêt. Les clones n° 2, 6, 16 et 18 expriment le gène d'intérêt. Dans le deuxième panneau, on remarque que le témoin (rat) n'exprime pas le gène d'intérêt alors qu'on détecte l'expression de HTDE dans la plupart des clones surtout les clones n° 21, 24 et 34. Ces résultats suggèrent que nous avons obtenu des clones stables qui expriment notre gène d'intérêt à différents degrés dans des cellules Rat-1.

FIGURE 6

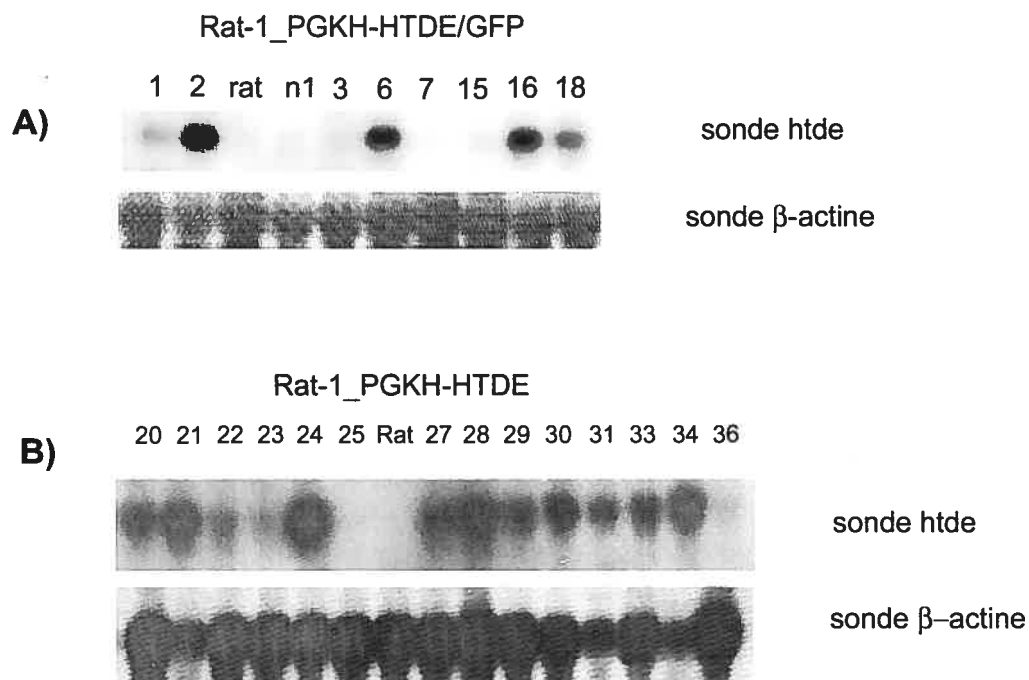


Figure 6. Buvardage Northern des clones stables Rat-1_PGKH-HTDE/GFP (panneau A) et Rat-1_PGKH-HTDE (panneau B). Le puits marqué Rat correspond aux cellules Rat-1 non-transfectées. Le puits marqué N1 correspond aux cellules Rat-1 transfectées avec le vecteur PGKH-GFP seulement. L'hybridation contrôle avec β -actine est montrée sous le patron d'expression de l'ARNm de htde ou htde-GFP pour chacun des clones correspondants.

3.3 La caractérisation des clones stables par immunobuvardage Western :

Nous avons transfecté des cellules Rat-1 avec la construction PGKH-HTDE/GFP (figure 3) afin d'obtenir des clones stables exprimant la protéine HTDE en fusion avec la protéine GFP. Nous avons détecté, dans une partie de ces clones stables, le niveau d'expression de la protéine de fusion HTDE/GFP par buvardage Western dirigé contre la protéine GFP. Nous nous attendions à détecter une protéine d'environ (HTDE+GFP) $52+27=79$ kDa. Nous avons utilisé l'approche d'une protéine de fusion parce qu'il n'existe aucun anticorps dirigé contre la protéine HTDE native. Les clones stables utilisés correspondent aux clones caractérisés par buvardage Northern (figure 6). La figure 7 montre qu'il est possible de détecter l'expression de la protéine de fusion dans les clones stables n° 1, 2, 3, 6, 7, 16 et 18. On détecte chez ces clones un patron de deux à trois bandes situées entre ~ 55 et ~ 75 kDa. Les clones stables n° 4, 13 et 15 expriment peu ou pas la protéine de fusion. Les cellules Rat-1 seules, n'expriment pas la protéine de fusion. Les cellules Rat-1 transfectées avec le vecteur vide, PGKH-GFP, n'expriment pas la protéine de fusion, mais on peut détecter la protéine GFP à environ ~ 27 kDa. La détection de la protéine β -actine a servi de contrôle interne. Ces résultats suggèrent qu'il est possible de détecter la protéine de fusion HTDE/GFP par buvardage Western dans les clones stables que nous avons dérivés dans les cellules Rat-1.

FIGURE 7

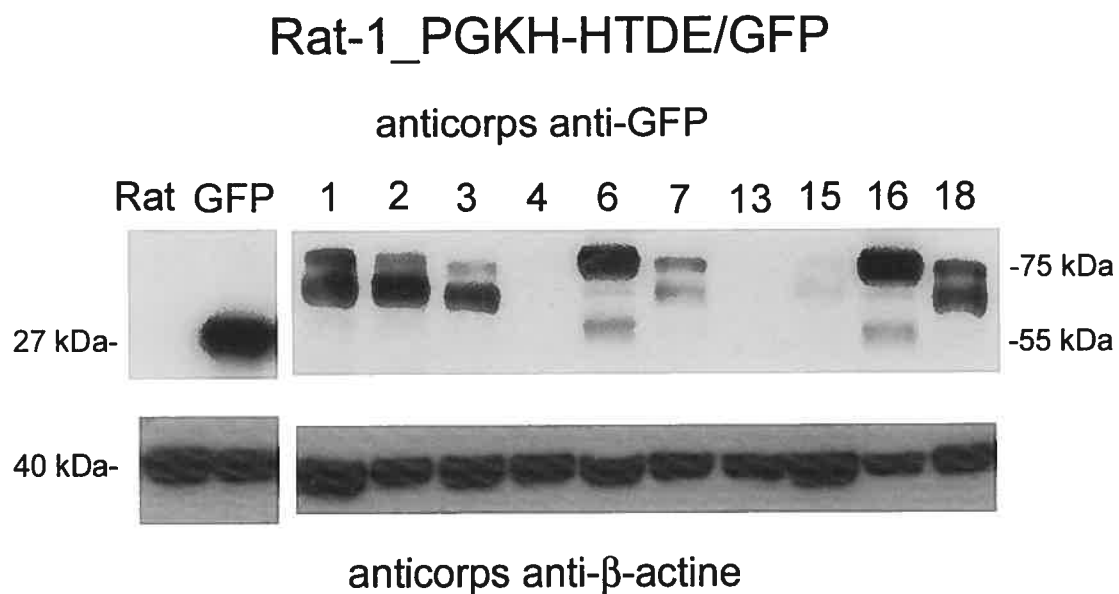


Figure 7. Immunobuvardage Western des clones stables Rat-1_PGKH-HTDE/GFP avec l'anticorps anti-GFP (JL-8, Clontech). Le puits marqué Rat correspond aux cellules Rat-1 non transfectées. Le puits marqué GFP correspond aux cellules Rat-1 transfectées avec le vecteur vide PGKH-GFP. Le panneau du bas correspond à la détection de la protéine β -actine servant de contrôle interne.

3.4 Une modification post-traductionnelle, la glycosylation :

Les expériences d'immunobuvardages précédentes montrent que la protéine HTDE/GFP présente un profil de bandes différent suivant les clones testés, ce qui suggère que la protéine peut subir des modifications post-traductionnelles. Nous avons donc investigué une des modifications post-traductionnelles que pourrait subir la protéine *i.e.* la glycolysation. De plus, l'analyse de la séquence en acides aminés de HTDE nous apprend qu'elle peut avoir plusieurs formes et qu'elle possède des sites potentiels de glycosylation *i.e.* un motif NXS/T (Bossolasco 1999). Un traitement de 48 heures à la tunicamycine a été appliqué directement sur les cellules en culture pour inhiber la N-glycosylation endogène. Un immunobuvardage Western dirigé contre la protéine GFP a été effectué sur des extraits totaux de protéines provenant de clones stables exprimant la construction PGKH-HTDE/GFP dans des cellules Rat-1. La figure 8 montre que la protéine de fusion HTDE/GFP a un poids moléculaire de ~75 kDa, alors qu'après un traitement à la tunicamycine, elle a un poids moléculaire de ~65 kDa. La protéine GFP seule (PGKH-GFP), avec ou sans traitement à la tunicamycine est toujours détectée à ~27 kDa. La protéine β -actine a servi de contrôle interne et elle est détectée à ~40 kDa. Ces résultats suggèrent que la protéine HTDE subi une modification post-traductionnelle de glycosylation.

FIGURE 8

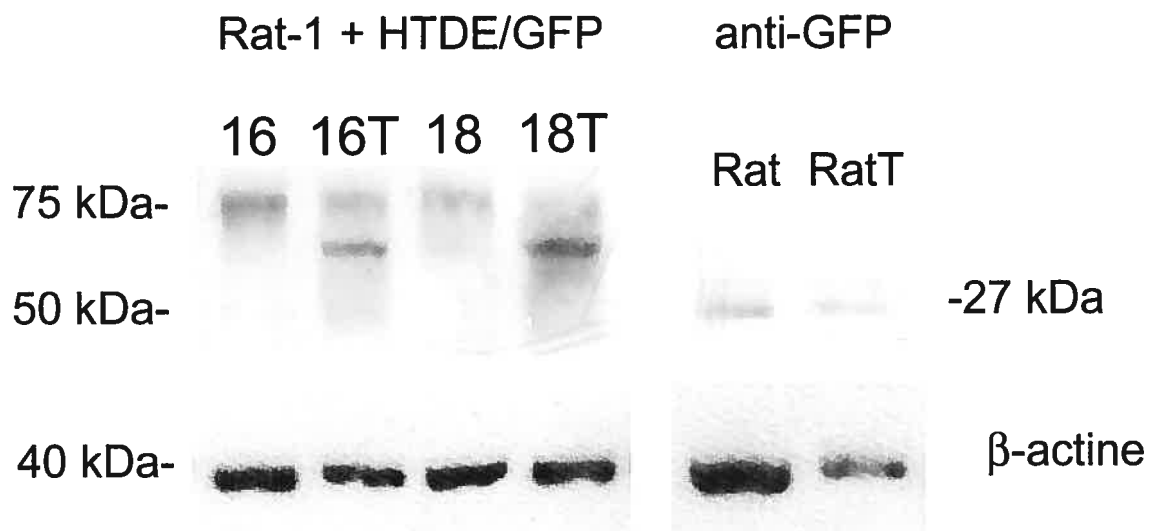


Figure 8. Glycosylation de HTDE/GFP dans des cellules Rat-1. Immunobuvardage Western de clones stables Rat-1_PGKH-HTDE/GFP traités ou non à la tunicamycine. Les puits n^{os} 16 et 18 du panneau de gauche montrent la détection de la protéine de fusion HTDE/GFP des clones stables correspondants, alors que les puits identifiés 16T et 18T montrent les mêmes clones traités à la tunicamycine. Les puits Rat et RatT du panneau de droite montrent les cellules Rat-1 transfectées avec PGKH-GFP non traitées et traitées respectivement avec la tunicamycine. Le panneau du bas montre la détection de la protéine β -actine servant de contrôle de chargement.

3.5 La caractérisation du potentiel immortalisant *in vitro* :

Dans le but de caractériser le potentiel immortalisant *in vitro* de la protéine HTDE, nous avons transfecté la construction PGKH-HTDE/GFP dans une culture primaire de fibroblastes embryonnaires établis à partir de rats Fisher (REF) âgés de 16 jours (E16) (Pilon 1996a). Les REFs sont utilisés fréquemment dans ce genre d'essai parce qu'ils possèdent un faible taux d'immortalisation spontanée (Rassoulzadegan 1983). La figure 9 montre que la transfection d'une protéine virale immortalisante connue comme PyLT (construction témoin positif PGKH-PyLT/GFP), réussit à immortaliser les cellules dans une proportion d'environ 11.7% (nombre total de clones immortalisés/nombre total de clones repiqués, soit 13/111). Ce ne sont pas tous les clones repiqués qui vont réussir à s'immortaliser. La transfection de la protéine GFP seule (construction témoin négatif PGKH-GFP) ne suffit pas à immortaliser les cellules bien que peu de clones ont pu être repiqués. Quant à la transfection avec la construction PGKH-HTDE/GFP, seulement 4.3% (nombre total de clones immortalisés/nombre total de clones repiqués, soit 1/23) des clones ont réussi à s'immortaliser. Il est important de noter que le nombre de clones à repiquer avec la construction PGKH-HTDE/GFP était toujours moindre qu'avec la construction PGKH-PyLT/GFP bien que l'efficacité de transfection après 48 h était la même, telle qu'estimée par microscopie à fluorescence (résultat non montré). Cela représente une immortalisation relative de 7.6% (nombre total de clones immortalisés HTDE/GFP sur le nombre total de clones PyLT/GFP immortalisés, soit 1/13) par rapport à l'immortalisation par PyLT/GFP. Dans notre essai,

l'immortalisation spontanée est nulle puisque les cellules non transfectées ne survivent pas à la sélection et donc, ne s'immortalisent pas. Ces résultats suggèrent que la protéine HTDE n'a que peu, ou pas, le potentiel d'immortaliser des REFs *in vitro* comparativement à une oncoprotéine virale comme l'antigène grand T du virus du polyome.

FIGURE 9

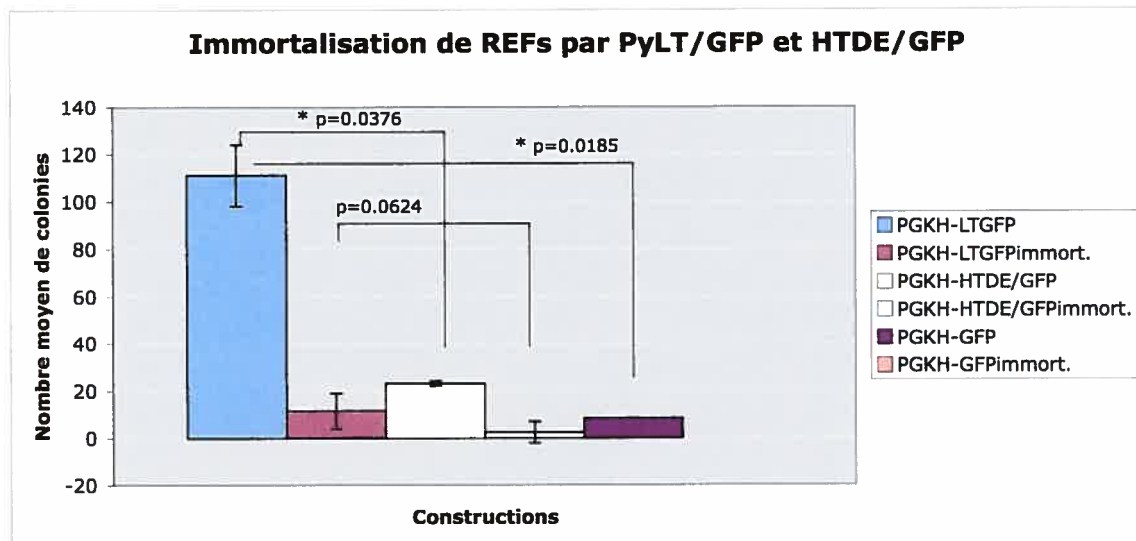


Figure 9. Immortalisation de REFs par PyLT/GFP et HTDE/GFP. Le graphique représente le nombre moyen de clones repiqués et immortalisés en fonction des constructions transfectées. La correspondance des colonnes est la suivante (de gauche à droite) : PGKH-LT/GFP (repiqués), PGKH-LT/GFP (immortalisés), PGKH-HTDE/GFP (repiqués), PGKH-HTDE/GFP (immortalisés), PGKH-GFP (repiqués), PGKH-GFP (immortalisés). Les tests statistiques ont été effectués par ANOVA à l'aide du logiciel InStat3™

3.6 La caractérisation du potentiel transformant *in vitro* :

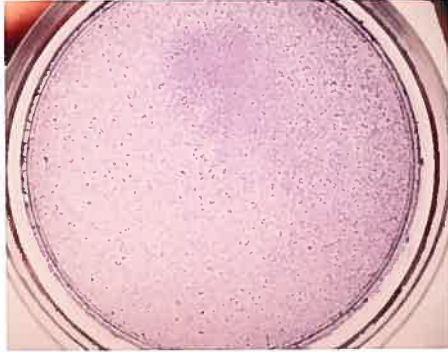
Dans le but de caractériser le potentiel transformant *in vitro* de HTDE, nous avons procédé à un essai semblable à un test de formation de foyers. Cet essai permet d'observer des cellules transformées par leur perte de l'inhibition de contact. Plusieurs clones stables, exprimant les constructions PGKH-HTDE/GFP et PGKH-HTDE dans les cellules Rat-1, ont été sélectionnés pour leur haut niveau d'expression en ARNm (voir figure 6) et pour leur niveau d'expression de la protéine de fusion (voir figure 7) afin de réaliser cet essai. Nous avons utilisé les cellules Rat-1 parce qu'elles sont reconnues pour posséder un faible taux de transformation spontanée lorsque laissées à confluence. La figure 10 montre des photos de pétris colorés au bleu de Giemsa après au minimum trois semaines (21-25 jours) de confluence afin de révéler les cellules ayant perdues leur inhibition de contact. On remarque que la lignée cellulaire Rat-1 ainsi que les clones stables transfectés avec les vecteurs vides PGKH (résultat non montré) et PGKH-GFP, servant de témoins négatifs, forment encore un tapis de cellules compactes toujours en monocouche après plusieurs jours à confluence (figure 10, panneaux A et B respectivement). Les clones stables des cellules Rat-1 exprimant PGKH-HTDE et PGKH-HTDE/GFP s'empilent les uns sur les autres pour former des amas cellulaires (communément appelés foyers) qui sont représentés par les tâches violettes (figure 10 panneaux C, D et E, F respectivement). Il est important de noter que la fusion de GFP semble peu, ou pas affecter l'amoncellement des cellules. L'aspect des cellules Rat-1

transfectées avec HTDE suggère que ces dernières ont subi une transformation parce qu'elles possèdent une capacité de croissance à une densité supérieure aux cellules Rat-1 non transfectées dans les conditions de notre essai. Ces résultats suggèrent que les cellules Rat-1 qui surexpriment HTDE peuvent induire un empilement de cellules dans les conditions de notre essai de perte d'inhibition de contact.

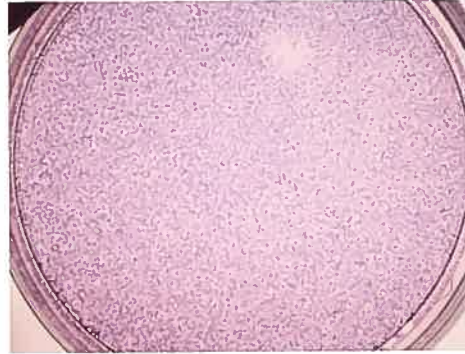
Figure 10. Essai de perte de l'inhibition de contact par les clones stables exprimant les constructions PGKH-HTDE/GFP ou PGKH-HTDE dans les cellules Rat-1. En A), les cellules Rat-1 non transfectées. En B), les cellules Rat-1 transfectées avec le vecteur vide PGKH-GFP. En C) et en D), les clones stables Rat-1_PGKH-HTDE/GFP n^{os} 16 et 18 respectivement. En E) et en F), les clones stables Rat-1_PGKH-HTDE n^{os} 24 et 34 respectivement.

FIGURE 10

A) Rat-1



B) Rat-1 + PGKH-GFP



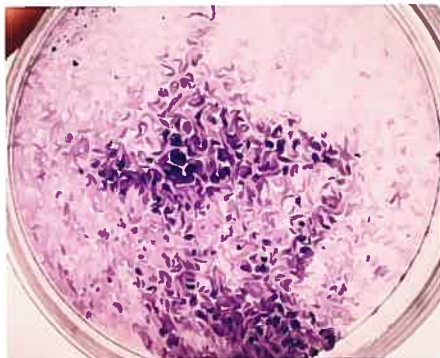
C) Rat-1 + PGKH-HTDE/GFP no16



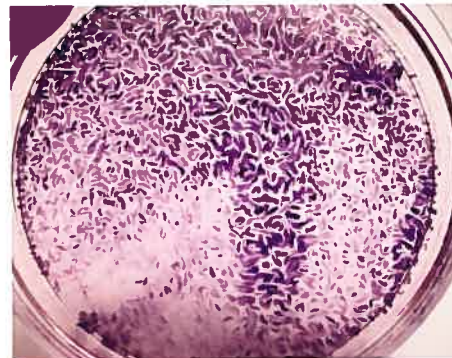
D) Rat-1 + PGKH-HTDE/GFP no18



E) Rat-1 + PGKH-HTDE no24



F) Rat-1 + PGKH-HTDE no34



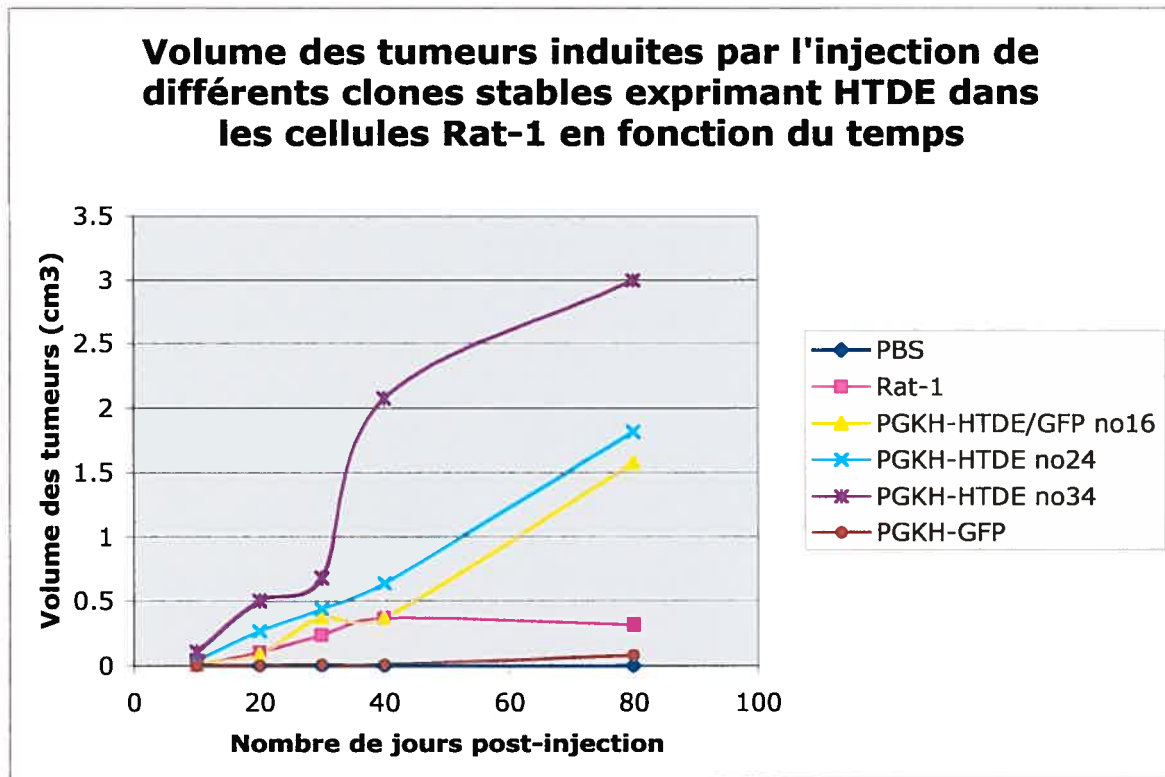
3.7 La caractérisation du potentiel transformant *in vivo* :

Dans le but de caractériser le potentiel oncogénique *in vivo* de HTDE, nous avons injecté des clones stables de cellules Rat-1 exprimant HTDE dans des souris *nu*. Les mêmes clones stables exprimant les constructions PGKH-HTDE et PGKH-HTDE/GFP décrits dans les figures 6 et 7, ont été utilisés pour faire cet essai de xénogreffes sous-cutanées (formation de tumeurs) en souris *nu* sur une période de trois mois. La figure 11 montre les volumes moyens des tumeurs en fonction du temps écoulé depuis l'injection initiale des cellules Rat-1 exprimant les différentes constructions. Nous pouvons observer que l'injection de PBS n'a pas induit la formation de tumeurs chez les souris témoins (0/6 souris). Nous remarquons également que les clones Rat-1_PGKH-HTDE n°24 et n°34, ainsi que Rat-1_PGKH-HTDE/GFP n°16, ont induit la formation de tumeurs (6/6 souris) plus rapidement que les lignées cellulaires Rat-1 et Rat-1 exprimant la construction PGKH-GFP (figure 11 panneau A). La taille des tumeurs à 45/49 jours est élevée (figure 11 panneau B) pour le clone Rat-1_PGKH-HTDE/GFP n°34 qui expriment fortement le gène. Ces résultats suggèrent que les cellules Rat-1 exprimant HTDE ont le potentiel d'induire la formation de tumeurs sous-cutanées dans des souris immunocompromises.

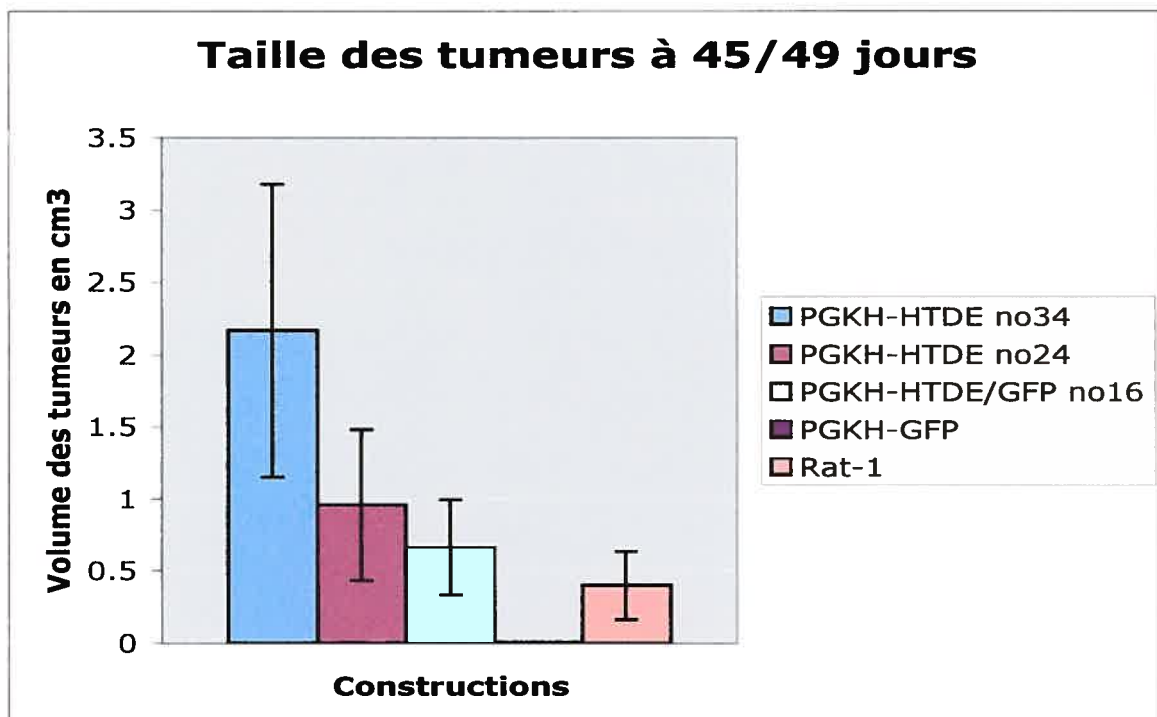
Figure 11. Xénogreffes en souris *nu* de clones stables exprimant la protéine HTDE ou HTDE/GFP dans les cellules Rat-1. En A) volume des tumeurs en fonction du temps post-injection des différentes constructions. En B) comparaison du volume des tumeurs à 45/49 jours.

FIGURE 11

A)



B)



3.8 La caractérisation des xénogreffes chez la souris *nu*:

Les tumeurs induites par l'injection de clones stables de HTDE et HTDE/GFP dans les souris *nu* ont été analysées par immunohistochimie. Dans le but de montrer la prolifération cellulaire des cellules dans les tumeurs, nous avons détecté la présence des protéines suivantes : PCNA et cycline E. La protéine PCNA est une protéine nucléaire qui est un marqueur de la prolifération cellulaire (Yu 1992). Nous observons un signal positif dans toutes les tumeurs analysées (figure 12 panneau B). La protéine cycline E peut aussi être utilisée comme marqueur de la prolifération cellulaire (Nielson 1998). Nous observons un signal positif dans toutes les tumeurs observées (figure 12 panneau C). L'anticorps anti-GFP a aussi servi à détecter l'expression de la protéine de fusion HTDE/GFP à l'intérieur des tumeurs induites par le clone Rat-1_PGKH-HTDE/GFP no16 (figure 12 panneau D). La détection de la protéine CDC20 est un témoin de la localisation membranaire (figure 12 panneau D). Ce dernier résultat suggère que l'expression de la protéine de fusion semble maintenue à l'intérieure de la tumeur. Ces résultats suggèrent qu'il est possible de détecter de la croissance cellulaire dans les différentes tumeurs induites et que la protéine de fusion HTDE/GFP semble conserver son expression dans ces tumeurs.

Figure 12. Détection de marqueurs de croissance cellulaire par immunohistochimie dans les tumeurs induites par les xénogreffes de clones stables exprimant HTDE dans les souris *nu*. En A) témoins négatifs montrant une hybridation sans anticorps primaire. En B) détection de la protéine PCNA. En C) détection de la protéine Cycline E. En D) détection de la protéine GFP. Le signal positif est observable par une teinte brune.

FIGURE 12

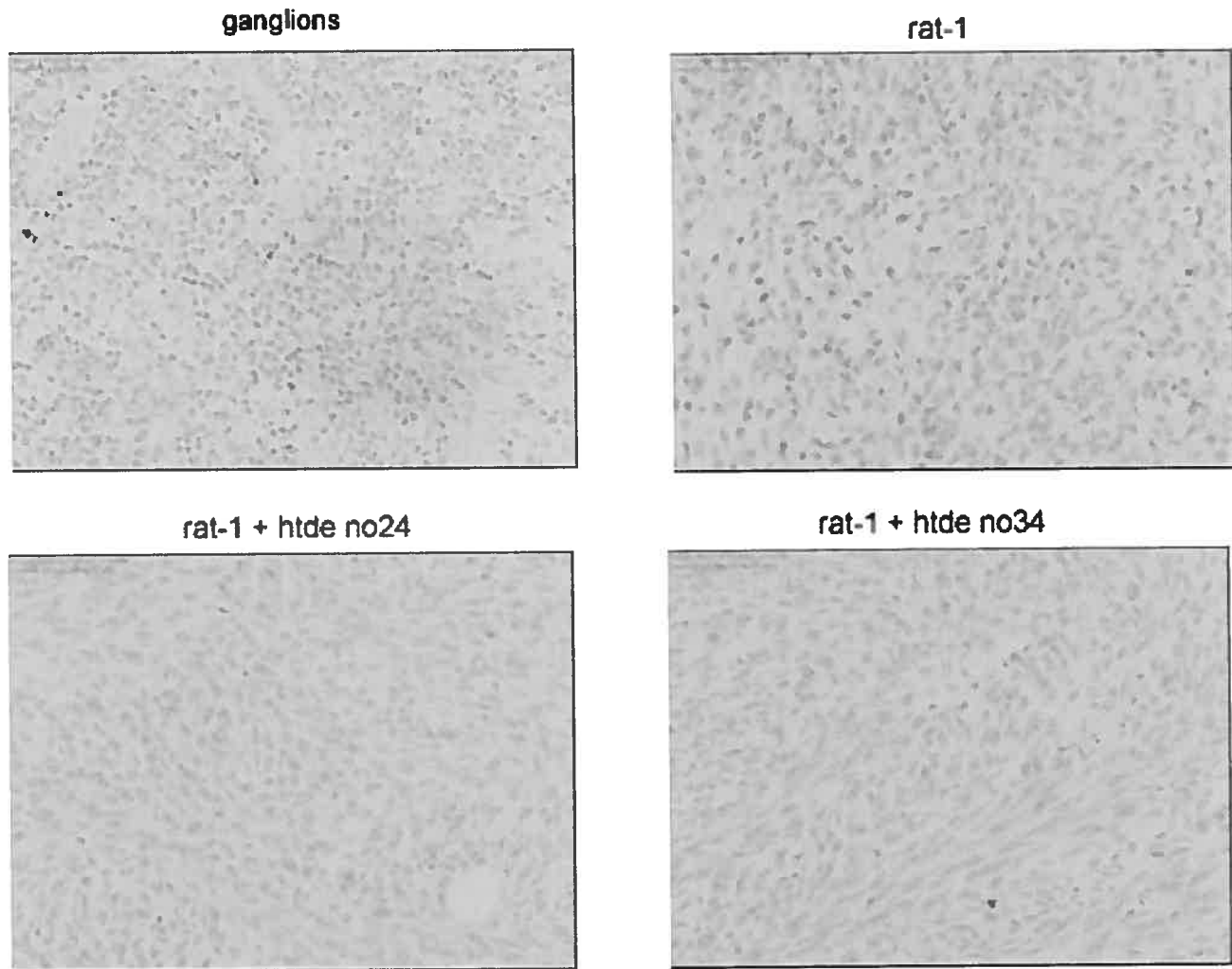
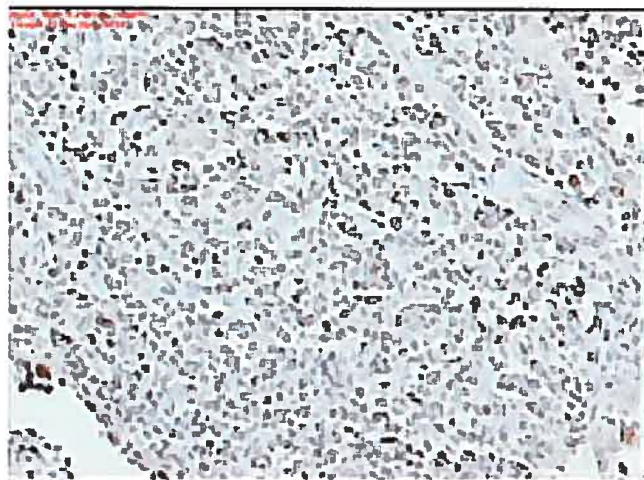
A) contrôles négatifs (sans anticorps primaire)

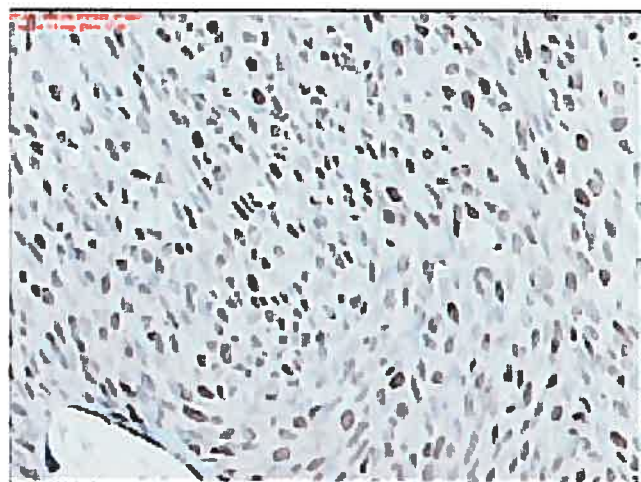
FIGURE 12

B) PCNA

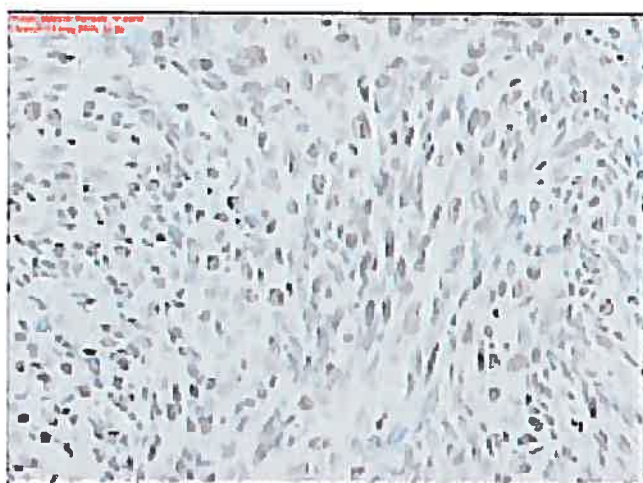
ganglions



rat-1



rat-1 + htde no24



rat-1 + htde no34

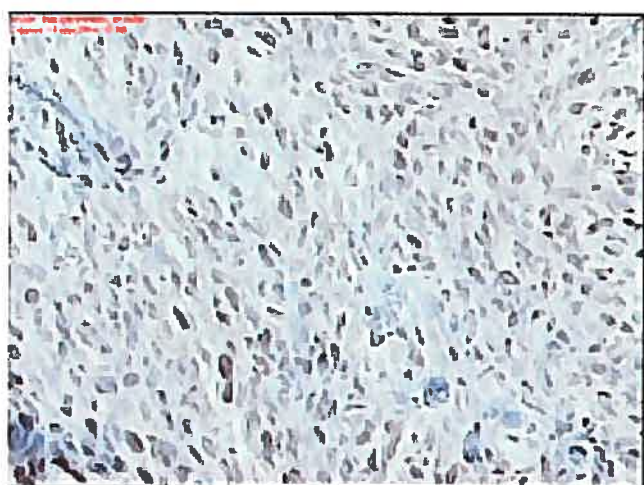
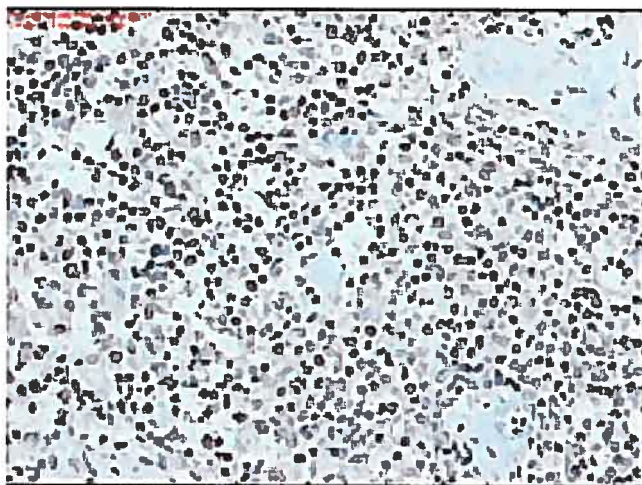


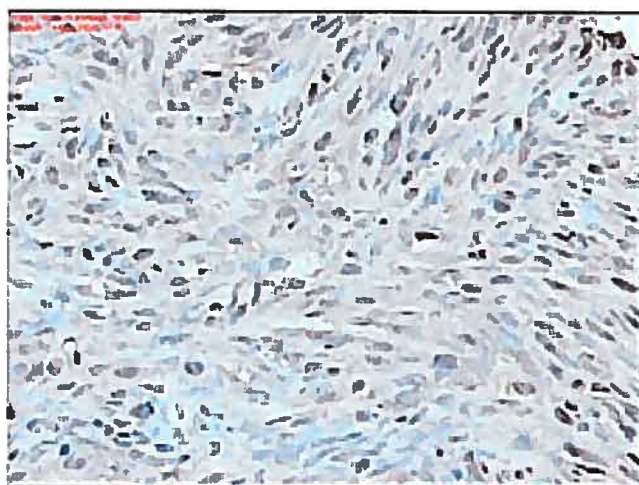
FIGURE 12

C) Cycline E

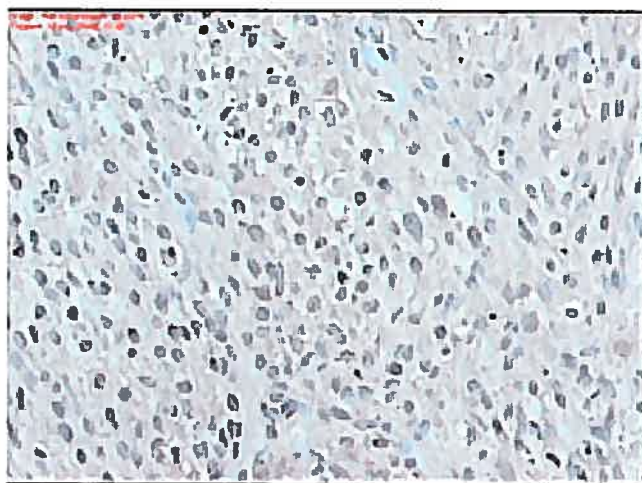
ganglions



rat -1



rat-1 + htde no24



rat-1 + htde no34

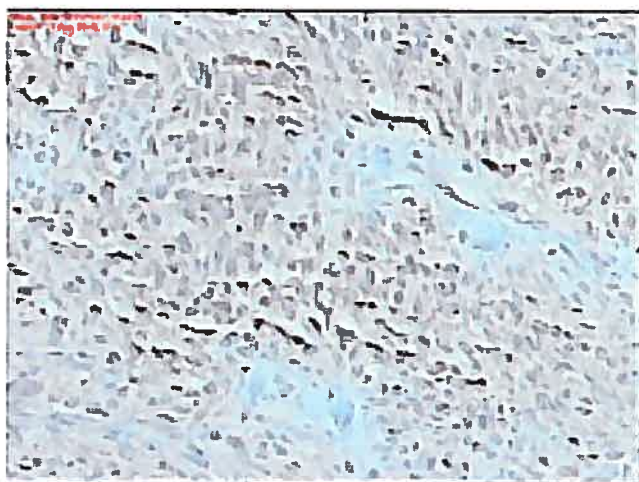
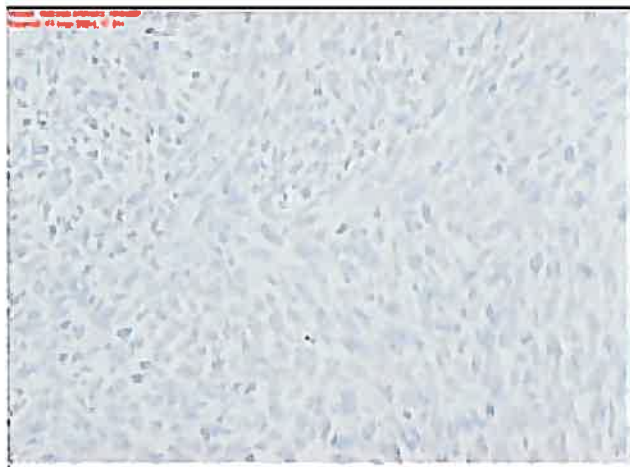


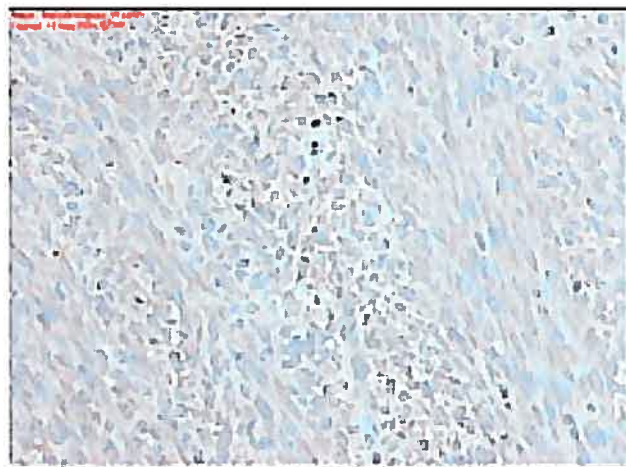
FIGURE 12

D) GFP

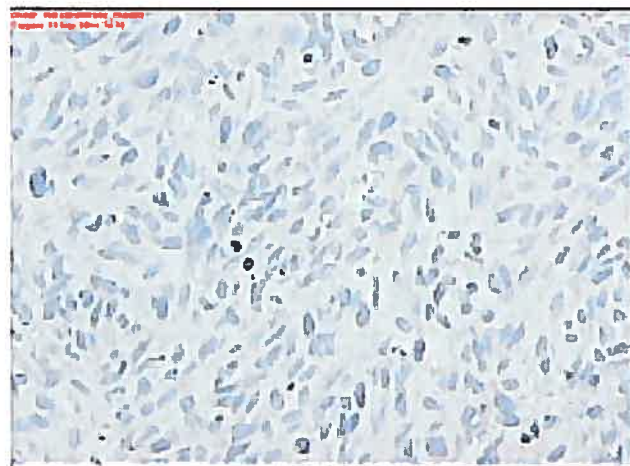
rat-1 + htde no16 w/o ab



rat-1 + htde no16



rat-1



ganglion 1 + CD20



3.9 Le génotypage de la première ronde de microinjections :

Le dernier objectif de mon travail était de générer une nouvelle souris transgénique exprimant la protéine de fusion HTDE/GFP. Afin de réaliser cet objectif, nous avons généré une nouvelle construction plaçant HTDE-GFP sous le contrôle du promoteur de la kératine 19 : pK19-HTDE/GFP (figure 4). Le génotypage des souriceaux nés de la réimplantation d'embryons de souris microinjectés ont été analysés par buvardage Southern. La figure 13 montre une exposition radiographique des 11 souris nées de ce premier essai. On peut constater qu'il n'y a pas de signal positif montrant qu'aucun animal transgénique fondateur n'a été obtenu de ce premier essai. Le contrôle positif (+) est une dilution du plasmide K19-HTDE/GFP ayant servi à la microinjection du transgène dans les embryons. Le contrôle négatif (-) est l'ADN d'une autre souris transgénique (K19-LT) ne contenant pas le transgène d'intérêt i.e. HTDE/GFP. Une hybridation avec β -actine a servi de contrôle interne pour démontrer l'efficacité de la technique. Cette dernière hybridation confirme que l'ADN dans le puits n°3 a subi une dégradation ou n'a pas bien été transféré à la membrane tel qu'observé sous les rayons ultraviolets (résultat non montré). Ces résultats suggèrent que nous n'avons pas généré de nouvelles souris transgéniques avec cette première ronde de microinjections et que d'autres tentatives seront nécessaires.

FIGURE 13

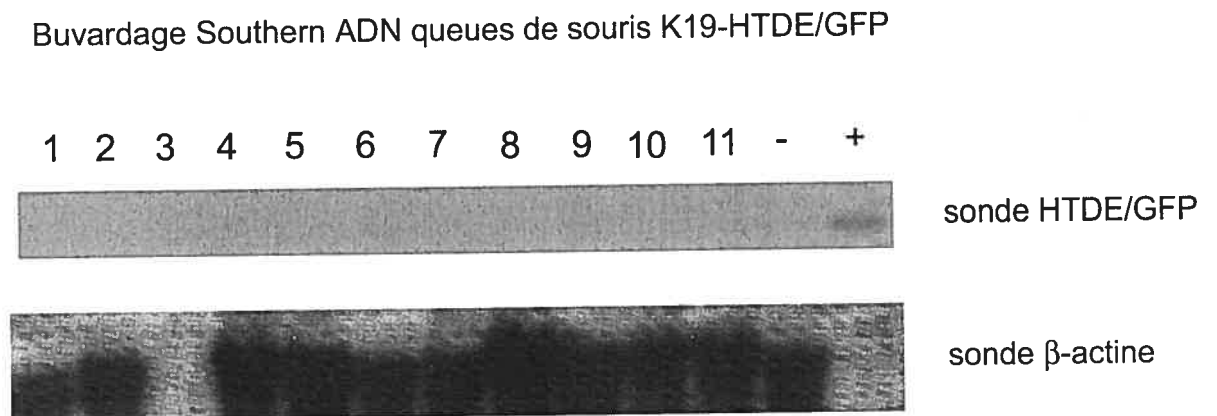


Figure 13. Génotypage par buvardage Southern des souriceaux nés du premier essai de réimplantation d'embryons microinjectés avec K19-HTDE/GFP. Le panneau du haut représente le génotypage des ADNs de queues de souris digérés *XhoI/NotI* et hybridés avec la sonde HTDE/GFP. Le témoin négatif (-) est l'ADN génomique digéré *XhoI/NotI* d'une souris K19-PyLT et le témoin positif (+) est l'ADN plasmidique du vecteur K19-HTDE/GFP. Le panneau du bas montre une hybridation contrôle avec une sonde contre le gène de la β -actine.

4.0 Discussion

L'utilisation de modèles transgéniques facilite l'étude de la progression tumorale. Les souris MT-PyLT développent des tumeurs testiculaires entre 8 et 15 mois d'âge. Les lignées cellulaires dérivées de diverses tumeurs de différents stades de ces dernières souris ont permis de mettre en évidence un nouveau gène différentiellement exprimé dans les tumeurs. L'homologue humain de ce gène, htde, est lui aussi différentiellement exprimé dans des tumeurs pulmonaires humaines. La fonction de HTDE n'est toujours pas connue, mais des homologues du gène ont été retrouvés chez plusieurs espèces de la levure à l'humain, laissant présumer une fonction importante. Afin de déterminer le rôle de HTDE dans la tumorigénèse, nous avons entrepris de mieux caractériser la protéine. Pour ce faire, nous avons tout d'abord déterminé la localisation cellulaire de la protéine en fusion avec la GFP et nous avons montré sa modification post-traductionnelle par N-glycosylation. Ensuite, nous avons caractérisé son potentiel immortalisant *in vitro* ainsi que son potentiel transformant *in vitro* et *in vivo*. Finalement, nous sommes toujours résolus à générer une nouvelle souris transgénique exprimant HTDE afin de mieux caractériser son rôle dans la tumorigénèse.

4.1 La localisation cellulaire de la protéine de fusion

Dans la littérature, le gène htde est désormais reconnu comme faisant partie de la famille TMS/TDE. Cette nouvelle famille de protéines possède plusieurs membres appartenant à diverses espèces et ils possèdent une homologie entre eux d'environ ~30%. L'analyse bioinformatique de la séquence

en acides aminés de ces protéines prédit jusqu'à 11 domaines hydrophobes potentiellement transmembranaires selon l'algorithme utilisé (Bossolasco 1999, Player 2003). Cela laisse supposer que ces protéines sont associées à une membrane. Plusieurs groupes ont tenté de déterminer la localisation cellulaire des autres membres de la famille, mais des résultats contradictoires ont été obtenus. En effet, le groupe de Grossman et collègues ont trouvé la protéine de fusion HA-TMS1 localisée de façon prédominante à la membrane plasmique (Grossman 2000). Le groupe de Aoki et collègues ont, quant à eux, trouvé la protéine AIGP1 localisée spécifiquement à l'appareil de Golgi de cellules neuronales (Aoki 2002). Inopinément, l'alignement des séquences des protéines TMS1, AIGP1 et mTDE indique qu'il s'agirait de la même protéine (résultat non montré), d'où la controverse. Comme nous nous attendons à retrouver la protéine humaine au même endroit que l'homologue murin, nous avons décidé de générer une protéine de fusion HTDE/GFP et d'élucider sa localisation cellulaire par microscopie en fluorescence sur des cellules vivantes, par opposition à l'immunofluorescence et l'immunohistochimie utilisés par d'autres groupes (Grossman 2000, Aoki 2002). En observant attentivement la figure 5, on peut constater que la protéine HTDE/GFP est bien localisée à la membrane plasmique bien que l'on observe aussi un signal dans la région périnucléaire. Cette dernière observation est probablement due au fait que la forte surexpression de la protéine en transfection transitoire peut mener à son accumulation dans des organelles impliquées dans sa maturation comme le RE, l'appareil de Golgi et les vésicules de sécrétions. Cette localisation a été

démontrée dans plusieurs types cellulaires dont les HEK293, A549 et TOV112D avec différentes constructions plasmidiques contenant différents promoteurs (PGK et K19). Ces résultats démontrent que la protéine de fusion HTDE/GFP est localisée à la membrane plasmique dans les lignées cellulaires que nous avons utilisées.

4.2 La caractérisation des clones stables exprimant HTDE :

La détection de la protéine de fusion HTDE/GFP par immunobuvardage Western, telle qu'illustrée dans la figure 7, nous a permis de déterminer pour quels clones stables (Rat-1_PGKH-HTDE/GFP) le haut niveau de l'ARNm (figure 6) se reflétait en un haut niveau en protéines (figure 7). Ces clones sont les clones stables n^{os} 2, 6, 16 et 18. Ce sont ces clones qui ont été utilisés dans les expériences subséquentes. Le fait de pouvoir détecter la protéine de fusion est essentiel, étant donné que nous n'avons pas encore réussi à dériver un anticorps spécifique capable de détecter la protéine HTDE sous sa forme native. Il aurait été également possible d'utiliser d'autres épitopes (myc, flag, HA, *etc.*), mais le développement de ces outils n'a pas pu être terminé. En utilisant les clones avec un haut niveau en ARNm et en protéines, nous supposons qu'il serait plus facile d'observer dans ces derniers une différence significative avec les cellules témoins. Toutefois, nous n'avons aucun moyen de confirmer que la protéine était fonctionnelle ou dans un état activé. Dans le même ordre d'idée, la caractérisation par buvardage Northern des clones stables Rat-1_PGKH-HTDE (figure 6) nous laisse supposer que plusieurs clones ayant un fort niveau en

ARNm expriment bien le gène, toutefois nous ne pouvons pas vérifier le niveau d'expression de la protéine sur ces clones. En somme, ces résultats exposent la caractérisation en ARNm et en protéine de plusieurs clones stables exprimant HTDE/GFP ou HTDE (ARNm seulement) dans les cellules Rat-1. Ces clones stables exprimant HTDE dans des cellules Rat-1 ont été utilisés dans plusieurs des expériences présentées.

4.3 La glycosylation :

La glycosylation est une des nombreuses modifications post-traductionnelles que peut subir une protéine lors de sa maturation. Contrairement aux protéines synthétisées dans le cytosol, les protéines dont la production est amorcée dans le RE sont le plus souvent glycosylées pendant leur synthèse (Dejgaard 2004). La glycosylation se fait en plusieurs étapes, dont les premières ont lieu dans le RE granuleux : ajout d'un oligosaccharide comprenant essentiellement du mannose, du glucose, et de la N-acétylglucosamine sur la protéine, sur le groupement NH_2 d'une molécule d'asparagine (Asn ou N). On parle alors de liaison N-glycosidique, ou de N-glycosylation. Une suite complexe d'étapes de maturation se poursuit aussi dans l'appareil de Golgi. La N-glycosylation est un procédé métabolique hautement conservé dans l'évolution. La nature des sucres exposés à la surface d'une protéine peuvent influencer ses propriétés et ses activités biologiques et avoir un rôle très important dans sa maturation, son repliement, sa reconnaissance, son transport *intra* et *extra* cellulaire et sa localisation

(Kukuruzinska 1998, Helenius 2001). Dans le contexte de l'étude de HTDE, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à cette modification post-traductionnelle, en partie à cause de la découverte de la protéine AIGP1, une protéine murine et homologue à HTDE, isolée à partir d'un criblage de protéines glycosylées (Aoki 2002). La présence de site potentiels de glycosylation (le N dans un motif NXS/T) dans la séquence de HTDE et d'autres membres de la famille, nous laisse entrevoir que la glycosylation pourrait être une modification post-traductionnelle commune à cette famille de protéines. L'analyse par immunobuvardage Western d'extraits de cellules traitées à la tunicamycine, un agent inhibiteur de la N-glycosylation, montre que la protéine de fusion HTDE/GFP est détectée à un poids moléculaire plus faible (~65 kDa) que la protéine glycosylée (~75 kDa) (figure 8), ceci dans plus d'un clone stable exprimant la construction PGKH-HTDE/GFP dans les cellules Rat-1. La bande de plus faible poids moléculaire observée est donc due au traitement à la tunicamycine et correspond à la protéine non-glycosylée. Le poids moléculaire de cette dernière se rapproche davantage du poids moléculaire estimé de la protéine qui est de $27 + 52 = 79$ kDa (GFP+HTDE respectivement). Ces résultats sont en accord avec les observations obtenues précédemment par Aoki et ses collègues sur AIGP1 (Aoki 2002) à l'aide d'un essai semblable. De plus, ces résultats peuvent expliquer la détection d'un patron de plusieurs bandes entre ~65 et ~75 kDa lors d'un immunobuvardage Western sur des extraits totaux de protéines de clones stables PGKH-HTDE/GFP dans cellules Rat-1 (figure 6), qui représentent probablement des protéines avec différents états de

modification post-traductionnelle. La plus basse des bandes (55 kDa) pourrait être un produit de dégradation. Ces résultats confirment que la protéine HTDE est une protéine glycosylée et qu'il s'agit peut-être d'une caractéristique commune entre plusieurs protéines de la famille TMS/TDE. Nous ne pouvons pas pour l'instant nous prononcer sur l'importance du rôle de la glycosylation dans l'activité biologique de HTDE ni sur son rôle dans la tumorigénèse, mais nous proposons qu'un mutant non glycosylé pourrait nous aider à répondre à cette nouvelle question.

4.4 L'immortalisation :

La carcinogénèse est un processus à plusieurs étapes. L'immortalisation est une des étapes précoces des modèles de la carcinogénèse en culture cellulaire. Il s'agit donc d'un concept *in vitro*. Les cellules qui possèdent un potentiel de division illimité sont dites immortelles. Cependant, ces cellules ne forment pas de tumeurs et doivent subir des événements secondaires pour leur progression tumorale. Comme les lignées cellulaires dérivées de tumeurs obtenues d'animaux transgéniques exprimant PyLT et surexprimant HTDE ont été isolées dans le contexte où les cellules subissaient déjà le pouvoir immortalisant de PyLT (Lebel 1994), nous avons recherché le potentiel immortalisant *in vitro* de HTDE seul. La fréquence d'immortalisation de fibroblastes embryonnaires de rat (REFs) que nous avons obtenue avec PyLT/GFP est en accord avec les résultats décrits par d'autres groupes (Rassoulzadegan 1983, Cowie 1986), bien que leurs essais soient quelque peu

différents du nôtre. Ce résultat confirme le potentiel immortalisant de PyLT/GFP et la justesse de son utilisation comme contrôle positif dans notre essai. Ces résultats démontrent que la fusion de la protéine GFP avec PyLT ne semble pas affecter son potentiel immortalisant *in vitro*. Il est à noter que PyLT a aussi d'autres effets en plus d'avoir un impact sur l'immortalisation des cellules. Il permet également la survie et la croissance en milieu à faible concentration en sérum (Zheng 1994) et il protège également les cellules de l'apoptose induite par Fas et TNF α (Rodier 2000). Dans notre essai, il y a une différence entre le nombre de clones isolés et le nombre de clones immortalisés (figure 9) due au potentiel immortalisant différent de chaque construction. Mais il est frappant de constater qu'un faible nombre de clones a été isolé avec HTDE/GFP comparé à PyLT/GFP, malgré une efficacité de transfection semblable (résultat non montré). Cela peut s'expliquer, en partie, par les autres activités de PyLT sur la promotion de la survie cellulaire, activités que ne possèdent probablement pas HTDE. Il est à noter que malgré une efficacité de transfection ne pouvant être vérifiée par immunofluorescence, un faible nombre de clones a aussi été isolé avec PGKH-HTDE (résultat non montré), laissant supposer que la fusion de HTDE avec la protéine GFP influence peu ou pas l'activité immortalisante *in vitro* de HTDE. Ces résultats démontrent que HTDE/GFP n'a pas un potentiel immortalisant *in vitro* ou qu'il ne dépasse pas le bruit de fond dans des REFs dans les conditions testées.

4.5 La perte de l'inhibition de contact :

La perte de l'inhibition de contact peut être une des caractéristiques des cellules transformées et elle peut être mise en évidence par un essai *in vitro* de formation de foyers. Les résultats présentés dans la figure 10 montrent que l'expression de HTDE a des conséquences évidentes sur l'aspect général des cellules laissées plusieurs jours à confluence. Que ce soit les clones n° 16 ou n° 18, exprimant la protéine de fusion HTDE/GFP (panneaux C et D respectivement de la figure 10), ou les clones n° 24 ou n° 34 exprimant la protéine HTDE, ces cellules présentent une des caractéristiques des cellules transformées (la perte de l'inhibition de contact) qui est clairement différente des cellules non-transfectées (panneau A) ou transfectées avec la protéine GFP seule (panneau B). Ces résultats suggèrent que la fusion de la protéine HTDE avec la protéine GFP a peu ou pas d'effet sur le potentiel *in vitro* de HTDE à induire cet aspect transformé à des clones stables de cellules Rat-1 laissées à confluence. Ces résultats confirment que HTDE possède au moins une caractéristique d'un gène ayant un potentiel transformant *in vitro* et qu'il est possible de le visualiser par un essai semblable à un test de formation de foyers. Cependant, il est important de noter que les résultats obtenus n'ont pas pu être observés (résultats non montrés) par transfection transitoire sans la sélection de clones stables exprimant HTDE. L'essai de formation de foyers suite à une transfection transitoire sans sélection effectué dans des fibroblastes de rongeurs peut être limitant dans l'identification d'oncogènes ayant un faible potentiel transformant *in vitro* ou ayant une spécificité cellulaire et tissulaire (Land 1983). Ces résultats

suggèrent que l'expression stable de HTDE *in vitro* permet aux cellules de dépasser la barrière de l'inhibition de contact et présentent une des caractéristiques des cellules transformées bien que l'appellation 'foyer' semble un qualificatif mal choisi. Nous proposons plutôt que la protéine HTDE possède un potentiel oncogénique faible mais détectable *in vitro* dans les conditions testées.

4.6 La formation de tumeurs en souris *nu* :

Les souris immunodéficientes CRL : *nu/nu* ne sont pas des souris consanguines (*i.e. outbred*) et elles ne sont donc pas associées à aucune souche génétique particulière. Elles ne possèdent pas de thymus, par conséquent elles sont incapables de produire des cellules T. Des xénogreffes sous-cutanées de cellules Rat-1 exprimant la protéine HTDE, ou la protéine HTDE/GFP ont montré que ces cellules avaient le potentiel de former des tumeurs *in vivo*. En observant attentivement la figure 11, on remarque que toutes les xénogreffes présentent sensiblement la même courbe de croissance jusqu'à 30 jours. Après cette période, les xénogreffes exprimant HTDE présentent une différence de croissance statistiquement significative par rapport aux témoins de la lignée Rat-1 seule ou transfectée avec la GFP ($p < 0.05$). Nos résultats suggèrent que la lignée Rat-1 seule, notre lignée témoin négatif, est aussi capable de former des tumeurs en souris *nu*. Par conséquent, le choix d'une autre lignée strictement immortalisée aurait été un meilleur témoin.

Néanmoins, la dynamique de croissance des clones exprimant HTDE démontre que HTDE permet de potentialiser la croissance des tumeurs *in vivo*. La différence observée entre les volumes des tumeurs formées (voir figure 11) par les clones n° 16 (HTDE en fusion avec GFP) et n° 24 (HTDE seulement) n'est pas significative ($p > 0.05$). Ce résultat suggère que la fusion de la protéine HTDE avec la GFP a peu ou pas d'influence sur le potentiel transformant *in vivo* de HTDE. Le potentiel transformant augmenté du clone n° 34 (HTDE seulement) relativement aux clones n° 16 et 24 ne peut pas être expliqué par son expression relativement plus élevée du gène telle qu'illustrée dans la figure 6. Nous constatons par contre en regardant les figures 6 et 7 que la quantité de protéines n'est pas toujours le reflet des niveaux d'ARNm et c'est probablement là que se situe la différence entre ces clones. La formation de tumeurs en souris *nu* constitue une autre caractéristique des gènes ayant un potentiel transformant. Ces résultats démontrent que HTDE permet d'induire la croissance de tumeurs *in vivo* chez des animaux immunodéficients.

4.7 L'analyse immunohistochimique des xénogreffes :

Les analyses des tumeurs induites par les xénogreffes décrites ci-haut ont été faites par immunohistochimie (voir section 2.0 matériels et méthodes). La détection de marqueurs de prolifération cellulaire comme PCNA et Cycline E (figure 12 panneaux B et C respectivement) a permis de montrer une forte croissance cellulaire des cellules xénogreffées. La forte intensité du signal a rendu impossible la quantification et la comparaison des différentes xénogreffes

entre elles. Les tumeurs sous-cutanées étaient solides et bien enveloppées et elles n'envahissaient pas la couche de tissu musculaire sous-jacente (résultat non montré). Par contre, une coloration différentielle à l'éosine et à l'hématoxyline a permis d'observer sur certaines tumeurs un petit nombre d'infiltrations par néovascularisation, laissant supposer une pression sur l'angiogénèse exercée par les cellules xénogreffées (résultat non montré). Cette dernière observation, bien qu'il s'agisse d'un résultat préliminaire, peut nous laisser croire que HTDE pourrait avoir un rôle à jouer dans la promotion de l'angiogénèse *in vivo*. Ces résultats confirment que HTDE peut avoir un effet positif sur la croissance des cellules Rat-1 *in vivo* chez des souris immunodéficientes.

4.8 Des travaux parallèles de caractérisation *in vitro* :

Afin d'ajouter aux résultats présentés ci-haut et, afin de bien mettre en perspectives les travaux présentés dans ce mémoire, il est impossible de passer sous silence des résultats non publiés obtenus en parallèle (Michela Bossolasco et al. 2004 papier en préparation). En effet, ces résultats présentent la caractérisation *in vitro* de HTDE par des courbes de croissance, des essais de passage en matrigel, un essai sur la motilité cellulaire (*wound repair assay*) et des études sur l'apoptose, le tout sur différents mutants de délétion de la protéine. Ceci complète bien les expériences classiques (voir section 1.5 de l'introduction) sur la caractérisation des capacités acquises par les cellules transformées. Cependant, les expériences fonctionnelles effectuées *in vitro* avec

des clones stables exprimant HTDE ont donné des résultats un peu plus subtils comparés aux cellules témoins. Cela peut notamment être expliqué par l'absence du microenvironnement *in vivo* dans les conditions de culture cellulaire. En effet, il se peut que des expériences de surexpression *in vitro* réussissent mal à caractériser un phénotype pour une protéine dont nous ne connaissons ni les effecteurs ni le ligand ou les agonistes, qui peuvent être présents uniquement dans l'environnement physiologique. Par contre, il est intéressant de souligner que des expériences sur l'induction de l'apoptose ont montré que HTDE pouvait inhiber l'apoptose dans des clones stables, ce qui est en accord avec son rôle dans la formation de tumeurs. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'il est contraire à des résultats obtenus par un autre groupe sur une protéine de la même famille (Aoki 2002). Ces résultats nous laissent supposer que les protéines de cette famille peuvent avoir des activités différentes. Conjointement, ces résultats suggèrent que la surexpression de HTDE dans des cellules *in vitro* demeure une approche limitée dans la caractérisation du rôle que pourrait jouer la protéine HTDE dans la tumorigénèse. Par contre, ces résultats démontrent aussi que HTDE a un impact clair sur l'inhibition de l'apoptose et cela pourrait être un des rôles potentiels de HTDE dans la promotion de la tumorigénèse.

4.9 Le rôle de l'environnement :

La découverte de mTDE, l'homologue murin, a été faite dans des lignées cellulaires dérivées de tumeurs testiculaires de souris transgéniques exprimant

PyLT (Lebel 1994). Chez l'humain, comme chez la souris, la distribution tissulaire de HTDE semble ubiquitaire (Bossolasco 1999). La surexpression de HTDE a été révélée dans plusieurs modèles de tumeurs pulmonaires humaines (Bossolasco 1999, Nimmrich 2000, Bonner 2004). Donc, il semblerait que la surexpression du gène dans les tumeurs n'est ni restreinte aux testicules ni aux modèles de souris transgéniques exprimant PyLT. Le fait que plusieurs groupes ont identifié HTDE comme un gène candidat différentiellement exprimé dans les tumeurs pulmonaires humaines semble confirmer son rôle important dans cet organe. Les testicules et les poumons sont des organes qui subissent une importante régulation par les hormones et/ou les signaux sécrétés par d'autres types cellulaires adjacents, hypothèse renforcée par l'identification de plusieurs boucles de signalisation autocrines et paracrines (Forgacs 2001). Le rôle du microenvironnement *i.e.* les interactions dynamiques entre les divers types cellulaires influencent la progression tumorale dans ces organes et peut avoir un impact majeur sur la régulation de plusieurs gènes impliqués dans la tumorigénèse (Yaccoby 2004, Weaver 2004, Mohla 2004, Schedin 2004). Il se peut que la pression sélective du microenvironnement et l'avantage acquis par la surexpression de HTDE dans les tumeurs *in vivo* soient absents *in vitro*, où les conditions de croissance sont passablement différentes d'une tumeur solide. En effet, la richesse et la complexité du microenvironnement *in vivo*, les pressions du système immunitaire et l'hypoxie sont des conditions difficilement reproductibles dans un contexte *in vitro*. Il se peut aussi que la surexpression *in vitro* de HTDE ne soit pas suffisante pour activer la voie de signalisation ou la

cascade d'événements dans laquelle il est impliqué. Comme nous ne connaissons pas encore les voies de signalisation dans lesquelles HTDE pourrait avoir un effet, il est difficile pour l'instant de dire si HTDE a un effet direct ou indirect sur la progression tumorale *in vivo*. La seule expérience fonctionnelle *in vivo*, présentée à la figure 11 de ce mémoire, en plus de conforter l'hypothèse directe du rôle de HTDE dans la tumorigénèse, démontre clairement le potentiel oncogénique *in vivo* de HTDE. Ces résultats suggèrent que des approches *in vivo* seraient sans doute plus appropriées dans la poursuite de l'objectif de la caractérisation du rôle de HTDE dans la tumorigénèse.

4.10 La coopération entre les oncogènes :

Dans une cellule donnée où l'action limitée d'un seul oncogène n'est pas suffisante pour induire la transformation maligne, celle-ci peut être obtenue de par l'effet synergique entre plusieurs oncogènes (Land 1983). Cette indispensable collaboration montre à la fois le caractère limité et complémentaire des effets de contrôles physiologiques exercés par différents proto-oncogènes. À l'échelon moléculaire, la cascade d'événements conduisant à la transformation cellulaire maligne comporte, non seulement des étapes d'activation d'oncogènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, mais aussi des phénomènes de suppression des principaux mécanismes de contrôles exercés en permanence par l'environnement cellulaire ou par la cellule elle-même. Dans le contexte de l'étude de notre gène d'intérêt, rappelons que mTDE a été découvert dans un contexte où les cellules subissaient déjà l'action

immortalisante de PyLT (Lebel 1994) et que nous avons démontré (figure 9), que HTDE/GFP avait peu ou pas de potentiel immortalisant *in vitro*. La surexpression de HTDE dans les tumeurs pulmonaires humaines n'est pas associée à aucun type histopathologique de cancer en particulier (Bossolasco 1999). Bien sûr, d'autres expériences génomiques plus ciblées sur le rôle de HTDE pourraient plus tard montrer une association aujourd'hui encore inconnue. Pour l'instant, les résultats que nous avons obtenus, en plus des expériences par micropuces à ADN effectuées par d'autres groupes sur des divers types histopathologiques de tumeurs pulmonaires humaines (Nimmrich 2000, Bonner 2004), suggèrent que HTDE est peut-être impliqué au niveau d'une adaptation secondaire tardive favorisant la croissance d'une tumeur déjà établie plutôt que le dérangement initial dans le contrôle de la croissance cellulaire en amont de la cascade d'événements génétiques. Cette dernière observation va dans le même sens que l'hypothèse du rôle important du microenvironnement *in vivo* dans l'établissement d'un avantage pour la tumeur qui surexprime HTDE. Nous proposons qu'un modèle de progression tumorale *in vivo* serait plus approprié pour vérifier l'hypothèse d'une synergie potentielle avec d'autres gènes et/ou des facteurs du microenvironnement tumoral.

4.11 La création d'une nouvelle souris transgénique K19-HTDE/GFP :

La création d'une nouvelle souris transgénique exprimant HTDE/GFP sous le contrôle du promoteur de la kératine 19 est un objectif important dans la caractérisation du rôle de HTDE dans la tumorigénèse *in vivo*. Malgré le fait que

nous n'avons pas réussi à générer un animal fondateur dans la première ronde de microinjections (voir figure 13), cela demeure un objectif à court terme. Vu l'importance accordée à l'environnement *in vivo* dans nos résultats, cela suggère que l'approche des souris transgéniques reste une approche de choix dans la caractérisation de HTDE et son rôle dans la tumorigénèse. Les souris composites et/ou hybrides, qui sont générées par le croisement de souris avec des mutations spécifiques dans des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, peuvent contribuer à l'élucidation de comment ces gènes ou ces mutations peuvent individuellement coopérer de façon mécanique et engendrer un cancer dans le contexte d'une progression tumorale à plusieurs étapes (Rangarajan et al. 2003). C'est pourquoi à plus long terme, nous proposons de croiser les futures souris transgéniques K19-HTDE/GFP obtenues prochainement avec une autre lignée de souris transgéniques, que nous possédons déjà au laboratoire, les souris K19-PyLT exprimant l'antigène grand T du virus de polyome sous le contrôle du promoteur K19 (Lebel 1995). Nous pensons que les doubles transgéniques, exprimant dès la naissance PyLT et HTDE, nous aideront à mieux évaluer la synergie possible entre les deux transgènes et à définir plus adéquatement l'implication de chacun dans la progression tumorale.

4.12 Les autres séquences de HTDE:

Les chemins génétiques de la progression tumorale peuvent aussi être affectés par le complément du lot de gènes de l'hôte agissant comme facteurs de

susceptibilité et ces derniers peuvent agir sur des mécanismes compensatoires pouvant être subdivisés suivant leurs effets sur le développement tumoral *i.e.* prolifération, vascularisation, adhésion. Cependant, leur influence est indirectement reliée au chemin génétique. Dans le contexte de l'étude de notre gène d'intérêt, nous sommes conscients qu'il existe une possibilité que HTDE fasse aussi parti de ce groupe de gènes. L'analyse d'un buvardage Northern effectué sur quelques tumeurs pulmonaires humaines a montré que plusieurs bandes étaient présentes et que seulement quelques patients présentaient une surexpression de HTDE (Bossolasco 1999) suggérant qu'il ne s'agit pas d'un phénomène généralisé ni d'une relation avec le type histopathologique, mais d'un possible mécanisme compensatoire. Ces résultats suggèrent la possibilité que HTDE puisse agir de façon indirecte ou que son expression soit indirectement relié à la progression tumorale. Toutefois, les résultats présentés dans ce mémoire semblent favoriser une implication directe fortement influencée par le microenvironnement *in vivo*. Des résultats montrant que HTDE peut inhiber l'apoptose semblent aller également dans le sens de l'hypothèse du rôle direct. Meilleure sera notre compréhension des mécanismes compensatoires impliqués dans certaines tumeurs, plus facile sera notre évaluation de leur véritable contribution à la carcinogénèse.

Les travaux présentés dans ce mémoire ne font état que de la caractérisation de la séquence de HTDE dite de pleine longueur. Des polymorphismes et des variants d'épissage ont aussi été rapportés (Bossolasco

1999). Donc, il existe potentiellement d'autres formes non caractérisées de HTDE dont nous n'avons pas évalué le potentiel oncogénique. Bien qu'aucune mutation ou délétion n'ait été identifiée jusqu'à présent, ces données suggèrent que l'analyse des autres formes de HTDE est nécessaire avant de se prononcer sur le rôle de cette protéine dans la tumorigénèse.

4.13 Les conclusions finales :

En résumé, nous avons localisé la protéine de fusion HTDE/GFP à la membrane plasmique dans plusieurs types cellulaires dont les HEK293, A549 et TOV112D par microscopie à fluorescence. La protéine HTDE est une protéine glycosylée et nous postulons qu'il s'agit peut-être d'une modification post-traductionnelle commune à plusieurs membres de cette famille de protéine. Nous avons déterminé que HTDE/GFP n'avait pas un potentiel immortalisant *in vitro* dans des REFs comparé à PyLT/GFP dans les conditions de notre essai d'immortalisation. Nous avons remarqué que HTDE a le potentiel d'induire une des caractéristiques des cellules transformées, soit la perte de l'inhibition de contact, lorsqu'il est exprimé de façon stable dans des cellules Rat-1 *in vitro* laissées à confluence. Des xénogreffes de cellules Rat-1 exprimant HTDE de façon stable chez des souris immunodéficientes forment des tumeurs *in vivo* chez tous les animaux injectés. La protéine HTDE possède donc le potentiel de promouvoir la croissance de tumeurs *in vivo*. Cette dernière observation nous encourage à envisager d'autres approches *in vivo* afin de mieux caractériser le rôle de HTDE tout en tenant compte du rôle primordial du microenvironnement

sur la progression tumorale. Un animal fondateur d'une nouvelle souris transgénique K19-HTDE/GFP verra le jour sous peu et cette dernière approche, en plus de futurs croisements avec d'autres souris transgéniques, nous l'espérons, nous aidera à mieux caractériser la protéine HTDE et à approfondir son rôle dans la tumorigénèse.

5.0 Bibliographie

Adams, J.M. and Cory, S. (1991) Transgenic models of tumor development. *Science*, 254, 1161-7.

Adra, C.N., Boer, P.H. and McBurney, M.W. (1987) Cloning and expression of the mouse pgk-1 gene and the nucleotide sequence of its promoter. *Gene*, 60, 65-74.

Aoki, S., Su, Q., Li, H., Nishikawa, K., Ayukawa, K., Hara, Y., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H. and Wada, K. (2002) Identification of an axotomy-induced glycosylated protein, AIGP1, possibly involved in cell death triggered by endoplasmic reticulum-Golgi stress. *J Neurosci*, 22, 10751-60.

Bautch, V.L. (1989) Effects of polyoma virus oncogenes in transgenic mice. *Mol Biol Med*, 6, 309-17.

Benjamin, T.L. (2001) Polyoma virus: old findings and new challenges. *Virology*, 289, 167-73.

Berns, A. (1991) Tumorigenesis in transgenic mice: identification and characterization of synergizing oncogenes. *J Cell Biochem*, 47, 130-5.

Bonner, A.E., Lemon, W.J., Devereux, T.R., Lubet, R.A. and You, M. (2004) Molecular profiling of mouse lung tumors: association with tumor progression, lung development, and human lung adenocarcinomas. *Oncogene*, 23, 1166-76.

Bossolasco, M., Lebel, M., Lemieux, N. and Mes-Masson, A.M. (1999) The human TDE gene homologue: localization to 20q13.1-13.3 and variable expression in human tumor cell lines and tissue. *Mol Carcinog*, 26, 189-200.

Botchan M, G.T., Sharp P (ed.) (1986) DNA Tumor Viruses: Control of Gene Expression and Replication. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bowden, G.T. and Krieg, P. (1991) Differential gene expression during multistage carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 93, 51-6.

Brembeck, F.H., Moffett, J., Wang, T.C. and Rustgi, A.K. (2001) The keratin 19 promoter is potent for cell-specific targeting of genes in transgenic mice. *Gastroenterology*, 120, 1720-8.

Chalifour, L.E., Mes-Masson, A.M., Gomes, M.L. and Wang, N.S. (1992) Testicular adenoma and seminal vesicle engorgement in polyomavirus large-T antigen transgenic mice. *Mol Carcinog*, 5, 178-89.

Clarke, A.R. (2002) *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols*. Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA.

Cowie, A., de Villiers, J. and Kamen, R. (1986) Immortalization of rat embryo fibroblasts by mutant polyomavirus large T antigens deficient in DNA binding. *Mol Cell Biol*, 6, 4344-52.

Crosti, P., Malerba, M. and Bianchetti, R. (2001) Tunicamycin and Brefeldin A induce in plant cells a programmed cell death showing apoptotic features. *Protoplasma*, 216, 31-8.

Dejgaard, S., Nicolay, J., Taheri, M., Thomas, D.Y. and Bergeron, J.J. (2004) The ER glycoprotein quality control system. *Curr Issues Mol Biol*, 6, 29-42.

Desjardins, P., Pilon, A.A., Hassell, J.A. and Mes-Masson, A.M. (1997) Polyomavirus large T-antigen binds the 'pRb related' protein p130 through sequences in conserved region 2. *Virus Res*, 47, 85-90.

Dilworth, S.M. (2002) Polyoma virus middle T antigen and its role in identifying cancer-related molecules. *Nat Rev Cancer*, 2, 951-6.

Forgacs, E., Zochbauer-Muller, S., Olah, E. and Minna, J.D. (2001) Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. *Pathol Oncol Res*, 7, 6-13.

Graeber, T.G. and Eisenberg, D. (2001) Bioinformatic identification of potential autocrine signaling loops in cancers from gene expression profiles. *Nat Genet*, 29, 295-300.

Grossman, T.R., Luque, J.M. and Nelson, N. (2000) Identification of a ubiquitous family of membrane proteins and their expression in mouse brain. *J Exp Biol*, 203 Pt 3, 447-57.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.

Hartwell, L.H. and Kastan, M.B. (1994) Cell cycle control and cancer. *Science*, 266, 1821-8.

Helenius, A. and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291, 2364-9.

Herzig, M. and Christofori, G. (2002) Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1602, 97-113.

Huet, G., Gouyer, V., Delacour, D., Richet, C., Zanetta, J.P., Delannoy, P. and Degand, P. (2003) Involvement of glycosylation in the intracellular trafficking of glycoproteins in polarized epithelial cells. *Biochimie*, 85, 323-30.

Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I.P. and Bodmer, W.F. (1999) Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer*, 35, 1986-2002.

Jensen, N.A., Baron-Van Evercooren, A., Mattei, M.G., Galiana, E., Guron, C., Pincon-Raymond, M., Baron, H., Rouget, P., Cuzin, F. and Rassoulzadegan, M. (1989) Neurological disorder in transgenic mice that express the large T antigen of polyoma virus in the nervous system. *Mol Biol Med*, 6, 493-500.

Knudson, A.G., Jr., Hethcote, H.W. and Brown, B.W. (1975) Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 5116-20.

Krueger, W.H., Gonye, G.E., Madison, D.L., Murray, K.E., Kumar, M., Spoerel, N. and Pfeiffer, S.E. (1997) TPO1, a member of a novel protein family, is developmentally regulated in cultured oligodendrocytes. *J Neurochem*, 69, 1343-55.

Kukuruzinska, M.A. and Lennon, K. (1998) Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9, 415-48.

Ladanyi, M. and Gerald W.L. (2003) Expression profiling of human tumors: diagnostic and research applications. Humana Press, Totowa, NJ. Part II, Chap 4: SAGE in cancer research contributed by Aldaz CM.

Land, H., Parada, L.F. and Weinberg, R.A. (1983) Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science*, 222, 771-8.

Land, H., Parada, L.F. and Weinberg, R.A. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, 304, 596-602.

Larose, A., Dyson, N., Sullivan, M., Harlow, E. and Bastin, M. (1991) Polyomavirus large T mutants affected in retinoblastoma protein binding are defective in immortalization. *J Virol*, 65, 2308-13.

Lebel, M., Bertrand, R. and Mes-Masson, A.M. (1996) Decreased Fas antigen receptor expression in testicular tumor cell lines derived from polyomavirus large T-antigen transgenic mice. *Oncogene*, 12, 1127-35.

Lebel, M. and Mes-Masson, A.M. (1994a) Establishment and characterization of testicular cell lines from MT-PVLT-10 transgenic mice. *Exp Cell Res*, 213, 12-9.

Lebel, M. and Mes-Masson, A.M. (1994b) Sequence analysis of a novel cDNA which is overexpressed in testicular tumors from polyomavirus large T-antigen transgenic mice. *DNA Seq*, 5, 31-9.

Lebel, M., Webster, M., Muller, W.J., Royal, A., Gauthier, J. and Mes-Masson, A.M. (1995) Transgenic mice bearing the polyomavirus large T antigen directed by 2.1 kb of the keratin 19 promoter develop bronchiolar papillary tumors with progression to lung adenocarcinomas. *Cell Growth Differ*, 6, 1591-600.

Lee, N.H., Weinstock, K.G., Kirkness, E.F., Earle-Hughes, J.A., Fuldner, R.A., Marmaros, S., Glodek, A., Gocayne, J.D., Adams, M.D., Kerlavage, A.R. and et al. (1995) Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8303-7.

Lenhard, R.E., Jr. (1996) Cancer statistics: a measure of progress. *CA Cancer J Clin*, 46, 3-4.

Liang, P. and Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257, 967-71.

Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H. and Ke, N.J. (1999) Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun*, 260, 712-7.

Lussier, M., Filion, M., Compton, J.G., Nadeau, J.H., Lapointe, L. and Royal, A. (1990) The mouse keratin 19-encoding gene: sequence, structure and chromosomal assignment. *Gene*, 95, 203-13.

Maniatis T, F.E., Sambrook J (ed.) (1982) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Michel M, Torok N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, Germain L (1996) Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci*, 109, 1017-28.

Mody, N., Hermans, E., Nahorski, S.R. and Challiss, R.A. (1999) Inhibition of N-linked glycosylation of the human type 1alpha metabotropic glutamate receptor by tunicamycin: effects on cell-surface receptor expression and function. *Neuropharmacology*, 38, 1485-92.

Mohla, S. (2004) Under-investigated area in prostate cancer: cross talk between the bone microenvironment and prostate cancer bone metastasis. *J Cell Biochem*, 91, 684-5.

Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B. and Krepler, R. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31, 11-24.

Nielsen, N.H., Arnerlov, C., Cajander, S. and Landberg, G. (1998) Cyclin E expression and proliferation in breast cancer. *Anal Cell Pathol*, 17, 177-88.

Newbold, R.F., Overell, R.W., Connell J.R. (1982) Induction of immortality is an early event in malignant transformation of mammalian cells by carcinogens. *Nature*, 299, 633-35.

Nimmrich, I., Erdmann, S., Melchers, U., Finke, U., Hentsch, S., Moyer, M.P., Hoffmann, I. and Muller, O. (2000) Seven genes that are differentially transcribed in colorectal tumor cell lines. *Cancer Lett*, 160, 37-43.

Peyroche A, Antony B, Robineau S, Acker J, Cherfils J, Jackson CL (1999) Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell Mar*;3(3):275-85

Pilon, A.A., Desjardins, P., Hassell, J.A. and Mes-Masson, A.M. (1996a) Functional implications of mutations within polyomavirus large T antigen Rb-binding domain: effects on pRb and p107 binding in vitro and immortalization activity in vivo. *J Virol*, 70, 4457-65.

Pilon, A.A. and Mes-Masson, A.M. (1996b) Polyomavirus large T antigen zinc finger is not required for efficient cellular immortalization of primary rat embryo fibroblasts. *Virus Res*, 46, 171-5.

Player, A., Gillespie, J., Fujii, T., Fukuoka, J., Dracheva, T., Meerzaman, D., Hong, K.M., Curran, J., Attoh, G., Travis, W. and Jen, J. (2003) Identification of TDE2 gene and its expression in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*, 107, 238-43.

Provencher, D.M., Lounis, H., Champoux, L., Tetrault, M., Manderson, E.N., Wang, J.C., Eydoux, P., Savoie, R., Tonin, P.N. and Mes-Masson, A.M. (2000) Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 36, 357-61.

Rangarajan, A. and Weinberg, R.A. (2003) Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nat Rev Cancer*, 3, 952-9.

Raptis, L., Marcellus, R.C. and Whitfield, J.F. (1990) Transforming signals generated by the polyoma virus tumor antigens. *Adv Enzyme Regul*, 30, 133-42.

Rassoulzadegan, M., Cowie, A., Carr, A., Glaichenhaus, N., Kamen, R. and Cuzin, F. (1982) The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature*, 300, 713-8.

Rassoulzadegan, M., Naghashfar, Z., Cowie, A., Carr, A., Grisoni, M., Kamen, R. and Cuzin, F. (1983) Expression of the large T protein of polyoma virus promotes the establishment in culture of "normal" rodent fibroblast cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 4354-8.

Riley, M.I., Yoo, W., Mda, N.Y. and Folk, W.R. (1997) Tiny T antigen: an autonomous polyomavirus T antigen amino-terminal domain. *J Virol*, 71, 6068-74.

Rodier, F., Bertrand, R., Bossolasco, M. and Mes-Masson, A.M. (2000) Polyomavirus large T-antigen protects mouse cells from Fas-, TNF-alpha- and taxol-induced apoptosis. *Oncogene*, 19, 6261-70.

Rodier F, L.J., Veillette F, Mes-Masson AM (2004) Large T-antigen gene expression reveals cytoskeletal effects and identifies targets in transgenic mice. article soumis et en processus de revision

Sambrook J, F.E., Maniatis T (ed.) (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schedin, P. and Elias, A. (2004) Multistep tumorigenesis and the microenvironment. *Breast Cancer Res*, 6, 93-101.

Shi, S.R., Key, M.E. and Kalra, K.L. (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*, 39, 741-8.

Shultz, L.D. and Sidman, C.L. (1987) Genetically determined murine models of immunodeficiency. *Annu Rev Immunol*, 5, 367-403.

Taketo, M., Schroeder, A.C., Mobraaten, L.E., Gunning, K.B., Hanten, G., Fox, R.R., Roderick, T.H., Stewart, C.L., Lilly, F., Hansen, C.T. and et al. (1991) FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 2065-9.

Tannock IF, H.R. (ed.) (1998) *The Basic Science of Oncology*. McGraw-Hill.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, 24, 145-9.

Van Dyke, T. and Jacks, T. (2002) Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell*, 108, 135-44.

Vande Woude GF, L.A., Topp WC, Watson JD (ed.) (1984) *Oncogenes and Viral Genes*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Vashist, S. and Ng, D.T. (2004) Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol*, 165, 41-52.

Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science*, 270, 484-7.

Vogt, M. and Dulbecco, R. (1962) Studies on cells rendered neoplastic by polyoma virus: the problem of the presence of virus-related materials. *Virology*, 16, 41-51.

Weaver, V.M. and Gilbert, P. (2004) Watch thy neighbor: cancer is a communal affair. *J Cell Sci*, 117, 1287-90.

Wenzel-Seifert, K. and Seifert, R. (2003) Critical role of N-terminal N-glycosylation for proper folding of the human formyl peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 301, 693-8.

Wu, X. and Pandolfi, P.P. (2001) Mouse models for multistep tumorigenesis. *Trends Cell Biol*, 11, S2-9.

Xu, J., Ji, C., Wang, L., Cao, Y., Dai, J., Ye, X., Zeng, L., Wu, Q., Xie, Y. and Mao, Y. (2003) Cloning and expression of a novel human C5orf12 gene*, a member of the TMS_TDE family. *Mol Biol Rep*, 30, 47-52.

Yaccoby, S., Wezeman, M.J., Henderson, A., Cottler-Fox, M., Yi, Q., Barlogie, B. and Epstein, J. (2004) Cancer and the microenvironment: myeloma-osteoclast interactions as a model. *Cancer Res*, 64, 2016-23.

Yu, C.C., Woods, A.L. and Levison, D.A. (1992) The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. *Histochem J*, 24, 121-31.

Zarbl, H., Kho, C.J., Boylan, M.O., Van Amsterdam, J., Sullivan, R.C., Hoemann, C.D. and Afshani, V.L. (1991) Functional in vitro assays for the isolation of cell transformation effector and suppressor genes. *Environ Health Perspect*, 93, 83-9.

Zheng, D.Q., Vayssiere, J.L., Petit, P.X., LeCoeur, H., Spatz, A., Mignotte, B. and Feunteun, J. (1994) Apoptosis is antagonized by large T antigens in the pathway to immortalization by polyomaviruses. *Oncogene*, 9, 3345-51.

6.0 Annexe

Les Cinq Lois de la Biologie Moléculaire

(découvertes à force de réflexions profondes pendant ma maîtrise)

1. Il faut toujours avoir la foi!

(parce que si vous n'y croyez pas, ça ne marchera jamais)

2. Rien ne marche du premier coup!

(et si ça marche du premier coup, vous ne pourrez le refaire)

3. Il faut toujours avoir des contrôles!

(toujours bien évaluer le choix des contrôles est primordial)

4. Des fois, ...mais pas toujours!

(les expériences marchent souvent, ...mais pas tous les jours)

5. C'est normal!

(cette dernière loi englobe tout ce qui n'est pas couvert par les quatre lois précédentes et bien plus encore... en cas de doute ou de désespoir, toujours se rapporter à la cinquième loi)

