



Université de Montréal

**Impacts fonctionnels des variants génétiques dans les promoteurs des gènes  
associés à la survie et à la mort cellulaire**

Par  
Janick St-Cyr

Programme de biologie moléculaire  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du  
grade de maîtrise en biologie moléculaire

Août, 2011

Copyright, Janick St-Cyr, 2011

Université de Montréal  
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :  
**Impacts fonctionnels de variants génétiques dans les promoteurs des gènes  
associés à la survie et à la mort cellulaire**

Présenté par :  
Janick St-Cyr

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Bertrand  
Président-rapporteur

Daniel Sinnett  
Directeur de recherche

Andrea Richter  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

La régulation de l'apoptose est importante dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et l'intégrité du matériel génétique. L'apoptose est un mécanisme cellulaire qui élimine les cellules endommagées. Le bon fonctionnement de cette voie biologique est crucial pour contrer la propagation des cellules avec leurs anomalies génétiques. La dérégulation des gènes codants pour des composantes de la voie intrinsèque de l'apoptose est fréquemment observée chez divers types de cancers, incluant la leucémie. Nous proposons que des polymorphismes fonctionnels localisés dans la région régulatrice (rSNP) des gènes impliqués dans la voie d'apoptose intrinsèque auraient un impact significatif dans l'oncogenèse en modifiant le taux d'expression de ces gènes.

Dans cette étude, nous avons validé, à l'aide d'une combinaison d'approches *in silico* et *in vitro*, l'impact fonctionnel de la variabilité génétique sous la forme d'haplotypes (rHAPs), au niveau du promoteur proximal, de 11 gènes codant pour des composantes de la voie intrinsèque de l'apoptose. Pour ce faire, nous avons sous-cloné les rHAPs majeurs dans un vecteur contenant le gène rapporteur luciférase (pGL3b). Ces constructions furent utilisées dans des essais de transfections transitoires dans 3 lignées cellulaires (Hela, Jeg3 et Jurkat).

Nous avons observé qu'au moins 2 rHAPs influencent significativement l'activité transcriptionnelle de façon allèle spécifique. Ces rHAPs sont associés aux gènes YWHAB et YWHAQ. Les analyses de retard sur gel d'électrophorèse (EMSA) ont permis d'identifier 2 sites de liaison ADN-protéine différentielles dans les rHAPs du gène YWHAB. La

variabilité du niveau d'expression des gènes étudiés pourrait contribuer à la susceptibilité interindividuelle de développer un cancer, tel que la leucémie de l'enfant.

*Polymorphismes, promoteurs, apoptose, impact fonctionnel, cancer.*

## ABSTRACT

The regulation of apoptosis is important in maintaining cellular homeostasis and the integrity of the genetic material. Apoptosis is a cellular mechanism that eliminates damaged cells. The operation of this biological pathway is crucial to counter the spread of cells and their genetic abnormalities. Deregulation of genes encoding components of the intrinsic pathway of apoptosis is frequently observed in various types of cancers, including leukemia. We propose that functional polymorphism located in the regulatory region (rSNP) of genes involved in the intrinsic apoptosis pathway would have a significant impact in oncogenesis by altering the expression levels of these genes.

In this study, we validated, using a combination of *in silico* and *in vitro* approaches, the functional impact of genetic variability (analyzed as haplotypes, rHap) at the proximal promoters of 11 genes encoding components of the intrinsic apoptosis pathway. To do this, we subcloned the major rHaps in a vector containing the luciferase reporter gene (pGL3b). These constructs were used in transient transfection assays in three human cell lines (HeLa, Jurkat and JEG3).

We observed that at least 2 rHaps significantly influence the transcriptional activity of a specific allele. These rHaps are associated with genes YWHAB and YWHAQ. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) have identified 2 sites for differential DNA-protein binding with the rHaps of YWHAB. Variability in the level of expression of the genes studied could contribute to interindividual susceptibility to developing cancer, such as childhood leukemia.

*Polymorphisms, promoters, apoptosis, functional impact, cancer.*

## TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
ABSTRACT .....	v
TABLES DES MATIÈRES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS .....	xv
INTRODUCTION .....	1
Apoptose.....	1
Caspases.....	2
La voie extrinsèque.....	4
La voie intrinsèque.....	5
Autres voies de l'apoptose.....	7
Dérégulation de l'apoptose et cancer.....	10
Variabilité génétique.....	14
Les SNPs ; la mutation des nucléotides et l'impact de leur localisation.....	16
SNPs régulateurs (rSNPs) .....	18
SNPs régulateurs dans les gènes de l'apoptose .....	20
Haplotypes et déséquilibre de liaison.....	23
Hypothèses.....	25
Objectifs du projet.....	26
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	27
Lignées cellulaires .....	27
Identification de polymorphismes régulateurs (rSNPs) .....	28
Détermination des haplotypes fréquents .....	28
Étude de l'impact fonctionnel des rSNPs / rHaplotypes .....	29
Essai de gène rapporteur .....	29
Expériences de Retard sur gel.....	32
Mutagenèse dirigée.....	33

RÉSULTATS.....	35
YWHAB (14-3-3- $\beta$ ).....	38
YWHAQ (14-3-3- $\tau/\theta$ ) .....	51
DISCUSSION .....	62
Rappel du projet.....	62
Sommaire des résultats obtenus.....	63
La famille protéique 14-3-3 .....	64
YWHAB (14-3-3- $\beta$ ) .....	68
YWHAQ(14-3-3- $\tau/\theta$ ) .....	71
Limitations de l'étude .....	74
CONCLUSION.....	76
BIBLIOGRAPHIE.....	77
ANNEXES.....	xvii



## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I : Polymorphismes des régions régulatrices des gènes de l'apoptose associés à diverses maladies.

Tableau II . Résumé des résultats obtenus pour les promoteurs des 11 gènes étudiés de la voie intrinsèque de l'apoptose.

Tableau III . SNPs du promoteur d'YWHAB avec leur position génomique.

Tableau IV . Haplotypes fréquents de la région promotrice d'YWHAB et leur fréquence observée dans notre cohorte de contrôles et de patients.

Tableau V : Liste des facteurs de transcription prédits lors des analyses in silico pour le SNP -730 T/G du gène YWHAB par le logiciel MatInspector.

Tableau VI : Liste des facteurs de transcription prédits lors des analyses in silico pour le SNP -141 C/T du gène YWHAB par le logiciel MatInspector.

Tableau VII . SNPs du promoteur d'YWHAQ avec leur position génomique et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte.

Tableau VIII . Haplotypes fréquents de la région promotrice d'YWHAQ et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte.

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Illustration des différentes caspases regroupées selon leur fonction.

Figure 2. Schéma représentant la voie intrinsèque (gauche) et la voie extrinsèque (droite) de l'apoptose.

Figure 3 : Schéma des différentes composantes menant à l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose (Ashkenazi, 2002).

Figure 4 : Schéma des différentes composantes menant à l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose (Ashkenazi, 2002).

Figure 5 : Voie de l'apoptose induite par la libération des perforines et granzyme B d'une cellule lymphocyte T cytotoxique (SIGMA-ALDRICH).

Figure 6 : Suivi des événements critiques menant au développement des cancers

Figure 7 : La protéine p53 est un supresseur de tumeur qui agit à divers niveaux afin de bloquer la progression de la carcinogenèse (Evan, 2001).

Figure 8 : Localisation des différents types de SNPs

Figure 9 : Types de polymorphismes, haplotypes et déséquilibre de liaison. (Altshuler, 2008)

Figure 10 : Variation des taux de transcrits et des protéines correspondantes causée par un rSNP.

Figure 11 : Schéma résumant l'approche expérimentale utilisée

Figure 12 . Réactions de recombinaison BP et LR effectuée par la technologie Gateway.

Figure 13 . Vue d'ensemble de la méthode utilisée pour la mutagenèse dirigée (référence : manuel d'utilisation fournit par Agilent Technologies)

Figure 14 . Schéma du promoteur proximal d'YWHAB avec ses rSNPs.

Figure 15 . Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur d'YWHAB

Figure 16 . Expérience de retard sur gel montrant une liaison différentielle au niveau du rSNP -730 T>G d'YWHAB.

Figure 17 . Expérience de retard sur gel montrant une liaison différentielle au niveau du rSNP -141 C>T d'YWHAB.

Figure 18 : Schéma des constructions utilisées lors des expériences de mutagenèse dirigée pour le gène YWHAB.

Figure 19 . Impact fonctionnel de la mutagenèse dirigée à partir de l'haplotype H8 du promoteur d'YWHAB.

Figure 20 . Schéma des haplotypes du promoteur raccourci d'YWHAB.

Figure 21 . Impact fonctionnel des promoteurs raccourcis d'YWHAB.

Figure 22 . Schéma du promoteur d'YWHAQ avec ses SNPs.

Figure 23 . Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur d'YWHAQ.

Figure 24 . Expérience de retard sur gel montrant une liaison non-différentielle au niveau du rSNP -515 T>C d'YWHAQ.

Figure 25 . Expérience de retard sur gel montrant une liaison non-différentielle au niveau du rSNP -95 C>G d'YWHAQ.

Figure 26 : Schéma des constructions utilisées lors des expériences de mutagenèse dirigée pour le gène YWHAQ

Figure 27 . Impact fonctionnel de la mutagenèse dirigée à partir des haplotypes H1 et H2 du promoteur d'YWHAQ.

Figure 28 . Schéma des haplotypes du promoteur raccourci d'YWHAQ.

Figure 29 . Impact fonctionnel des promoteurs raccourcis d'YWHAQ.

Figure 30 : Les dommages à l'ADN induisent les fonctions des protéines 14-3-3 en amont et en aval de la protéine p53 (Hermeking, 2003).

Figure 31 : Mécanisme d'action anti-apoptotique d'YWHAQ (14-3-3) lors de sa liaison avec BAD (Hermeking, 2003).

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
A-MEM	Alpha-Modification Minimal Essential Medium
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BAG1	BCL2-associated athanogene 1
BAG3	BCL2-associated athanogene 3
BCL2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
BH	BCL2-homology
bp	paire de base
C <sup>0</sup>	degrés Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CARD9	caspase recruitment domain family, member 9
cDNA	coding DNA
CMV	<i>Cytomégalo</i> virus
CNV	Copy Number Variation
CYC	cytochrome c
dNTPs	mélange des quatre désoxyribonucléotides triphosphates
DLR	Dual-Luciferase Reporter
E.Coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eSNP	SNP exonique
EtBr	bromure d'éthidium
FBS	sérum de veau fétal
fmol	fento mole
g	gramme
gSNP	SNP génomique

HR	recombinaison homologue
iSNP	SNP intronique
kb	kilobase
LB	Luria broth
LLA	leucémie lymphoblastique aiguë
M	molaire
MAP4K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1
MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8
mg	milligramme
MgCl <sub>2</sub>	chlorure de magnésium
miRNA	microARN
mL	millilitre
mM	millimolaire
NaOH	Hydroxide de sodium
ng	nanogramme
NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
Opti-MEM	OptimalModification Minimum essential Medium
pSNP	SNP dans le promoteur
PBS	phosphate buffer solution
PCR	Polymerase Chain Reaction
pmoles	picomoles
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
rSNP	SNP régulateur
SDS	sodium dodecyl sulfate
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SV40	virus simien 40
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris-EDTA

TF	Facteur de transcription
TFBS	Transcription factor binding site
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UTR	Untranslated Region
V	volt
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
YWHAB	tyrosine 3-monoxygenase/ tryptophan 5-monoxygenase protein, beta polypeptide
YWHAQ	tyrosine 3-monoxygenase/ tryptophan 5-monoxygenase protein, theta polypeptide
µg	microgramme
µL	microlitre

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier le Dr. Daniel Sinnett ainsi que tous les membres de son laboratoire. Un merci particulier à Manon Ouimet, Mathieu Larivière et Pauline Cassart pour votre aide, vos idées et nos discussions que j'ai beaucoup appréciées, je vous en suis très reconnaissante.





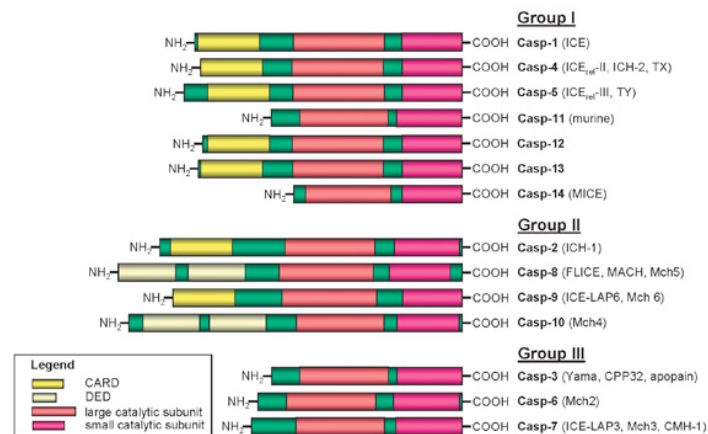
## INTRODUCTION

### *Apoptose*

Chaque jour, un corps adulte produit environ 50-70 billions de cellules grâce au cycle cellulaire (Kitada, 2002). Afin de rester équilibré, il élimine autant de cellules afin de garder son corps en homéostasie. Il existe deux différents types de mort cellulaire : l'apoptose et la nécrose. Ces deux mécanismes cellulaires ont des caractéristiques qui les distinguent et ils peuvent se produire indépendamment, séquentiellement et même simultanément (Zeiss, 1997), (Hirsch, 1997). D'une part, la nécrose survient suite à des traumatismes extrêmes (hypothermie, hypoxie/ischémie) ou suite à une exposition à divers agents toxiques (Kanduc, 2002), (Clavien, 2000). Les organelles intracellulaires, tels que la mitochondrie sont alors détruits ce qui causera une lyse cellulaire complète. La destruction de la membrane plasmique cause ultimement la libération d'enzymes lysosomales (Trump, 1997). La nécrose est souvent associée avec des dommages tissulaires et à une réaction inflammatoire intense (Opie, 1962). D'autre part, l'apoptose ou la mort cellulaire programmée est un processus biologique hautement régulé qui élimine de façon contrôlée les cellules en excès, endommagées, infectées potentiellement dangereuses pour le corps (Elmore, 2007), (Denecker, 2001). Lors de l'activation de l'apoptose, les cellules activées forment des corps apoptotiques et leur ADN se fragmente. Les corps apoptotiques sont ensuite phagocytés par des macrophages et n'induisent pas de réaction inflammatoire (Kurosaka, 2003).

## Caspases

Les caspases sont des protéases à cystéine nommées ainsi pour Cysteine Aspartyl-specific Proteases (Cryns, 1998). En temps normal, les caspases sont retrouvées dans la cellule sous leurs formes inactives (zymogène) (Degterev, 2003). En réponse à un stimulus, les zymogènes sont activés par un processus protéolytique impliquant un résidu aspartate localisé dans le pro-domaine (Timmer, 2007), (Albee, 2007). Cette activation transforme les caspases sous leur forme d'hétérotetramère. (Lu, 2011)



**Figure 1 : Illustration des différentes caspases regroupées selon leur fonction.** Groupe I : les caspases inflammatoires, Groupe II : les caspases initiatrices de l'apoptose et Groupe 3 : les caspases effectrices de l'apoptose. (Lavrik, ActaNaturae)

On compte à ce jour, 14 caspases (Figure 1) dont plusieurs ont un rôle majeur dans l'apoptose tandis que d'autres ont un rôle dans la réponse inflammatoire (caspase 1, 4, 5 et 11 à 14) (Cohen, 1997). Les caspases apoptotiques sont regroupées en deux groupes selon leur structure et leur fonctions : les caspases

2, 8, 9 et 10 ont un pro-domaine plus long et elles font partie des protéines initiatrices de l'apoptose et elles activent les protéines effectrices soit les caspases 3, 6 et 7. Cette cascade protéolytique où une caspase active d'autres caspases crée une amplification du signal apoptotique ce qui mène à une mort cellulaire rapide (Chowdhury, 2008). Il existe deux voies majeurs d'activation de l'apoptose, menant à l'activation des caspases : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Figure 2).

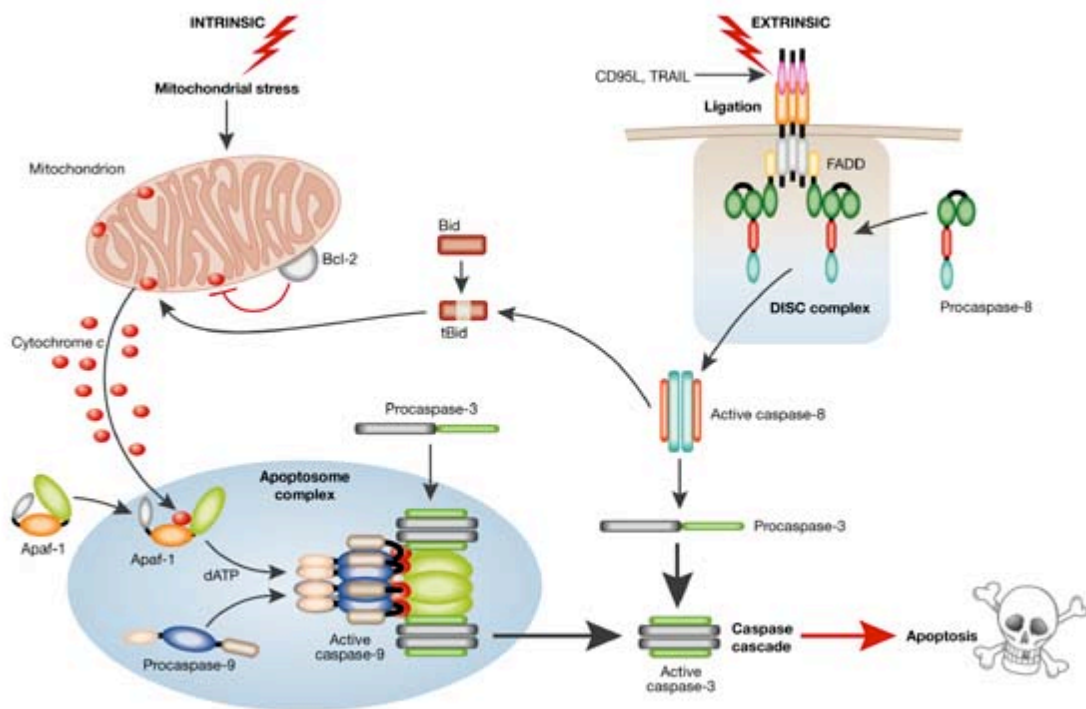


Figure 2. Schéma représentant la voie intrinsèque (gauche) et la voie extrinsèque (droite) de l'apoptose.

## La voie extrinsèque

La voie extrinsèque (death-receptor pathway) est déclenchée via l'activation des récepteurs transmembranaires de la superfamille des récepteurs TNF (tumor necrosis factor receptor) (Aggarwal, 1997). Les récepteurs de mort cellulaire les mieux connus sont FAS et TNF-R1 qui sont activés lors de la liaison avec leurs ligands, Fas (Fas-L) et le TNF- $\alpha$ , respectivement (Ashkenazi, 1998), (Chicheportiche, 1997). L'activation de ceux-ci à la surface cellulaire déclenchent leur tridimérisation ainsi que le recrutement de protéines adaptatrices tel que FADD (MORT1) et/ou RIP (Hsu, 1995), (Kelliher, 1998). FADD peut alors s'associer et activer les pro-caspases 8 ou 2 via la dimérisation des domaines effecteurs "death effector domain" (Wajant, 2002). La voie extrinsèque est empruntée, entre autre, par le système immunitaire pour reconnaître et éliminer les cellules infectées par un virus ou les cellules tumorales. Le déclenchement de l'apoptose est possible lorsque la cellule T cytotoxique va lier la cellule cible par ses ligands FAS.

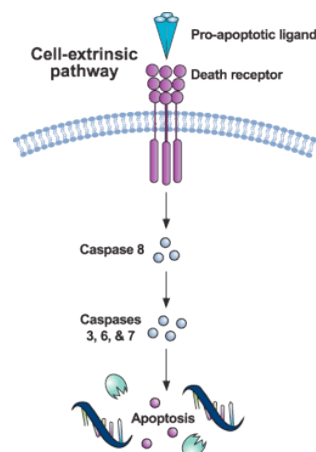


Figure 3 : Schéma des différentes composantes menant à l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose (Ashkenazi, 2002).

## **La voie intrinsèque**

La voie intrinsèque (voie mitochondriale) survient lors d'une réponse à un stimulus intracellulaire tel qu'un dommage à l'ADN ou un stress oxydatif (Figure 4). Le contrôle et la régulation de ces événements apoptotiques au niveau de la mitochondrie sont effectuées par les protéines de la famille Bcl-2 (Cory, 2002). Les membres de la famille des Bcl-2 comportent autant des protéines pro-apoptotiques qu'anti-apoptotiques. À ce jour, un total de 25 gènes ont été identifiés dans la famille Bcl-2. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 comprennent Bcl-X, Bcl-XL, Bcl-W et BAG, et les protéines pro-apoptotiques comprennent Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Bcl-XS et Blk (Adams, 1999), (Gross, 1999). C'est l'équilibre dynamique entre la quantité de protéines pro et anti-apoptose qui détermine le devenir d'une cellule (Burlacu, 2003). Le rôle de ces protéines dans la régulation de l'apoptose, de la tumorigenèse et dans la réponse cellulaire en réponse à la thérapie contre le cancer a été grandement étudié dans les dernières décennies (Youle, 2008).

Les protéines contenant un motif BH3-only peuvent interagir avec les protéines de la famille des BCL-2 afin de promouvoir l'apoptose (Aouacheria, 1996), (Kelekar, 1998), (Wu, 2002). Les membres de cette famille interagissent directement avec la mitochondrie soit constitutivement ou après l'induction de l'apoptose (Kuwana, 2003). Ils régulent la mort cellulaire selon leur effet sur la conformation et la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (Mignotte, 1998). La perméabilisation de la membrane est effectuée grâce à l'ouverture de pores à sa surface qui permet ainsi la libération du cytochrome c (Barry, 2002). Ce dernier libéré lie et active APAF-1 (apoptotic protease activating

factor-1) ainsi que la procaspase-9 pour former un complexe enzymatique nommé apoptosome (Hill, 2004), (Bao, 2007). D'autres protéines telles que les caspases 3 et 9 ainsi qu'AIF (apoptosis inducing factor), l'endonucléase G et Smac/DIABLO sont aussi relâchées lors de cette perméabilisation (Du, 2000), (Mancini, 1998), (Susin, 1999). L'association Smac/DIABLO stimule l'apoptose en inhibant l'activité de la protéine IAP (inhibitors of apoptosis proteins) (Verhagen, 2000). Ces protéases vont à leur tour activer les caspases effectrices en aval de la cascade telles que la caspase-3, la caspase-6 et la caspase-7 (Li, 1998).

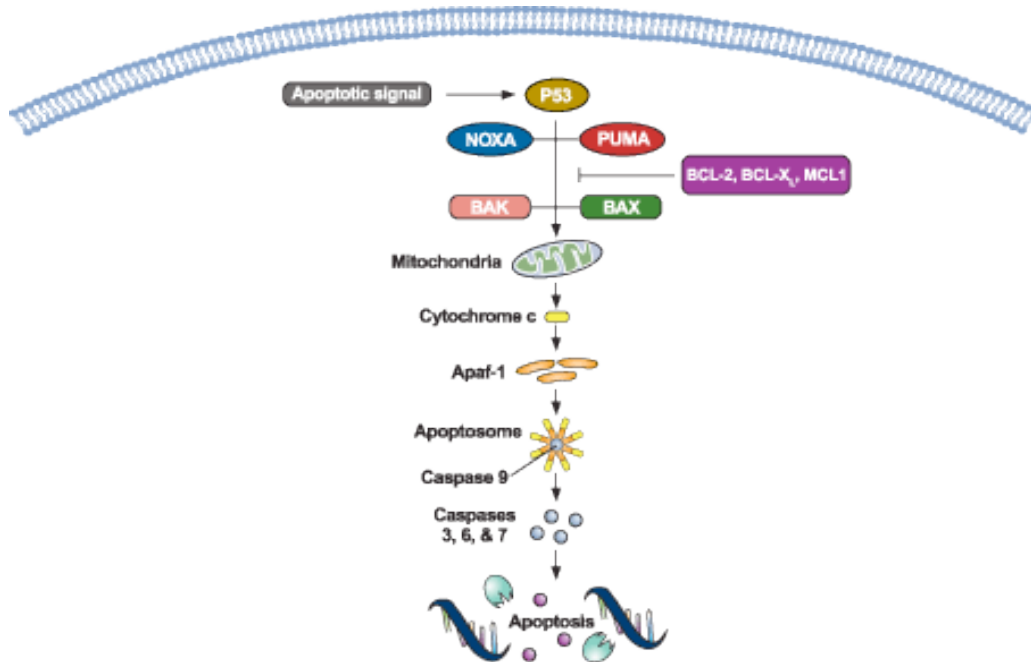


Figure 4 : Schéma des différentes composantes menant à l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose (Ashkenazi, 2002).

Malgré leurs différences, les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose ont des points communs tel que l'importance de la caspase-8 dans leur mécanisme d'activation (Kruidering, 2000). Cette cystéine protéase est un exemple de "cross-talk" entre les deux voies puisqu'elle peut cliver et activer BID, une des protéines de la famille des BCL-2 (Igney, 2002). Sous sa forme active nommée tBID (truncated BID), elle peut migrer vers la surface de la mitochondrie et remplacer les protéines BAX et BAK dans le déclenchement de l'apoptose via la libération du cytochrome c (Li, 1998),(Esposti, 2002).

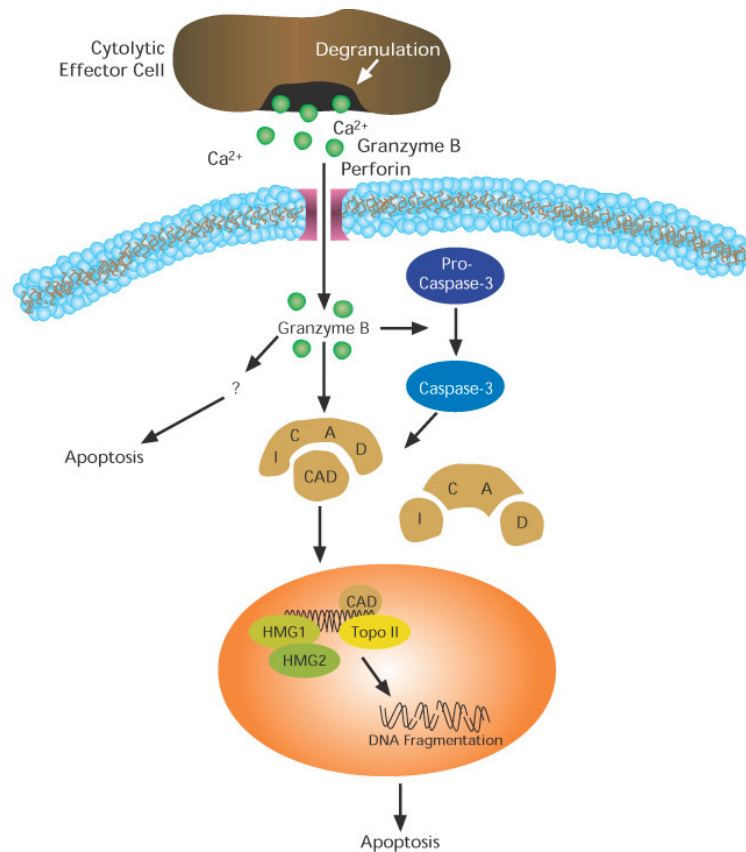
### ***Autres voies de l'apoptose***

L'apoptose peut aussi être déclenché par d'autres voies secondaires. Il existe une voie qui implique les cellules lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et la libération des enzymes nommées perforines et granzymes. Lors de la dégranulation des cellules CTL, des perforines permettent la perméabilisation de la membrane de la cellule cible afin de faire pénétrer des granules (Pinkoski, 2001). Les granules sont composées de protéases sérines : granzyme B ou granzyme A qui ont la capacité d'induire la mort cellulaire (Figure 5).

La protéase granzyme B peut agir par deux mécanismes distincts soit par une voie cytosolique ou par une voie nucléaire. La voie cytosolique active la cascade des caspases pro-apoptotiques tandis que la voie nucléaire implique des protéines du cycle cellulaire tel que la kinase Cdc2 (Shi, 1996). Le granzyme B induit l'apoptose intrinsèque en clivant directement la protéine BID sans requérir la



libération du cytochrome c (Sutton, 2000). Parallèlement, le granzyme A peut induire l'apoptose via un mécanisme caspase-indépendant qui cause un dommage simple brin à l'ADN et qui n'implique pas la protéine BAX (Zhu, 2006).



**Figure 5 : Voie de l'apoptose induite par la libération des perforines et granzyme B d'une cellule lymphocyte T cytotoxique ( SIGMA-ALDRICH).**

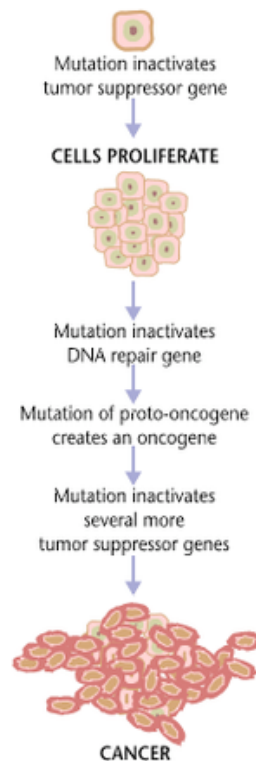
D'autre part, l'apoptose peut être déclenchée lorsqu'une erreur dans la agencement des compartiments cellulaires survient. Par exemple, la synthèse des protéines dans le réticulum endoplasmique implique certains changement post-traductionnels et un repliement structurel des protéines avant d'atteindre leurs conformations finales. L'accumulation de protéines contenant des erreurs dans le

repliement ou glycosylées incomplètement dans le réticulum endoplasmique (RE) résulte en un stress qui mène au déclenchement de l'apoptose par la voie de signalisation menant au rétablissement du repliement (UPR; unfold protein response).

Par ailleurs, les membres des trois classes des protéines de la famille BCL-2 sont retrouvés à la surface de la membrane du RE et elles y influencent sa perméabilité et sa libération du calcium stocké dans sa lumière. La libération du  $Ca^{2+}$  active la caspase-12 qui est localisée dans la région cytosolique du ER (Yoneda, 2001), (Hajnóczky, 2003). La caspase-12 est spécifiquement stimulée lors de l'activation de l'apoptose par un stress du réticulum endoplasmique (Breckenridge, 2003). Plusieurs études suggèrent aussi que des changements de la membrane plasmique liés à l'afflux de  $Ca^{2+}$  figurent parmi les changements critiques pouvant compromettre l'intégrité des cellules ainsi que son destin cellulaire (McConkey, 1989), (Xu, 2001).

### ***Dérégulation de l'apoptose et cancer***

La dérégulation de l'apoptose est un facteur impliqué dans plusieurs maladies humaines tels que les maladies neurodégénératives, les dommages l'ischémiques, les maladies autoimmunes, le SIDA, ainsi que certains types de cancers (Elmore, 2007). Le cancer est un exemple où les mécanismes normaux de régulation du cycle cellulaire sont perturbés, soit par une surprolifération de cellules et/ou une diminution de leur élimination (King, 1998). Cette dérégulation peut être causée par une surexpression des protéines anti-apoptotiques ou par une faible expression des protéines pro-apoptotiques ce qui favorise la survie des cellules non-désirées (Evan, 2001).



**Figure 6 : Suivi des événements critiques menant au développement des cancers**

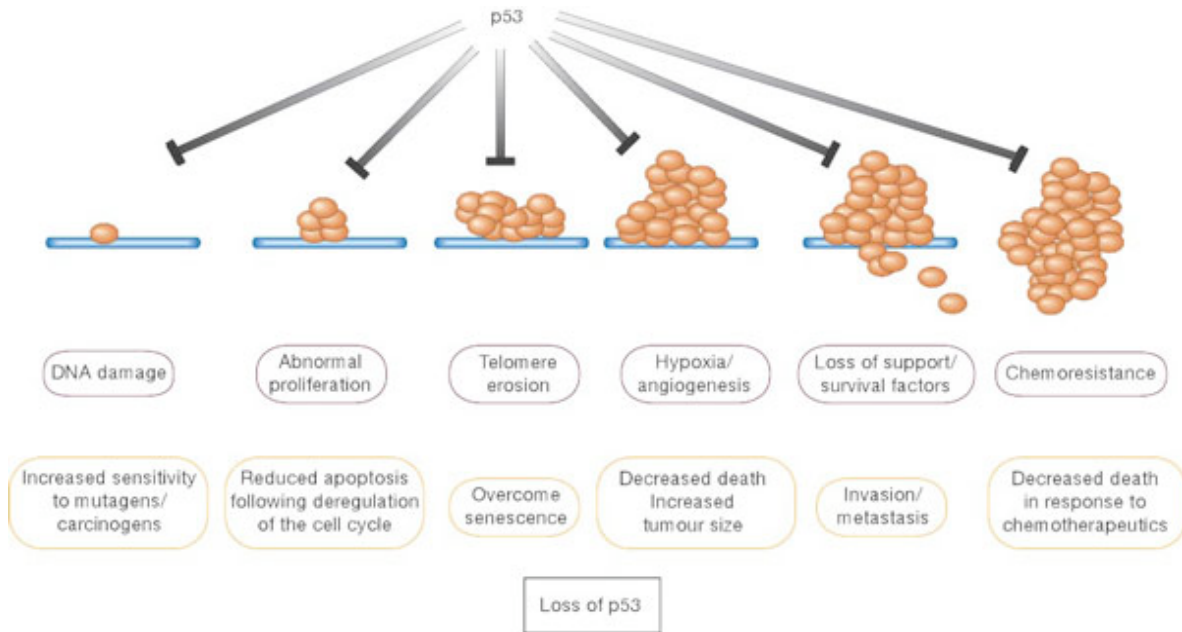
Cette dérégulation permet une accumulation cellulaire en ralentissant le rythme du renouvellement des cellules et en créant des clones néoplasiques dotés d'un avantage de survie sélectif par rapport à leurs équivalents cellulaires normaux (Reed, 1999). Ainsi, les défauts au niveau du mécanisme cellulaire de l'apoptose normal contribuent par de multiples façons à la progression tumorale (Willis, 1999). La dérégulation de la mort cellulaire programmée se produit fréquemment dans les cellules hématologiques et dans d'autres tumeurs malignes. Le mécanisme de l'apoptose est un concept accepté universellement en tant que mécanisme supresseur de tumeurs. L'apparition de mutations qui altèrent le niveau d'expression de protéines clés dans le mécanisme de l'apoptose est observée dans plusieurs différents types cancers. La majorité de ces protéines sont impliquées dans la voie intrinsèque de l'apoptose, probablement en lien avec la réponse liée au stress cellulaire.

BCL-2 a été découvert grâce à son implication dans la translocation chromosomique t(14:18) communément associée avec le lymphome folliculaire non Hodgkinien (Tsujiimoto, 1986). La surexpression de BCL-2 contrecarre l'effet pro-apoptose de c-MYC favorisant ainsi une prolifération massive et les lymphomes qui surexpriment ces deux protéines simultanément sont très agressifs (Evan, 1998). L'élévation du niveau d'expression de la protéine BCL-2 est retrouvée dans la majorité des malignités hématopoïétiques tels que le myélome multiple (MM), la leucémie lymphoblastique chronique (CLL), la leucémie lymphoblastique aigüe (ALL) et leucémie myéloïde aigüe (AML) (Kitada, 2002).

L'inactivation de la protéine pro-apoptotique BAX est observée dans les tumeurs solides ainsi que dans les tumeurs hématopoïétiques (Brimmell, 1998), (Rampino, 1997). Le ratio BCL-2/BAX semble influencer le pronostic ainsi que la sévérité indépendamment du type de leucémie. Ainsi, un ratio élevé est associé à la progression tumorale, à un raccourcissement du temps de rémission ainsi qu'à une mort plus rapide pour les leucémies CLL (Pepper, 1998b), AML (Kornblau, 2000) et ALL (Hogarth, 1999). La surexpression de plusieurs gènes anti-apoptose, membres de la famille BCL-2, a été démontré dans certaines leucémies et myélomes humains dont Mcl-1, Bcl-XL (Wuillème-Toumi, 2005), (Allen, 2010), (Amarante-Mendes, 1998).

Des mutations somatiques qui cause un changement du cadre de lecture (frameshift) dans le gène codant pour la caspase-8 ont été détectés dans des carcinomes hépatocellulaires (Soung, 2005). Une étude a démontré que le gène Apaf-1, une cible en aval de la voie p53, est inactivé dans le mélanome métastatique. De plus, une perte d'hétérozygotie (LOH) du gène Apaf-1 a été retrouvé dans 40% des mélanomes testés (Dai, 2004).

La protéine p53 joue un rôle central dans le déclenchement des réponses cellulaires à une variété de signaux de stress (Levine, 1997). Elle est cruciale dans la capacité d'un individu à contrer la transformation cellulaire et à répondre aux dommages à l'ADN induits par des thérapies contre le cancer (Riley, 2008). Dans la voie p53, les variations génétiques héréditaires communément étudiés sont les SNPs retrouvés dans les gènes p53 (Harris, 1986), (Matlashewski, 1987) et MDM2 (Bond, 2004).



**Figure 7 : La protéine p53 est un supresseur de tumeur qui agit à divers niveaux afin de bloquer la progression de la carcinogenèse (Evan, 2001).**

## ***Variabilité génétique***

Le génome humain est identique chez les individus à près de 99% (Redon, 2006). Il reste donc 1% de la séquence génomique qui diffère entre les individus, d'où la notion de variabilité génétique. On définit généralement les polymorphismes comme étant des variations présentes dans l'ADN avec une fréquence allélique  $\geq 1\%$  dans la population (Knight, 2005).

Il existe plusieurs types de polymorphismes, dont les polymorphismes de longueur et les polymorphismes simples. Les polymorphismes de longueur impliquent des délétions ou insertions de plusieurs nucléotides et les séquences répétées en tandem, VNTR (Variations in the Number of Tandem Repeats) (Vignal, 2002). Ces derniers sont des répétitions variables de séquences de longueurs variables. Il y a deux classes de VNTR : les microsatellites et les minisatellites. Les microsatellites sont lorsque la séquence est de 1 à 6 bp. Ils ne sont généralement pas répétés plus d'une vingtaine de fois et sont localisés un peu partout dans le génome (Karlin, 1995). Les minisatellites sont des répétitions plus longues (environ 10 bp) et ils peuvent pour leur part présenter des centaines de répétition étalées sur de grandes régions (20 kb) (Beckmann, 2007). Ceux-ci sont généralement riches en GC et surtout localisés dans les régions sub-téломériques chez l'humain (Jarman, 1989). (Bois, 2003). Pour ces polymorphismes, c'est le nombre de répétitions qui varie entre les individus et qui est transmis de façon mendélienne.

Les **SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)** sont des polymorphismes simples car un seul nucléotide est différent. Ce sont des mutations d'un seul nucléotide qui sont très fréquentes dans le génome. Ce nucléotide peut être soit supprimé, inséré ou changé pour n'importe lequel des trois autres nucléotides. Leur nombre est estimé à au moins 4 millions et leur fréquence est d'environ 1 à tous les 500 pb le long du génome (Walter, 2008).

Un autre type de variabilité génétique retrouvé est de type structural. La **variabilité du nombre de copies** d'un gène (ou **CNV** pour *copy number variation*) désigne une forme de polymorphisme où le nombre de copies d'un gène ou d'un segment chromosomique dans le génome est variable entre les individus. Les CNVs sont des polymorphismes de répétitions de plus de 1kb et allant jusqu'à quelques mégabases. Cette définition pourrait être prochainement révisée afin de comprendre des répétitions plus petites (Beckmann, 2007). La variabilité du nombre de copies d'un gène ou d'une région serait due à des événements de duplication (regroupement dans une même génération chromosomique de gènes dupliqués en tandem) et délétion locales (c'est-à-dire d'un ou de quelques gènes), souvent suite à un enjambement inégal. Cette forme de polymorphisme, constitue une part importante de la variabilité individuelle. Ainsi, plus de 12% du génome humain serait touché par des CNVs (Redon, 2006). Les CNVs semblent agir non seulement de façon *cis* comme les SNPs (i.e. sur la copie du gène présente sur le même allèle que le SNP), mais également de façon *trans* (Beckmann, 2007). Ainsi le CNV semblerait aussi important que le SNP.



## Les SNPs ; la mutation des nucléotides et l'impact de leur localisation

Les SNPs sont des mutations qui peuvent produire les changements de nucléotides suivants : insertions, délétions ou des substitutions. Les substitutions de nucléotides sont de deux types : des transitions qui consistent en un changement entre deux purines ou deux pyrimidines; ou des transversions qui sont des changements entre une purine et une pyrimidine.

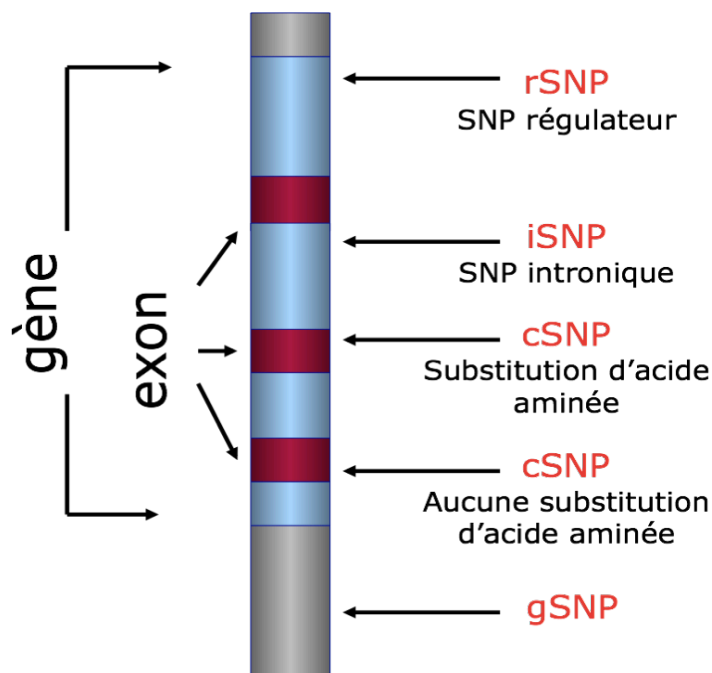


Figure 8 : Localisation des différents types de SNPs

Dépendamment de leur localisation dans le génome et du changement engendré, le SNP peut avoir un impact différent (Figure 8). Les SNPs peuvent être localisés dans la région codante d'un gène (cSNP). À ce moment, le SNP peut produire une mutation dite silencieuse, qui n'affecte pas le code d'acides aminés de la protéine. Par contre, il peut également produire une mutation faux-sens ou non-sens, qui a un effet négatif sur la fonction de la protéine produite. La mutation faux-

sens est obtenue lorsque le nucléotide muté provoque un changement de codon codant pour un acide aminé différent. Cette mutation modifie la protéine pouvant ainsi la rendre non fonctionnelle. La mutation non-sens survient lorsque le nucléotide substitué transforme le codon normal en un codon d'arrêt; ou lorsqu'une insertion ou délétion d'un nucléotide est produite, alors le cadre de lecture de 3 nucléotides est décalé et ceci résulte pour la plupart des fois en un arrêt prématuré de la synthèse de la protéine (Campbell, 1995).

La plupart des SNPs se retrouvent dans les séquences non codantes soit les régions intergéniques (gSNPs), introniques ou encore dans des régions régulatrices. Les SNPs situés dans l'intron (iSNP) de la protéine peuvent également avoir un impact fonctionnel sur la protéine. Les iSNPs peuvent modifier l'épissage du transcrit primaire de la protéine et ainsi produire une protéine tronquée, non fonctionnelle. Les gSNPs situés dans la séquence génomique non codante d'un gène n'ont aucun effet sur la protéine. Finalement les rSNPs localisés dans la partie promotrice du gène (région régulatrice) peuvent avoir un impact fonctionnel sur le niveau d'expression du gène, donc le niveau de transcrit de la protéine, en affectant les sites de liaisons des facteurs de transcription.

## **SNPs régulateurs (rSNPs)**

Au cours des dernières années, la plupart des études réalisées ont porté sur les SNPs localisés dans la partie codante de la protéine (cSNP, coding SNP) qui pourraient altérer la fonction de la protéine (Mitchison, 2001). On croyait alors que seuls les cSNPs qui modifiaient la séquence d'une protéine avaient de l'importance. À l'opposé, les SNPs non-codants, en particulier des régions régulatrices, ont été moins étudiée, malgré l'estimation qu'au moins 25% de la variabilité expliquant les maladies résiderait dans les régions régulatrices des gènes (Knight, 2005). Au cours de mon stage, mon attention a porté plus particulièrement sur les rSNPs. Les SNPs positionnés dans la région régulatrice d'un gène peuvent influencer la liaison de facteurs de transcription (gain ou perte) et ainsi affecter le niveau de transcrits de la protéine (Pastinen, 2004).

Cette modification d'un site de liaison expliquerait la différence du niveau de transcrits de la protéine. Les rSNPs pourraient expliquer jusqu'à 25-35% de la variabilité interindividuelle (Pastinen, 2004). Comme le taux de protéines est régulé par de nombreuses voies biologiques, les polymorphismes régulateurs peuvent influencer des processus biologiques hautement et contribuer au développement de maladies complexes (Pastinen, 2004).

L'étude des SNPs contenus dans la région promotrice des gènes tend à gagner de l'importance grâce à leurs impacts connus sur le niveau d'expression des gènes (Gazquez, 2008), (Juhanson, 2008), (Ober, 2008). La susceptibilité interindividuelle aux maladies complexes pourrait être modulée chez les individus qui possèdent des rSNPs dans des gènes clés.

Les rSNPs les plus étudiés sont ceux des régions promotrices (rSNPs), qui peuvent influencer le niveau de transcription d'un gène en altérant le site de liaison à un facteur de transcription (Knight, 1999). Des études démontrent effectivement un impact significatif des rSNPs dans la susceptibilité au cancer en affectant des gènes impliqués dans le métabolisme des carcinogènes (Sinnott, 2006), dans la régulation du cycle cellulaire (Healy, 2007) et autres protéines impliquées dans la progression du cancer, ainsi que la réponse aux médicaments contre le cancer (Milani, 2007).

## **SNPs régulateurs dans les gènes de l'apoptose**

Puisque notre attention porte sur la voie intrinsèque de l'apoptose, il est important de répertorier les rSNPs connus pour les gènes de cette voie (Tableau I). Une récente étude a démontré que les séquences promotrices des gènes MDM2, P53 et P16 diffèrent selon les individus et que les polymorphismes peuvent modifier l'activité de transcription du gène (Ohsaka, 2010).

Le SNP309 résulte dans un changement thymine vs guanine dans le promoteur de l'oncogène MDM2, qui code pour un régulateur négative de p53. Chez l'homme, le SNP309 est associé à la formation accélérée de tumeurs autant dans les cancers héréditaires que dans les cancers sporadiques. Un modèle est proposé où le SNP309 sert comme un événement de limitation de vitesse dans la carcinogénèse (Bond, 2004). Des mutations de TP53 et CHEK2 ont été associées à l'absence de réponse à l'épirubicine en monothérapie pour traiter le cancer du sein. En revanche, les mutations de TP53 et l'allèle 309G de MDM2 confèrent un faible taux de survie pour les patients traités avec le paclitaxel en monothérapie primaire (Chrisanthar, 2011).

Des mutations dans plusieurs caspases sont associées à différents cancers. Le gène codant pour la caspase-3 possède un SNP dans la région 5'UTR qui est relié au cancer du poumon et aux carcinomes à cellules squameuses (Jang, 2008), (Chen, 2008). Le gène CASP-8 possède deux SNPs dans sa région promotrice qui sont associés au lymphome non-Hodgkin sauf dans la population chinoise (Alizadeh, 2000), (Xiao, 2011). Le risque de développer le cancer du poumon est aussi associé

à divers rSNPs présents dans le gène CASP-9 (Park, 2006). Une étude sur les polymorphismes dans la région promotrice des gènes CASP-8 et CASP-9 a démontré que ces variants influencent la susceptibilité et le développement du cancer de la prostate (Kesarwani, 2011).

Le SNP -31C/G localisé dans la région promotrice du gène BIRC5 est associé au cancer du poumon, au cancer colorectale sporadique ainsi qu'au carcinome du nasopharynx (Jang, 2008), (Gazouli, 2009), (Ma, 2011). Le gène BAX de la famille des BCL-2 contient un rSNP (rs4645857) qui est associé au risque développer la leucémie lymphoblastique chronique (LLC) (Saxena, 2002). Une étude suggère que ce SNP influence la réponse du patient à son traitement chimiothérapeutique contre le cancer du poumon (Knögel, 2008). Le gène BCL-2 possède deux SNPs dont un dans sa région promotrice et un dans sa région 3'UTR qui sont reliés à la LLC (Nuckel, 2007). L'augmentation du risque de développer cette maladie est aussi associée à un SNP dans la région 3'UTR du gène APAF1 (Ejuanes, 2008).

Malgré la présence de plusieurs études réalisées sur la variabilité génétique des promoteurs des gènes de la voie intrinsèque de l'apoptose, les connaissances sur l'impact fonctionnel de ces rSNPs sur l'activité de leur promoteur demeurent limitées.

**Tableau I : Polymorphismes des régions régulatrices des gènes de l'apoptose associés à diverses maladies.**

<b>Gènes</b>	<b>Numéro rs</b>	<b>Région régulatrice</b>	<b>Références*</b>
<b>MDM2</b>	Rs227944	Promotrice	Bond and al
<b>MDM2</b>	Rs937283 Rs2870820	Promotrice	Ohsaka and al
<b>P16</b>	Position -191	Promotrice	Ohsaka and al
<b>CASP3</b>	Rs4647603	5'UTR	Jang and al
<b>CASP8</b>	Rs3834129 Rs3769821	Promotrice	Mei-Sheng Xiao and al
<b>CASP8</b>	Position -652	Promotrice	Kesarwani and al
<b>CASP9</b>	Position -1263	Promotrice	Kesarwani and al
<b>CASP9</b>	Rs4645978 Rs4645981	Promotrice	Park and al
<b>BIRC5</b>	Rs9904341	Promotrice	Ma and al Gazouli and al Jang and al
<b>BAX</b>	Rs4645878	5'UTR	Saxena and al
<b>BCL-2</b>	Rs2279115	Promotrice	Nuckel and al
<b>BCL-2</b>	Rs4987853	3'UTR	Enjuanes and al
<b>APAF1</b>	Rs17028658	3'UTR	Enjuanes and al

\* Voir texte ci-haut pour références détaillées ou autres références.

## Haplotypes et déséquilibre de liaison

Puisque le nombre de SNPs dans le génome est très élevé, il est inconcevable de vouloir tester l'impact fonctionnel de chacun de ceux-ci sur l'expression génique. On se sert alors de la notion de déséquilibre de liaison qui mesure la coexistence non aléatoire des allèles de deux loci. Deux allèles en déséquilibre de liaison sont trouvés ensemble sur le même haplotype plus souvent que ce qui peut être prévu par le hasard (Beckmann, 2007). Un déséquilibre de liaison total survient lorsque deux allèles de deux loci coségrègent toujours, n'ayant jamais subi de recombinaison entre ces deux loci. Puisque le taux de recombinaison dans le génome est assez faible (environ 1 par 100 Mb par génération), les allèles associées à une phénotype sont souvent en déséquilibre de liaison avec les SNPs à proximités, permettant l'utilisation de « tagging SNPs » (Altshuler, 2008). Le déséquilibre de liaison crée alors des « blocs » d'haplotypes dans le génome qui regroupent les régions n'ayant pas subi de recombinaison (Figure 9). Il est donc important dans une étude d'association de considérer la région étudiée comme un haplotype (un regroupement de SNPs), plutôt que d'étudier l'impact individuel de chacun des SNPs. Cela permet de se rapprocher davantage du contexte génomique en étudiant l'impact que peut avoir un ensemble de SNPs sur l'expression génique. Il a d'ailleurs été démontré qu'un SNP pouvait jouer un rôle différent dans un contexte haplotypique comparativement à un contexte individuel (Redon, 2006).



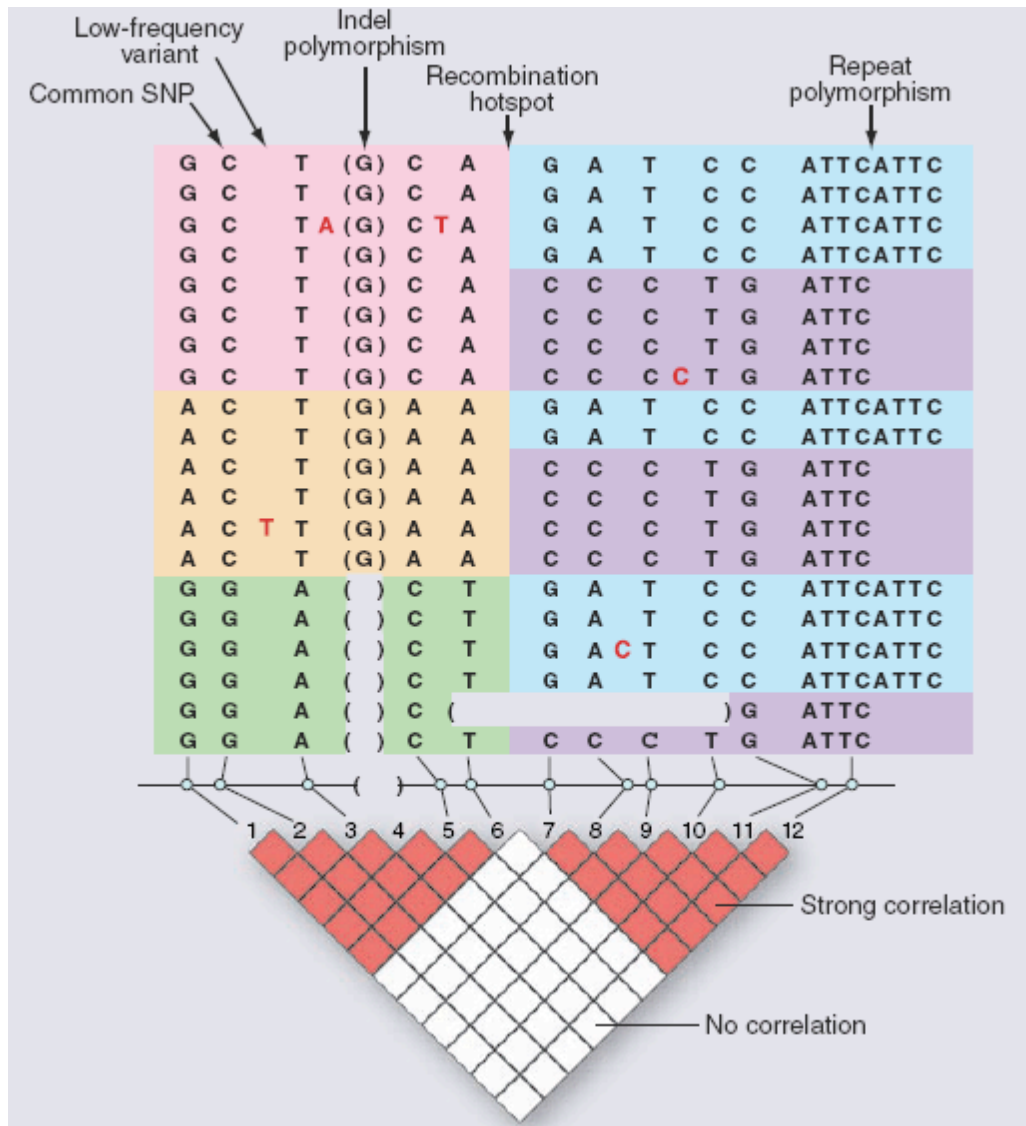


Figure 9 : Types de polymorphismes, haplotypes et déséquilibre de liaison. (Altshuler, 2008)

## Hypothèses

Comme l'apoptose est une voie biologique hautement régulée, nous proposons que des SNPs dans les régions promotrices (rSNP) des gènes d'apoptose perturberaient cette voie via la variation des taux de transcrits et des protéines correspondantes (Figure 10). La présence de rSNPs modifierait la séquence de reconnaissance de certains facteurs de transcription au niveau du promoteur (gain ou perte de liaison), altérant ainsi le niveau d'expression des gènes. De plus, il est possible qu'un seul polymorphisme n'ait pas (ou peu) d'impact, mais que ce soit la combinaison de plusieurs polymorphismes (i.e. haplotype) qui modifie l'expression du gène. Nous proposons que ces rSNPs génèrent une variabilité interindividuelle dans les mécanismes contrôlant l'apoptose, d'où un risque variable de développer certaines maladies complexes tel que le cancer.

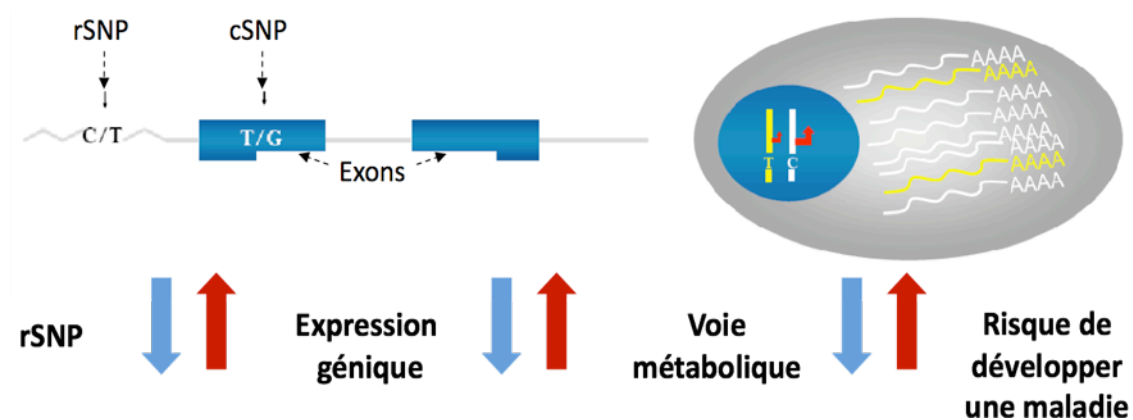


Figure 10 : Variation des taux de transcrits et des protéines correspondantes causée par un rSNP.

## Objectifs du projet

L'objectif général est d'identifier des rSNPs et haplotypes fonctionnels qui seraient responsables de la variation des niveaux d'expression des gènes impliqués dans la voie intrinsèque d'apoptose. Plus particulièrement, j'ai étudié la voie intrinsèque puisque celle-ci est initiée suite à des stress intracellulaires qui semblent favoriser le dérèglement de voies biologiques impliquées dans le développement d'un cancer tel que la leucémie lymphoblastique aïgue.

Les objectifs spécifiques du projet de recherche sont :

(1) Identifier les polymorphismes présents dans la région promotrice proximale des 11 gènes d'apoptose suivants : BAG1, BAG3, CARD9, CD47, CYCS, MAP4K3, MAPK1, MAPK8, NOD1, YWHAB et YWHAQ;

(2) Déterminer les haplotypes les plus fréquents dans la population pour chacun des promoteurs étudiés;

(3) Mesurer l'impact fonctionnel des rSNPs et des haplotypes correspondants à l'aide d'une combinaison d'approche *in vitro* et de mutagenèse dirigée.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires suivantes ont été utilisées dans ce projet : une lignée de cellules humaines en suspension JURKAT (lignée de cellules T leucémiques), deux lignées de cellules humaines adhérentes soit les JEG3 (cellules de choriocarcinome placentaire) et les HeLa (cellules cancéreuse du col de l'utérus).

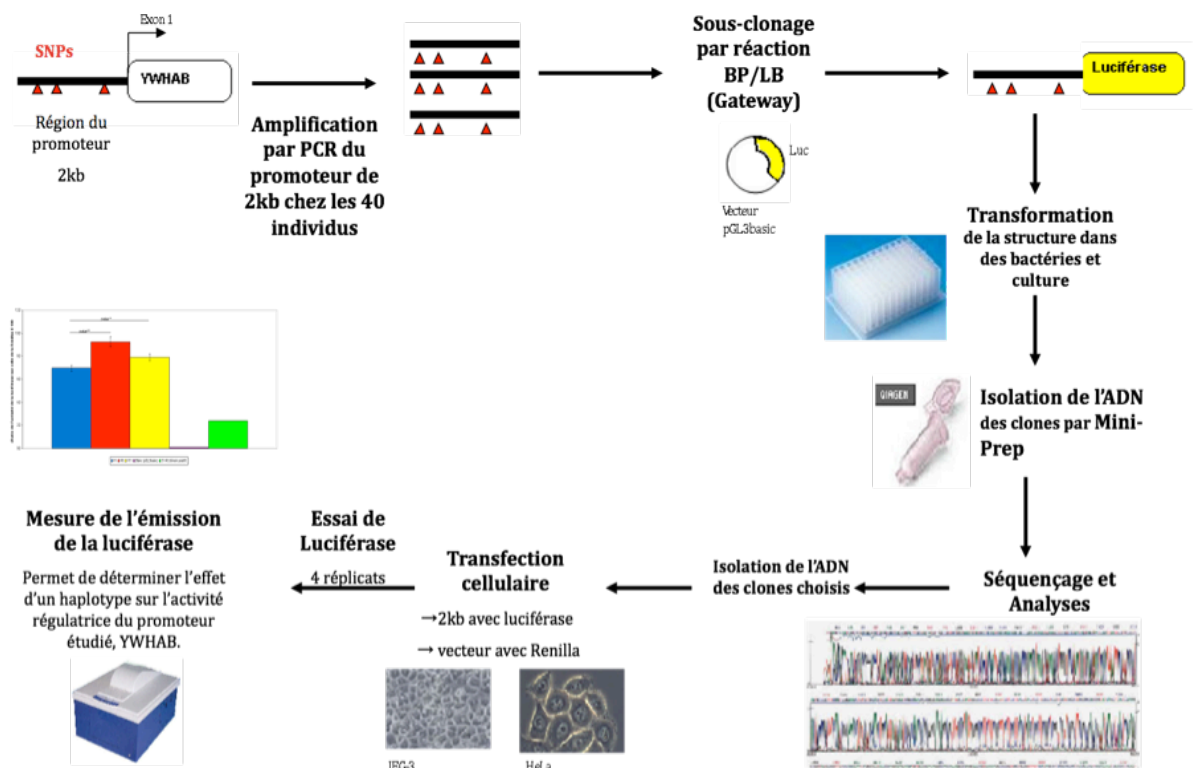


Figure 11 : Schéma résumant l'approche expérimentale utilisée

### ***Identification de polymorphismes régulateurs (rSNPs)***

Les promoteurs proximaux (environ 2kb en amont de l'exon 1) des 11 gènes cibles : BAG1, BAG3, CARD9, CD47, CYCS, MAP4K3, MAPK1, MAPK8, NOD1, YWHAB et YWHAQ ont été amplifiés par PCR. Les différentes conditions de PCRs sont décrites en annexe aux tableaux I et II. Afin d'identifier des rSNPs, nous avons procédé au séquençage directe des produits de PCR générés à partir d'une cohorte de 40 individus d'origines européennes (20 patients atteints de la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) et 20 individus sains (contrôle). Les patients atteints de la LLA ont été ajoutés à la cohorte de cette étude en raison des intérêts de notre laboratoire pour l'étude des déterminants génétiques de la leucémie de l'enfant.

Les fragments de PCR ont été séquencé à au centre d'innovation génome Québec-Mc Gill à l'aide de séquenceurs automatiques (modèle 3730). Les séquences d'ADN ainsi obtenues furent comparées avec la séquence humaine (*homo sapiens*) de référence de NCBI afin de déterminer les polymorphismes présents et les SNPs obtenus sont comparés à ceux déjà répertoriés dans dbSNPs (build 130). La comparaison des séquences est effectuée à l'aide du logiciel Sequencer 4.8.

### ***Détermination des haplotypes fréquents***

Une fois les polymorphismes identifiés dans une région promotrice, il est possible de déterminer la structure des haplotypes, correspondant (c'est-à-dire les combinaisons de rSNPs). Pour faire cette analyse, on utilise le logiciel PHASE (version 2.1.1, University of Washington, Seattle) qui calcule les haplotypes à partir des données de fréquences génotypiques (Stephens, 2001). Pour les études

fonctionnelles, nous avons concentré nos efforts sur les haplotypes des promoteurs ayant une fréquence égale ou supérieure à 5% pour l'étude d'impact fonctionnel.

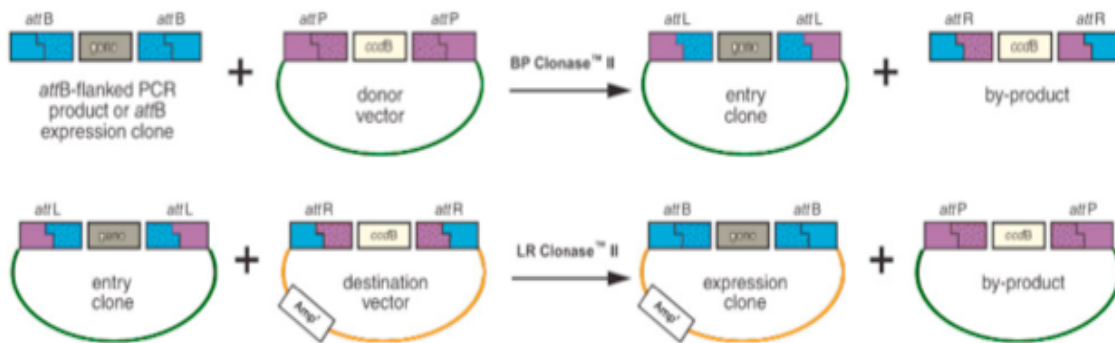
### ***Étude de l'impact fonctionnel des rSNPs / rHaplotypes***

L'impact fonctionnel des rSNPs sur l'activité promotrice est mesuré *in vitro* par des essais de gènes rapporteurs, des essais de retard sur gel et par des expériences de mutagenèse dirigée.

#### **Essai de gène rapporteur**

Les régions promotrices d'intérêts ont été amplifiées à partir de l'ADN génomique des individus possédant les haplotypes fréquents étudiés tel que décrit ci-haut. Chaque haplotype sélectionné a été sous-cloné à l'aide de la technologie Gateway (Invitrogen, 2004). Cette dernière nécessite une série de deux réactions qui utilisent le principe de la recombinaison possible entre deux séquences homologues en présence d'enzymes spécifiques. La recombinaison est possible entre les séquences spécifiques attB qui ont été préalablement ajoutés aux extrémités du fragment du 2kb lors de leur amplification et les séquences attP présentes dans le vecteur donneur pDONR (Figure 12). Grâce à l'enzyme BP Clonase™ II, cette réaction BP permet d'insérer un fragment à l'intérieur du vecteur pDONR. Ceci crée un vecteur pENTR contenant la portion du gène à étudier bornée de séquences attL. Après une incubation de 16 heures à température ambiante, l'ajout de l'enzyme LR Clonase™ II et d'un vecteur de destination permet de réaliser une réaction LR entre les séquences attL du vecteur pENTR et les séquences attR du vecteur de destination pGL3basic qui ne contient pas de promoteur interne. Le résultat final est un vecteur

contenant les différents haplotypes d'intérêt (promoteur de 2kb) en amont du gène de la luciférase *Firefly*. Puisque le vecteur pGL3basic contient initialement seulement le gène de la luciférase dépourvu de son promoteur, son expression sera régulée par le promoteur inséré.



**Figure 12 . Réactions de recombinaison BP et LR effectuée par la technologie Gateway.**

Le fragment "gene" dans cette illustration correspond à un fragment de 2kb utilisé dans le cadre cette étude. (référence : modifié à partir du protocole d'Invitrogène (2004) Gateway Technology with Clonase II).

Une réaction individuelle doit être réalisée pour chacun des haplotypes étudiés. Les différentes réactions sont ensuite utilisées pour la transformation de bactéries *E.Coli* compétentes DH5 $\alpha$  ou One Shot Mach. Une purification avec l'ensemble QIAGEN Plasmid Mini Kit est effectuée afin d'obtenir de l'ADN plasmidique ultra pure qui est nécessaire pour faire des essais *in vitro* de transfections (QIAGEN, 2005). L'intégrité de l'ADN plasmidique des clones obtenus est vérifiée par séquençage afin de confirmer l'identité des l'haplotypes désirés avant d'effectuer les expériences de transfections transitoire.

Pour faire l'essai de gène rapporteur avec la luciférase, on a utilisé le protocole de Promega fourni dans la trousse "Dual Luciferase Reporter Assay System". Les constructions des clones ont été transfecté dans trois différentes lignées cellulaires (JURKAT, JEG3 et HeLa) en utilisant la Lipofectamine™ 2000 qui est un agent transfectant qui forme des gouttelettes lipidiques autour de l'ADN facilitant ainsi la pénétration à travers la membrane phospholipidique des cellules eucaryotes (Dalby, 2004). L'utilisation de lignées cellulaires différentes permet de vérifier la présence d'une spécificité cellulaire (tissu-spécifique). Les constructions sont cotransfectées avec le vecteur pRL-CMV (Promega) contenant la luciférase *Renilla* sous le contrôle d'un promoteur SV40 (ratio 200 :1 pour les JEG3 et HeLa et 20 :1 pour les JURKAT). Cette cotransfection d'un contrôle interne permet de normaliser les expériences en fonction de l'efficacité de la transfection d'un échantillon à l'autre. Le vecteur pGL3basic (Invitrogene) est utilisé comme témoin négatif alors que le vecteur pGL3SV40 (Invitrogene) est utilisé comme témoin positif. Après 24 heures d'incubation à 37°C dans un incubateur contenant 5% de CO<sub>2</sub>, une lyse passive des cellules est effectuée et la mesure de l'activité du gène rapporteur (la luciférase) est réalisée avec la trousse DLR assay (Promega) avec un luminomètre Spectra Max 190 (Molecular Devices) selon le protocole du manufacturier. L'activité *Firefly* des constructions haplotypiques est normalisée par l'activité du contrôle interne de la *Renilla* puisqu'on exprime les résultats en ratio de la *Firefly/Renilla*.

Les résultats présentés pour chaque haplotype correspondent à la moyenne de quatre répliquas de différents clones. Pour qu'une région promotrice étudiée soit



déclarée active, son activité doit être d'environ 10 fois supérieure à l'activité du promoteur pGL3basic (Coleman, 2002). Des analyses statistiques sont effectuées à l'aide du test paramétrique Student's t-test non pairé pour déterminer le seuil de signification (valeur p) des résultats observés.

### **Expériences de Retard sur gel**

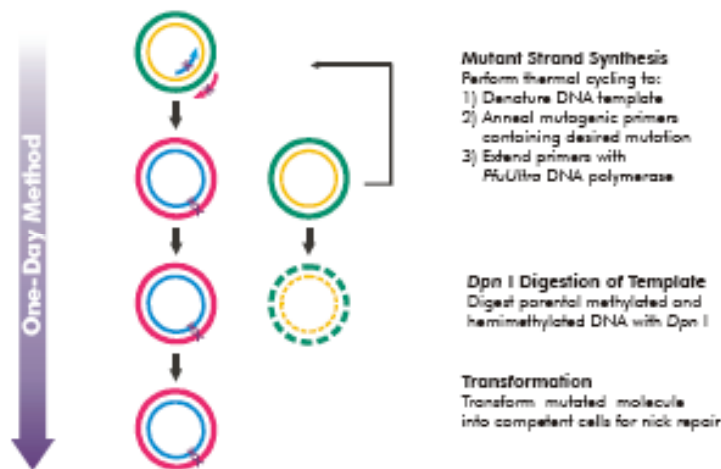
L'impact de certains SNPs sur la liaison entre l'ADN et les protéines nucléaires (activateurs ou répresseurs de la transcription) été déterminé par essais de retard sur gel pour les gènes YWHAB et YWHAQ. Les oligonucléotides double-brins marqués au  $^{32}\text{P}$  correspondent à la région entourant le site polymorphique d'intérêt (la liste des séquences des oligonucléotides testés est en annexe Tableau XI). La séquence de ces sondes est déterminée en utilisant le logiciel MatInspector (Genomatix Software GmbH) afin de prédire les différents sites de liaison de facteurs de transcription entourant chacun des SNPs testés. Un match parfait à la matrice obtient un score de 1,00 (chaque position séquence correspond au plus haut nucléotide conservé à cette position dans la matrice). Un "bon" match à la matrice a généralement une similitude de  $>0,80$  (Cartharius, 2005).

Les sondes marquées sont incubées avec des extraits nucléaires des lignées HeLa, JEG3 et JURKAT en utilisant la trousse de Gel Shift Assay System (Promega). Le dosage des protéines dans les extraits nucléaires est effectué par essai Bradford (BioRad) selon les indications du fabricant. Une réaction pour chaque SNP est fait comme suit : 5  $\mu\text{g}$  d'extrait nucléaire sont incubés séparément avec 35 nmol de sonde marquée dans un tampon 5X contenant 50mM Tris-HCL (pH 7,5), 5 mM

MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM EDTA, 2.5mM DTT, 250mM NaCl, 0.25µg/µL polydeoxyinosinate-deoxycytidylate et 20% glycérol dans un volume final de 10 µL. Ces incubations ont été effectuées à température ambiante pendant 20 minutes. Les complexes protéiques formés sont séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide non dénaturant (6% acrylamide : bisacrylamide, 60 :1) avec un tampon 1X de Tris-Glycine-EDTA à 4°C pendant 2h30 à 190V. L'utilisation du tampon TGE par rapport au tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) plus couramment utilisé permet d'obtenir des bandes plus fortes et mieux définies. Une compétition de liaison avec des sondes non marquées est effectuée dans un ratio de 50 :1 (non marquée : marquée). Une sonde non-spécifique et non marquée appelée AP2 est utilisée pour valider la spécificité de la liaison observée. Sa séquence correspond à la séquence mutée du site de liaison au facteur de transcription AP2 (Tableau XI en annexe).

### **Mutagenèse dirigée**

Une réaction *in vitro* de mutagenèse dirigée vers un site précis est une technique efficace pour caractériser l'impact d'un polymorphisme sur l'effet dynamique de la liaison des complexes protéiques à l'ADN par rapport à la régulation de l'expression génique. Des essais de mutagenèse dirigée ont été faits pour les gènes YWHAB et YWHAQ à l'aide de la trousse QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). Cette trousse permet de muter des sites spécifiques à l'intérieur d'un vecteur plasmidique double-brins à l'aide d'une procédure rapide utilisant une seule réaction en trois étapes avec une efficacité de plus de 80% (Figure 13).



**Figure 13 . Vue d'ensemble de la méthode utilisée pour la mutagenèse dirigée (référence : manuel d'utilisation fournit par Agilent Technologies)**

Pour le gène YWHAQ, des mutants ont été créés en utilisant comme gabarit les haplotypes H1 et H2 alors que pour YWHAB, les mutants ont été conçus à partir des haplotypes H1 et H8 (référence Tableau VIII et Tableau IV). La séquence des amorces utilisées (voir la liste des séquences des oligonucléotides en annexe Tableau IV) a été déterminée à l'aide du programme QuikChange Primer Design (Agilent Technologies). La confection des mutants est réalisée selon le protocole du manufacturier et la purification de l'ADN plasmidique des mutants est accomplie avec le QIAGEN mini kit. L'efficacité de la mutagenèse dirigée est vérifiée par séquençage directe pour chacun des mutants. Ces derniers sont ensuite transfectés dans les trois mêmes lignées cellulaires (HeLa, JEG3 et JURKAT) avec le même protocole et les mêmes conditions décrites auparavant.

## RÉSULTATS

Dans mon projet de maîtrise, j'ai caractérisé la diversité génétique de la région promotrice de 11 gènes de la voie intrinsèque de l'apoptose. L'étude d'une cohorte de 40 individus non-reliés, d'origine européenne, a permis d'identifier 63 SNPs dans les promoteurs proximaux que nous avons défini comme étant une région de 2kb en amont du premier exon. Tous les promoteurs étaient actifs dans au moins une des lignées cellulaires étudiées (Hela, JEG-3 et Jurkat). Parmi les gènes étudiés, les promoteurs des gènes YWHAB et YWHAQ ont montré une activité promotrice différentielle entre les différents haplotypes communs. Nous avons observé des liaisons ADN-protéines différentielles pour 2 SNPs à l'intérieur du promoteur du gène YWHAB. Le Tableau II résume l'étude de l'ensemble des promoteurs. Les gènes YWHAB et YWHAQ seront par la suite décrits en détails. On retrouve en annexe toutes informations relatives sur les SNPs, les haplotypes et les essais luciférase des autres 9 gènes n'ayant pas montré d'activité promotrice différentielle au cours de notre étude.

La densité des polymorphismes correspondante est de 2,9 SNPs/kb en moyenne, ce qui est un peu faible si l'on compare avec la littérature (environ 4.5 SNPs/kb) (Labuda, 2007). Il est possible que la région promotrice des gènes étudiés soient davantage conservées dans l'évolution étant donné leur rôle essentiel dans une voie biologique hautement régulée. Par exemple, deux gènes MAPK1 et YWHAQ n'ont que 3 et 2 SNPs respectivement au total dans leur promoteur de 2 kb.

Parmi les 63 SNPs identifiés, il y a 38 transitions, 18 transversions et 7 insertion/délétions. Les transitions sont les changements entre le même groupe soit entre les purines (A↔G) ou entre les pyrimidines (T↔C). D'autre part, les transversion sont lors d'un changement entre une purine et une pyrimidine (A↔T), (A↔C), (G↔T) ou (G↔C) (Jobling, 2004). Lors de cette étude, 23,8% des SNPs identifiés n'étaient pas présents dans la base de données de dbSNP.

**Tableau II . Résumé des résultats obtenus pour les promoteurs des 11 gènes étudiés de la voie intrinsèque de l'apoptose.**

<b>Gènes **</b>	<b>Nb. de SNPs</b>	<b>Numéro RS (ou position sur chromosome)</b>	<b>Nb. d'haplotypes (fréquents ≥5%)</b>	<b>Activité promotrice</b>	<b>Expression différentielle (AI)</b>
BAG1	5	-Rs706123 -Rs706122 -Rs11791605 -Rs16919130 Chr9 :33,265,215	3	Oui	Non
BAG3	6	-Rs61869035 -Rs2420641 -Rs35117013 -Rs34330597 -Rs35097693 -Rs11199059	3	Oui	Non
CARD9	11	-Rs3088081 -Rs3812560 Chr9 :139,269,544 -Rs3829111 -Rs10781500 Chr9 :139,269,292 -Rs3829110 -Rs3812558 Chr9 :139,268,495 Chr9 :139,268,453 Chr9 :139,268,267	3	Oui	Non
CD47	5	Chr3 :107,811,685 -Rs326341 -Rs7612356 Chr3 :107,810,278 -Rs62264065	3	Oui	Non

CYCS	5	-Rs2107123 Chr7 :25,165,837 Chr7 :25,165,802 -Rs3846998 -Rs5882962	3	Oui	Non
NOD1	8	-Rs5743322 Chr7 :30,519,364 Chr7 :30,519,030 -Rs2075816 -Rs2066973 -Rs7790806 -Rs2108356 -Rs2108355	3	Non	Non
MAP4K3	3	Chr2 :39,665,589 -Rs56128332 Chr2 :39,664,535	2	Oui	Non
MAPK1	4	-Rs9607343 Chr22 :22,223,009 -Rs9607340 -Rs9610505	2	Oui	Non
MAPK8	8	-Rs11101312 -Rs17697972 -Rs10857561 -Rs17697978 -Rs11332662 -Rs17698002 -Rs28395807 -Rs3730154	4	Non	Non
YWHAB	7	-Rs3092669 -Rs3091409 -Rs3092248 -Rs6031847 -Rs6031848 -Rs6031849 -Rs35664412	3	Oui	Oui
YWHAQ	2	-Rs10203320 -Rs2091210	3	Oui	Oui

\* : plusieurs gènes n'ont pas d'essais de retardement sur gel à cause de l'absence d'activité promotrice différentielle.

\*\* : Les gènes en gris sont ceux ayant un impact fonctionnel.

### ***YWHAB (14-3-3- $\beta$ )***

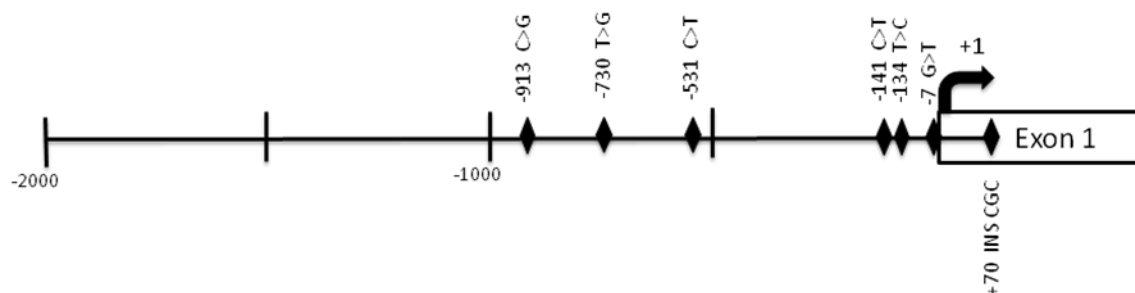
YWHAB, l'isoforme bêta ( $\beta$ ) de la famille 14-3-3, est un gène anti-apoptotique qui code pour une protéine qui lie différentes protéines incluant des phosphatases, des kinases et des récepteurs membranaires. YWHAB est impliquée dans la régulation de la progression du cycle cellulaire et dans la tumorigenèse. Ce gène est connu pour favoriser l'activation de la voie MAPK (mitogene-activated protein kinase), mais son mécanisme menant à la carcinogenèse n'est pas clairement compris (Graf, 2010). Le reséquençage de la région promotrice d'YWHAB chez 40 individus a permis d'identifier sept rSNPs : -913C>G, -730T>G, -531C>T, -141C>T, -134T>C, -7G>T, +70in(CGC) (Tableau III). Le schéma du promoteur d'YWHAB est illustré à la Figure 14. Tous les SNPs trouvés dans ce promoteur étaient répertoriés dans dbSNP.

**Tableau III . SNPs du promoteur d'YWHAB avec leur position génomique.**

SNP*	Position chromosomique **	Numéro RS
-913 C>G	chr20:42946845-42946845	rs3092669
-730 T>G	chr20:42947028-42947028	rs3091409
-531 C>T	chr20:42947227-42947227	rs3092248
-141 C >T	chr20:42947617-42947617	rs6031847
-134 T>C	chr20:42947624-42947624	rs6031848
-7 G>T	chr20:42947751-42947751	rs6031849
+70 ins (CGC)	chr20:42947828-42947827	rs35664412

\*Position calculée en considérant le début de la transcription comme étant +1

\*\* USCS, dbSNP build 130



**Figure 14 . Schéma du promoteur proximal d'YWHAB avec ses rSNPs.**

Les sept SNPs du promoteur d'YWHAB se retrouvent sous la forme de trois haplotypes fréquents (Tableau IV). Ces trois haplotypes forment 85% de la totalité des haplotypes observés. On remarque que l'haplotype H11 est plus fréquent dans le groupe LLA que dans le groupe contrôle alors que pour les deux autres haplotypes ont une fréquence similaire dans les deux groupes.

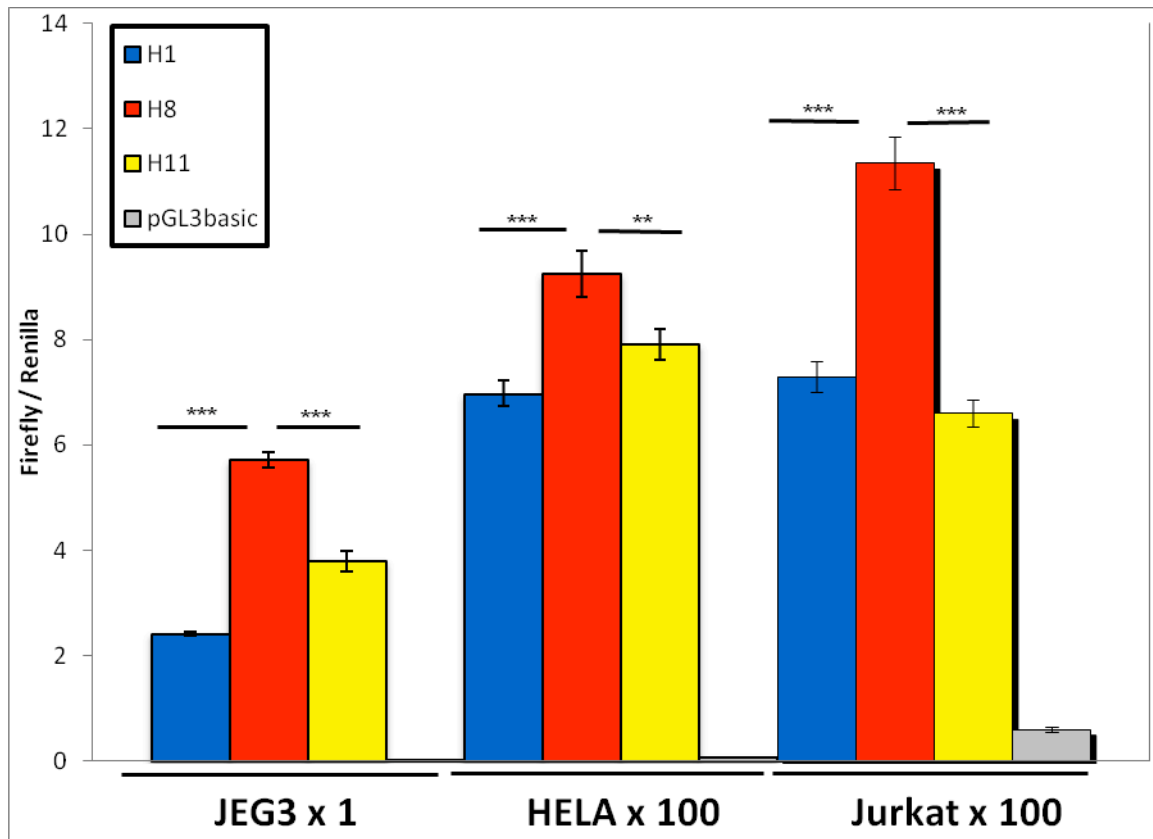
**Tableau IV . Haplotypes fréquents de la région promotrice d'YWHAB et leur fréquence observée dans notre cohorte de contrôles et de patients.**

H	-913 C>G	-730 T>G	-531 C>T	-141 C>T	-134 T>C	-7 G>T	+70 ins (CGC)	Fréquence %		
								Cohorte	Contrôle	Patients LLA
1	G	G	C	C	T	G	-	22,5 %	22,5 %	22,5 %
8	C	T	C	C	T	G	-	41,0%	45,0 %	37,5 %
11	C	T	C	T	C	T	CGC	21,3%	12,5 %	30,0 %



L'activité promotrice de ces trois haplotypes a été testée par des essais de gène rapporteur pour vérifier leur impact sur l'activité promotrice (Figure 15). On constate que le promoteur sous-cloné est actif puisque ses valeurs de luciférase sont de 15 à 1000 fois plus élevées que le contrôle négatif (pGL3b). Une activité différentielle est observée ( $p < 0,005$  et/ou  $p < 0,0005$  dans les trois lignées cellulaires) où l'haplotype H8 montre une activité promotrice plus forte que les deux autres : l'haplotype H1 a l'activité promotrice la plus faible (de 1.6 à 2.3 fois plus faible que l'haplotype H8) et l'haplotype H11 a l'activité promotrice intermédiaire (de 1.5 à 1.7 fois seulement plus faible que l'haplotype H8). Un profil d'expression similaire a été observé dans toutes les lignées cellulaires à l'exception de l'haplotype H11 qui a eu une activité plus faible que l'haplotype H1 dans la lignée JURKAT.

Ces résultats indiquent la présence d'une activité promotrice différentielle *in vitro* selon l'haplotype du promoteur d'YWHAB présent.



**Figure 15 . Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur d'YWHAB**

La transfection cellulaire est faite dans 3 lignées cellulaires différentes (JEG-3, HeLa et Jurkat). Les résultats illustrés sont tirés d'une expérience représentative parmi 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en ratio de l'activité de la Firefly / Renilla multiplié par 1 ou 100 selon indication. Les valeurs p sont calculés à partir de 4 réplicas avec le test Student non-pairé (\* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ )

Des essais de retard sur gel ont été effectués pour vérifier la présence de liaisons différentielles au niveau des SNPs de cette région promotrice. Les gels des SNPs -730T>G et -141C>T avec l'extrait nucléaire JURKAT et HeLa respectivement sont montrés dans les Figure 16 et Figure 17.

Tout d'abord avec le SNP -730T>G (Figure 16), on peut observer la présence d'une liaison différentielle au niveau des complexes 1 et 2, chaque complexe lie uniquement -730G (puits 2 vs puits 6). La compétition dans les puits 7 et 8 confirme que le complexe se lie davantage à la sonde G, car la bande ne disparaît qu'en présence du compétiteur -730G non marqué. La liaison est spécifique puisque la compétition avec la sonde AP2 ne fait pas disparaître les bandes (puits 9).

Le SNP 141C>T (Figure 17), montre la présence de plusieurs liaisons différentielles au niveau des complexe 3 à 7, chaque complexe étant formé uniquement en présence de l'allèle -141T (puits 2 vs puits 6). Les expériences de compétition (puits 7 et 8) confirme que le complexe se lie davantage à la sonde T, car le profil de bandes est modifié seulement en présence du compétiteur -141T non marqué. La liaison est spécifique puisque la compétition avec la sonde AP2 ne fait pas changer le profil des bandes (puits 9).

Pour les trois lignées cellulaires, les SNPs -730T>G et -141C>T ont montré une liaison différentielle alors que les quatre autres SNP testés (-913C>G, -531C>T, -134T>C, -7G>T) ne montrent pas de différence. Ceci suggère que les rSNPs -730T>G et -141C>T seraient impliqués dans l'activité promotrice différentielle observée. Nous avons fait des analyses *in silico* pour prédire l'impact de ces 2 rSNPs sur les sites (gain ou perte) de liaison à des facteurs de transcriptions. Pour le SNP -730 T>G, nous observons une liaison différentielle pour trois facteurs de transcriptions : un site de liaison "RXR heterodimer" ainsi que 2 sites pour la protéine "p53 tumor suppressor"(Tableau V). Pour le SNP -

141C>T, nous contemplons une liaison différentielle pour deux facteurs de transcriptions : un site de liaison pour une protéine “zinc finger” et un pour la protéine “PAX-5 B-cell-specific activator” (Tableau VI).

**Tableau V : Liste des facteurs de transcription prédits lors des analyses in silico pour le SNP -730 T/G du gène YWHAB par le logiciel MatInspector.**

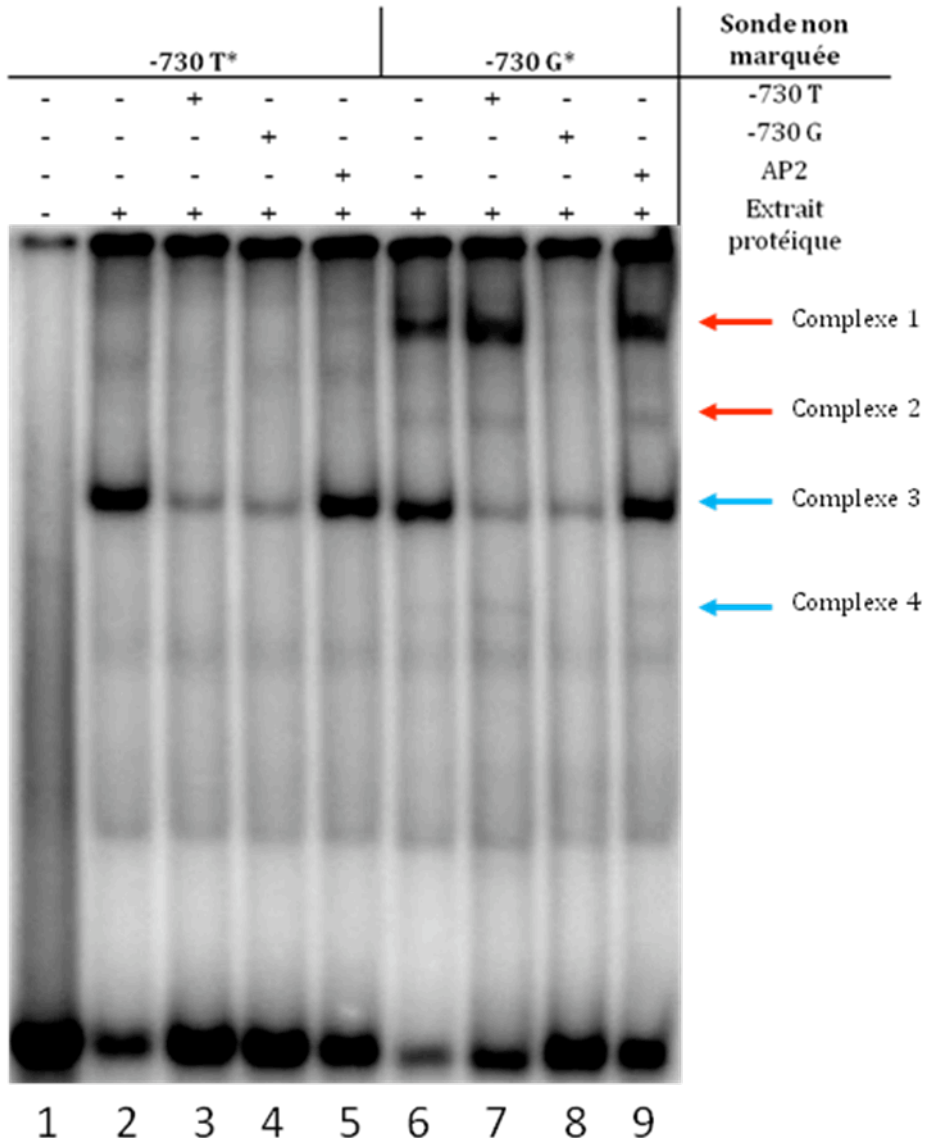
<b>Facteurs de transcriptions prédits</b>	<b>Matrix score</b>	<b>Allèle -730 T</b>	<b>Allèle -730 G</b>
Ikaros zinc finger family	0.983	✓	✓
Octamer binding protein	0.877	✓	✓
RXR heterodimer binding sites	0.609	✓	
Nuclear receptor subfamily 2 factors	0.830	✓	✓
p53 tumor suppressor	0.920		✓
p53 tumor suppressor	0.975		✓

\* : Les facteurs de transcriptions en gris sont ceux possédant une liaison allélique différentielle.

**Tableau VI : Liste des facteurs de transcription prédits lors des analyses in silico pour le SNP -141 C/T du gène YWHAB par le logiciel MatInspector.**

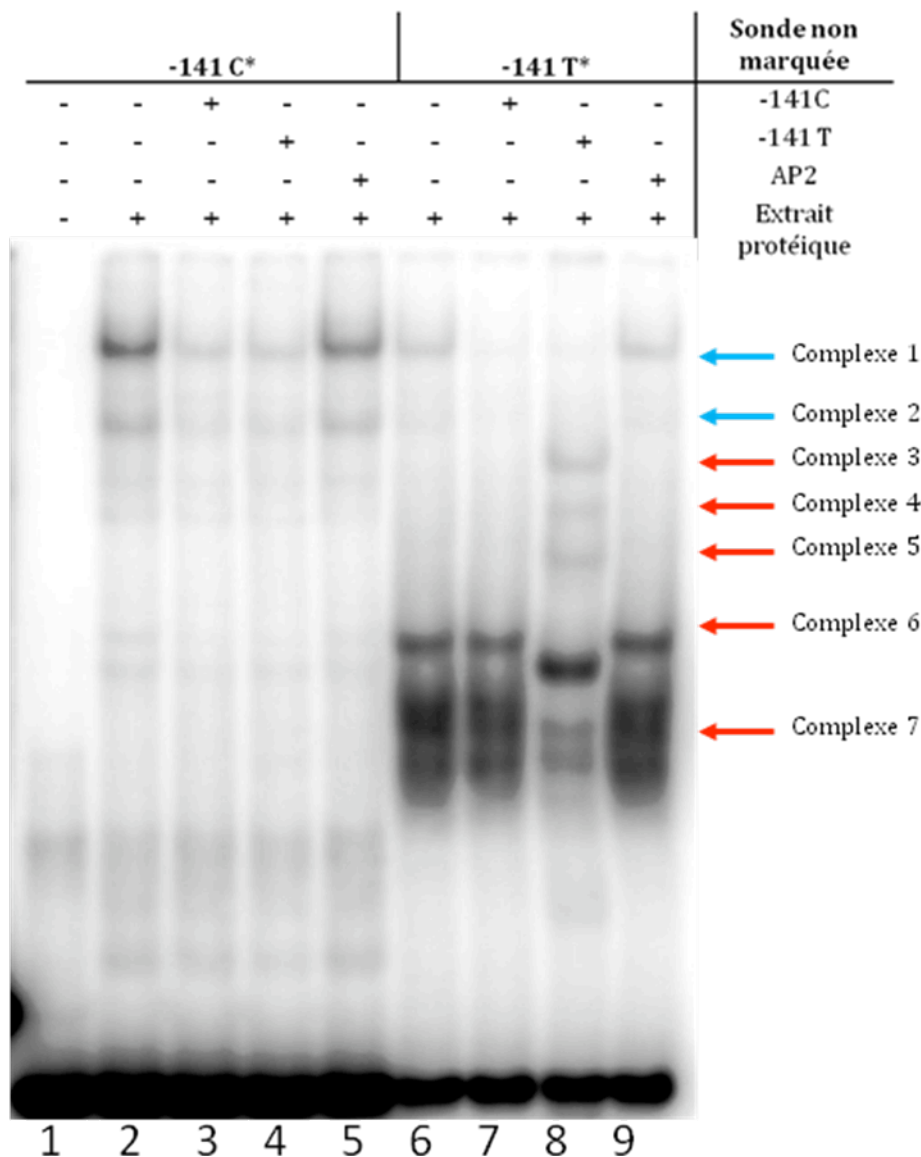
<b>Facteurs de transcriptions prédits</b>	<b>Matrix score</b>	<b>Allèle -141 C</b>	<b>Allèle -141 T</b>
Huntington's disease gene regulatory region binding proteins	0.857	✓	✓
Zinc finger proteins	0.847	✓	
GC-box factors SP1/GC	0.914	✓	✓
Krueppel like transcription factors	0.941	✓	✓
PAX-5 B-cell-specific activator protein	0.807	✓	
Insulinoma associated factors	0,919	✓	✓

\* : Les facteurs de transcriptions en gris sont ceux possédant une liaison allélique différentielle.



**Figure 16 . Expérience de retard sur gel montrant une liaison différentielle au niveau du rSNP -730 T>G d'YWHAB.**

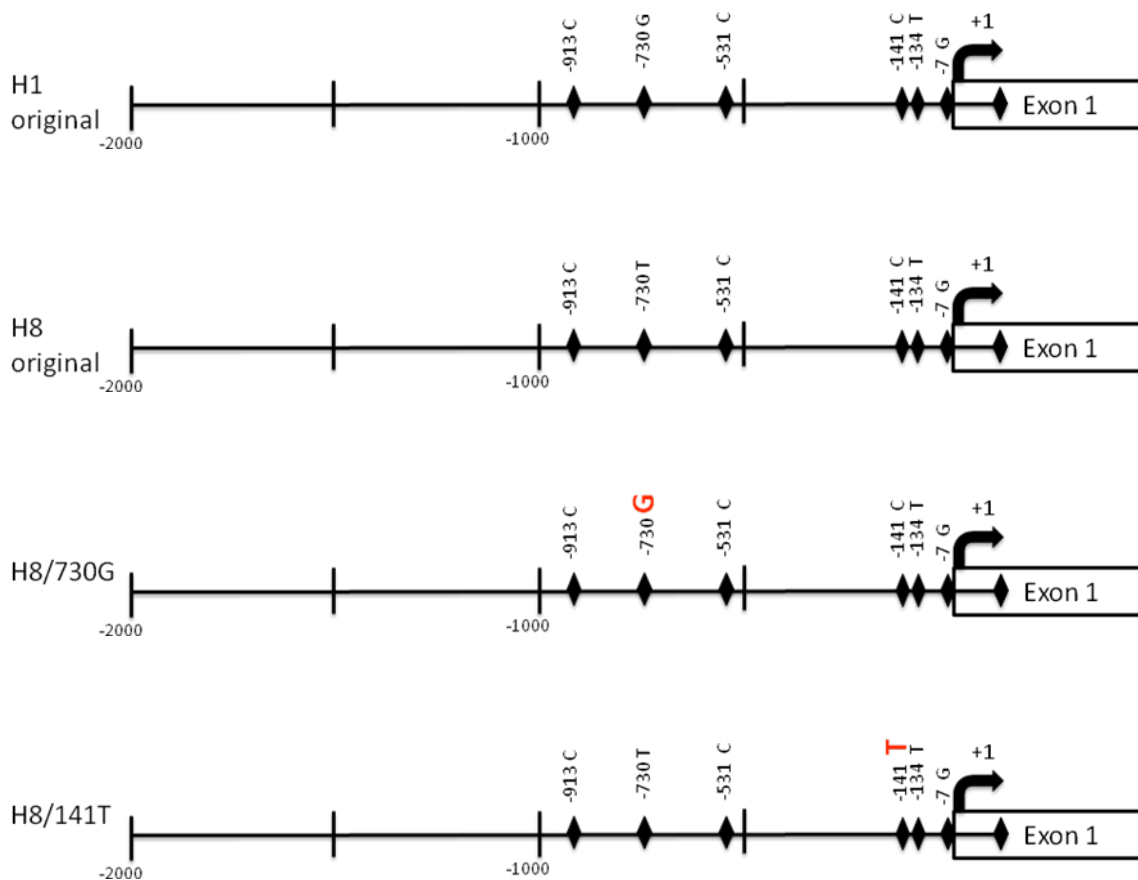
Des oligonucléotides double brins et marqués (\*) correspondant aux différents allèles du SNP -730 T>G sont incubées avec l'extrait nucléaire de cellules JURKAT. Les puits 1 à 5 représentent la sonde marqué -730T alors que les puits 6 à 9 représentent la sonde -730G. Les sondes non-marquées utilisées pour compétitionner la liaison de protéines à l'ADN sont en excès dans un ratio de 50/1. Des compétiteurs spécifiques correspondant aux sondes non-marquées des différents allèles sont utilisés dans les puits 3, 4, 7, 8 alors qu'un compétiteur non spécifique est utilisé dans les puits 5 et 9. Les séquences des sondes utilisées sont décrites dans le Tableau XI en annexe. Les sondes non liées migrent rapidement au bas du gel alors que les complexes protéines-sondes migrent moins rapidement. Les complexes spécifiques sont identifiés par une flèche rouge tandis que les complexes non-spécifiques sont identifiés par une flèche bleue.



**Figure 17 . Expérience de retard sur gel montrant une liaison différentielle au niveau du rSNP -141 C>T d'YWHAB.**

Des oligonucléotides double brins et marqués (\*) correspondant aux différents allèles du SNP -141 C>T sont incubées avec l'extrait nucléaire de cellules HeLa. Les puits 1 à 5 représentent la sonde marqué -141C alors que les puits 6 à 9 représentent la sonde -141T. Les sondes non-marquées utilisées pour compétitionner la liaison de protéines à l'ADN sont en excès dans un ratio de 50/1. Des compétiteurs spécifiques correspondant aux sondes non-marquées des différents allèles sont utilisés dans les puits 3, 4, 7, 8 alors qu'un compétiteur non spécifique est utilisé dans les puits 5 et 9. Les séquences des sondes utilisées sont décrites dans le Tableau XI en annexe. Les sondes non liées migrent rapidement au bas du gel alors que les complexes protéines-sondes migrent moins rapidement. Les complexes spécifiques sont identifiés par une flèche rouge tandis que les complexes non-spécifiques sont identifiés par une flèche bleue.

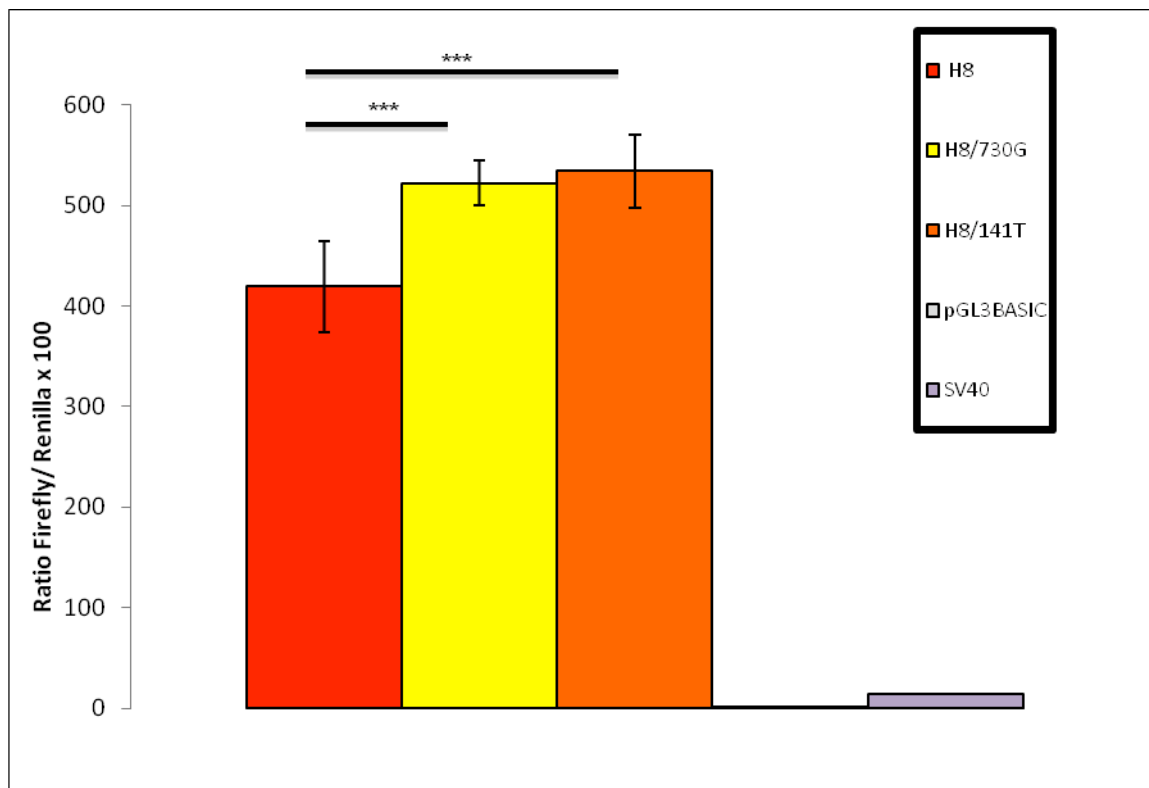
Pour étudier l'effet des deux SNPs -730T>G et -141C>T sur l'activité promotrice d'YWHAB, nous avons réalisé des essais de mutagenèse dirigée. Pour ce faire, les constructions plasmidiques des haplotypes H1 et H8 ont été utilisées comme gabarits pour les différentes réactions de mutagenèse (Figure 18). Une réaction a permis de transformer l'haplotype H8 en haplotype H1 en changeant le nucléotide T en G à la position -730 (mutant H8/730G). Le résultat attendu est une diminution de l'activité promotrice de ce mutant. Une seconde réaction a permis de muter l'haplotype H8 en changeant le nucléotide C en T à la position -141 (mutant H8/141T).



**Figure 18 : Schéma des constructions utilisées lors des expériences de mutagenèse dirigée pour le gène YWHAB.**

L'activité promotrice des constructions mutées a été testée par des essais de gène rapporteur pour vérifier l'impact des mutations sur l'activité promotrice d'YWHAB. Le résultat de la transfection cellulaire dans la lignée JEG3 est montré à la Figure 19. On constate que le promoteur muté est toujours fonctionnel avec des valeurs de luciférase sont de 33 à 330 fois plus élevées que le contrôle négatif (pGL3b). Une activité différentielle est observée ( $p < 0.001$  dans les trois lignées) où l'haplotype H8 montre une activité promotrice plus faible que les deux autres haplotypes mutés : le H8/730G montre une activité de 1,1 à 2,0 fois supérieure à l'haplotype H8 original et le H8/141T montre aussi une activité de 1,2 à 2,0 fois supérieure à l'haplotype H8. Le même profil d'expression a été observé dans toutes les lignées cellulaires testées.

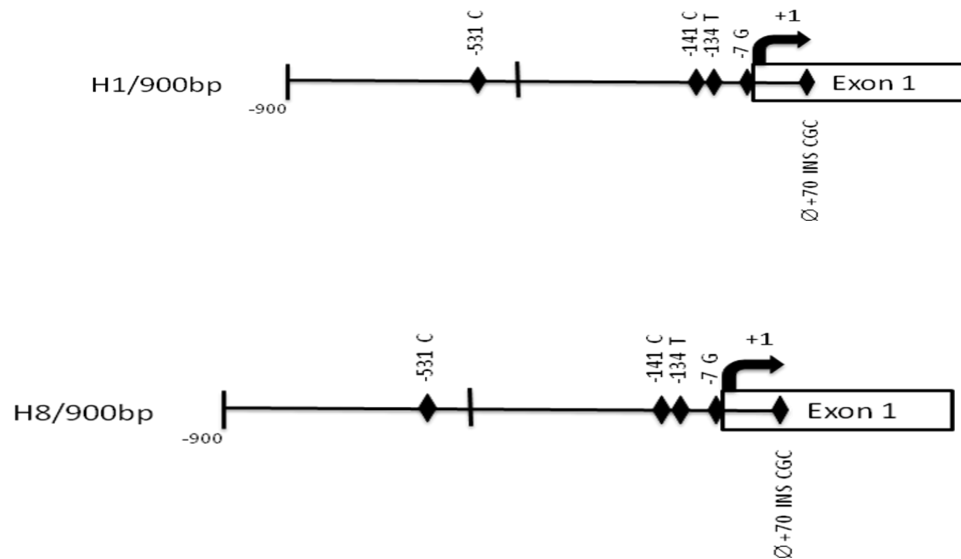




**Figure 19 . Impact fonctionnel de la mutagenèse dirigée à partir de l'haplotype H8 du promoteur d'YWHAB.**

La transfection cellulaire illustrée est faite dans la lignée cellulaire JEG-3. Les résultats illustrés sont tirés d'une expérience représentative parmi 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en ratio de l'activité de la Firefly / Renilla multiplié par 100. Les valeurs p sont calculés à partir de 4 réplicas avec le test Student non-pairé (\* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ )

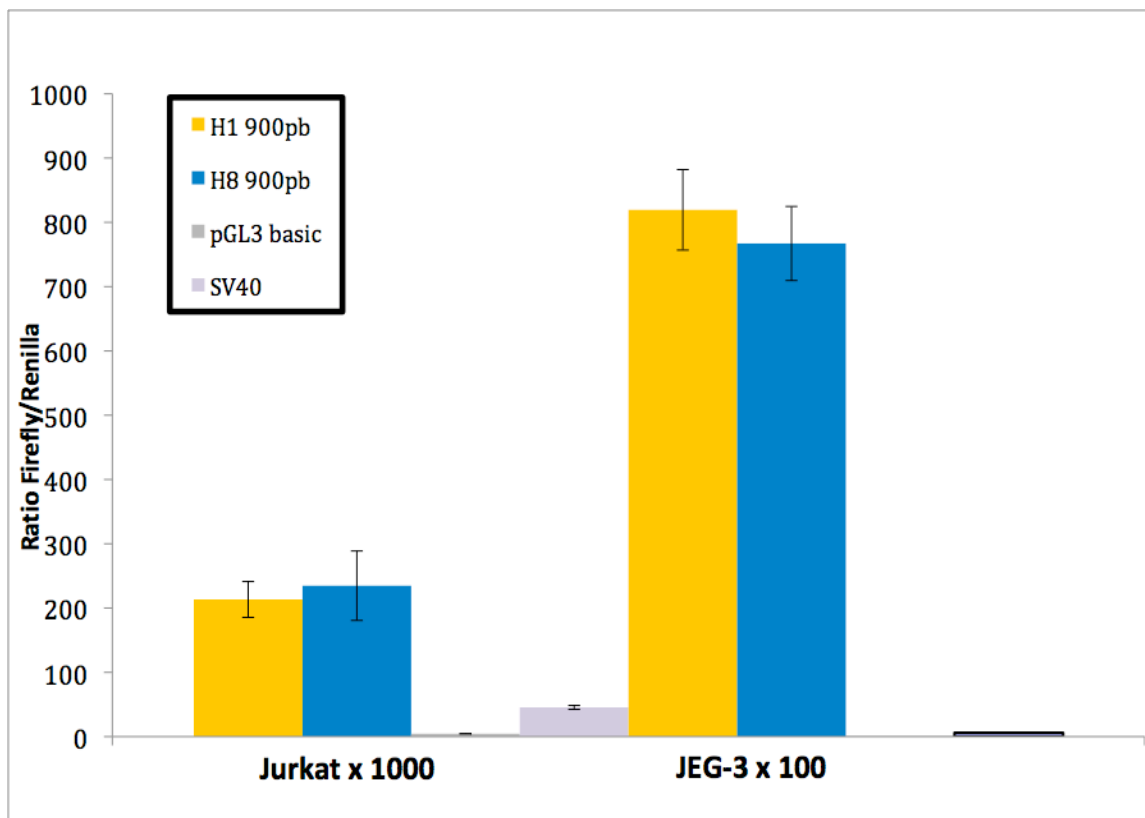
Puisque les essais de mutagenèse dirigée n'ont pas permis de valider l'effet des rSNPs -730T>G et -141C>T sur l'activité promotrice différentielle, de nouvelles constructions raccourcis du promoteur ont été confectionnées. L'haplotype H8 est celui avec la plus forte activité promotrice. Comme il diffère seulement à 2 positions (-930C>G et -730 T>G) avec l'haplotype H1, nous avons choisi d'exclure ceux-ci des nouvelles constructions. Ces constructions contenaient seulement les 900 paires de bases et excluaient les deux SNPs -930C>G et -730 T>G. Le résultat attendu est que l'activité des nouvelles constructions sera équivalente. Le schéma des promoteurs raccourcis d'YWHAB est illustré à la Figure 20.



**Figure 20 . Schéma des haplotypes du promoteur raccourci d'YWHAB.**

L'activité promotrice des haplotypes raccourcis H1/900bp et H8/900bp a été testée par des essais de gène rapporteur pour voir leur impact sur l'activité promotrice d'YWHAB (Figure 21). On constate que les promoteurs raccourcis sous-cloné sont actifs puisque ses valeurs de luciférase sont de 50 à 1000 fois plus élevées que le contrôle négatif (pGL3b). Aucune activité différentielle n'est observée entre les deux haplotypes H1/900bp et H8/900bp dans les lignées cellulaires testées. Le même profil d'expression a été observé dans les deux lignées cellulaires.

Cette perte d'activité différentielle entre ses deux haplotypes permet de confirmer l'importance d'un ou des SNPs -913C>G et -730T>G dans l'activité promotrice différentielle observée auparavant avec les haplotypes H1 et H8 de 2kb.



**Figure 21 . Impact fonctionnel des promoteurs raccourcis d'YWHAB.**

La transfection cellulaire illustrée est faite dans 2 lignées cellulaires différentes (JURKAT et JEG-3). Les résultats illustrés sont tirés d'une expérience représentative parmi 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en ratio de l'activité de la Firefly / Renilla multiplié par 100 ou 1000 selon indication. Les valeurs p sont calculés à partir de 4 répliques avec le test Student non-pairé (\* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ).

### **YWHAQ (14-3-3- $\tau$ / $\theta$ )**

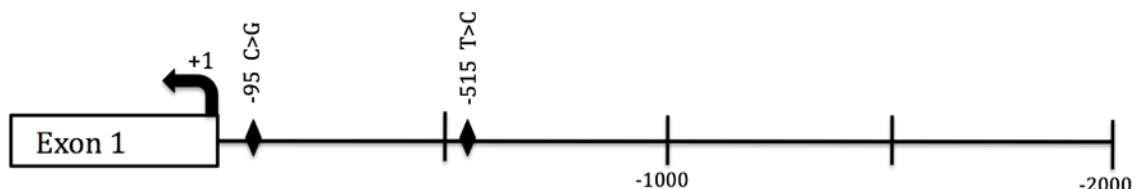
YWHAQ, l'isoforme thêta ( $\theta$ ) aussi nommé tau  $\theta$  de la famille 14-3-3, est un gène codant pour une protéine adaptatrice impliquée dans la régulation de plusieurs voies de signalisation autant générales que spécialisées (Aitken, 2006). Cette liaison se traduit généralement par la modulation de l'activité du partenaire de liaison (Wang, 2004). Sous sa forme d'homodimère, YWHAQ peut interagir avec plusieurs protéines et ainsi moduler leur activité. Le reséquençage de la région promotrice d'YWHAQ chez 40 individus a permis d'identifier deux rSNPs : -515T>C et -95C>G (Tableau VII). Le schéma du promoteur d'YWHAQ est illustré à la Figure 22. Tous les SNPs trouvés dans ce promoteur étaient répertoriés dans dbSNP.

**Tableau VII . SNPs du promoteur d'YWHAQ avec leur position génomique et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte.**

SNP*	Position chromosomique**	Numéro RS
-515 T>C	chr2:9689071-9689071	rs10203320
-95 C>G	chr2:9688651-9688651	rs2091210

\*Position calculée en considérant le début de la transcription comme étant +1

\*\* USCS, dbSNP build 130



**Figure 22 . Schéma du promoteur d'YWHAQ avec ses SNPs.**

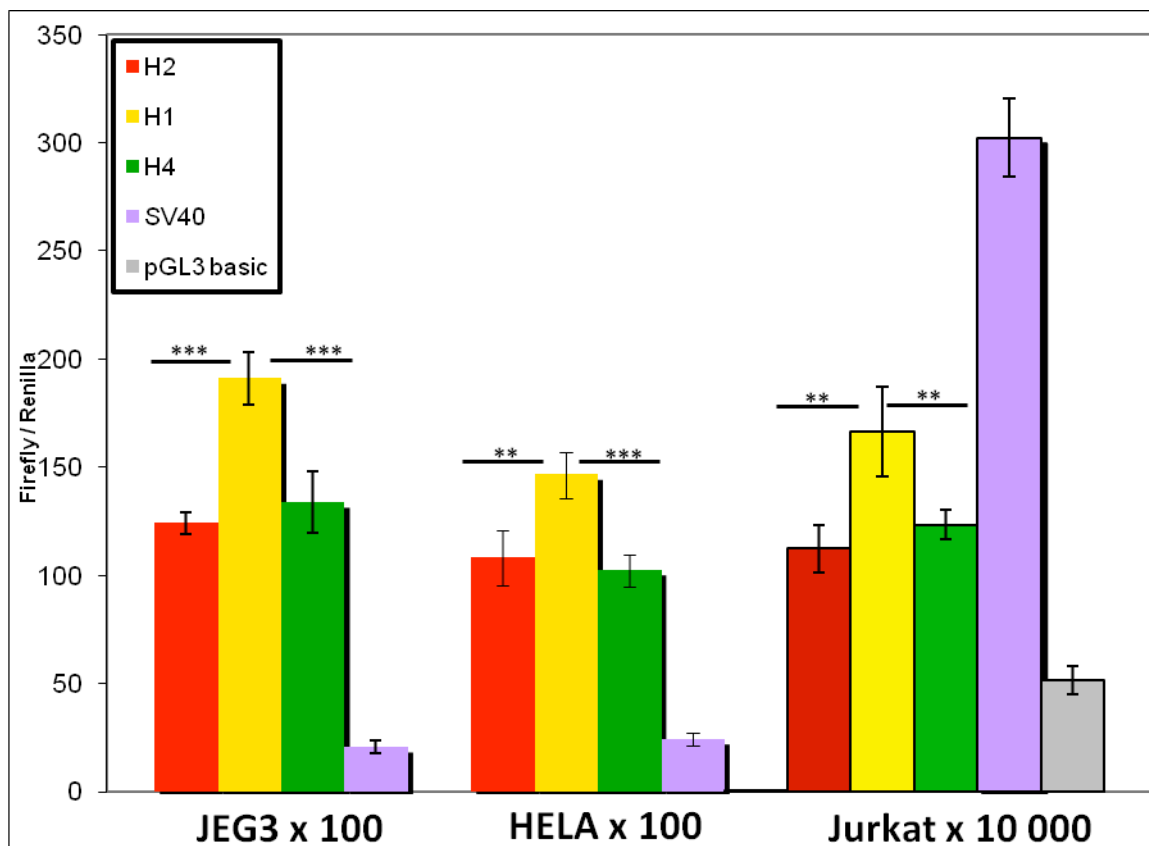
Les deux SNPs du promoteur d'YWHAQ se retrouvent sous la forme de trois haplotypes fréquents (Tableau VIII). Ces trois haplotypes forment 95% de la totalité des haplotypes observés. On observe une fréquence similaire entre les différents haplotypes pour les deux groupes : Contrôles vs Patients LLA.

**Tableau VIII . Haplotypes fréquents de la région promotrice d'YWHAQ et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte.**

Haplotype	-515 T>C	-95 C>G	Fréquence %		
			Cohorte	Contrôles	Patients LLA
1	T	C	62,0 %	58.8 %	65.4 %
2	T	G	10,0 %	11.8 %	7.7 %
4	C	G	23,0 %	20.6 %	26.9 %

L'activité promotrice de ces trois haplotypes a été testée par des essais de gène rapporteur pour voir leur impact sur l'activité promotrice d'YWHAQ (Figure 23). On constate que le promoteur sous-cloné est actif puisque ses valeurs de luciférase sont de 3 à 150 fois plus élevées que le contrôle négatif (pGL3b). Une activité promotrice différentielle est observée ( $p < 0,005$  et/ou  $p < 0,0005$  dans les trois lignées cellulaires) où l'haplotype H1 montre une activité promotrice plus forte que les deux autres qui ont sensiblement la même activité promotrice : l'haplotype H2 a une activité promotrice de 1.4 à 1.5 fois plus faible que l'haplotype H1 et l'haplotype 4 a l'activité promotrice de 1.3 à 1.4 fois plus faible que l'haplotype H1. Le même profil a été observé dans toutes les lignées cellulaires.

Ces résultats indiquent la présence d'une activité promotrice différentielle *in vitro* selon l'haplotype du promoteur d'YWHAQ présent. Il semble que le SNP -95C>G soit responsable de cette activité promotrice différentielle observée. En effet, ce rSNP représente la seule différence génotypique partagée entre les haplotypes H2 et H4, mais divergeant de l'haplotype H1.



**Figure 23 . Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur d'YWHAQ.**

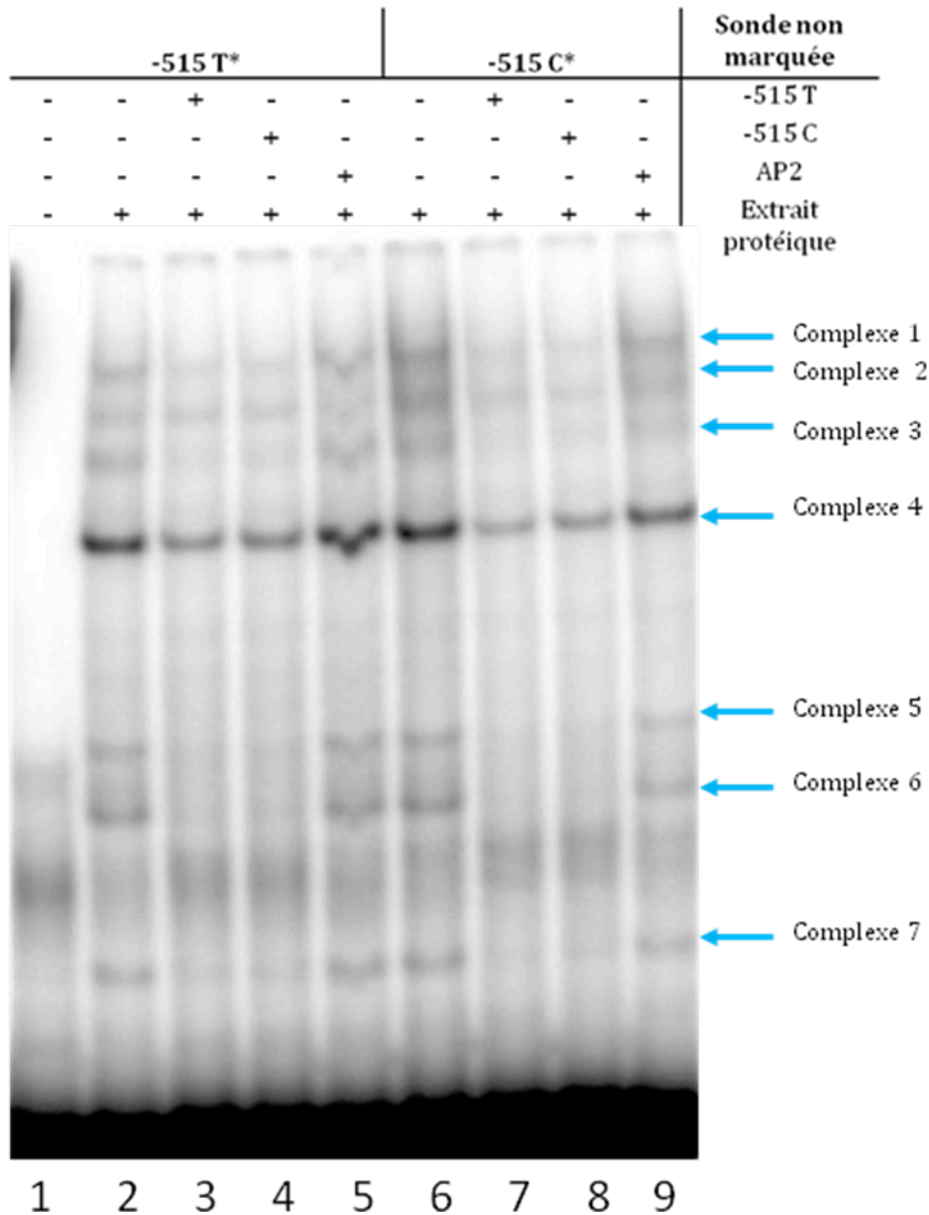
La transfection cellulaire est faite dans 3 lignées cellulaires différentes (JEG-3, HeLa et Jurkat). Les résultats illustrés sont tirés d'une expérience représentative parmi 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en ratio de l'activité de la *Firefly / Renilla* multiplié par 100 ou 10 000 selon indication. Les valeurs p sont calculés à partir de 4 répliques avec le test Student non paire (\* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ).

Des essais de retard sur gel ont été effectués pour vérifier la présence de liaisons différentielles au niveau des SNPs de cette région promotrice. Les gels des SNPs -515T>C et -95C>G avec l'extrait nucléaire JEG3 et HeLa respectivement sont montrés à titre d'exemple (Figure 24 et Figure 25).

Tout d'abord avec le SNP -515T>C (Figure 24), on observe la présence de sept différents complexes protéiques (complexe 1 à 7) qui lient de façon non différentielle autant -515T que -515C (puits 2 vs puits 6). La compétition dans les puits 3 et 4 ou dans les puits 7 et 8 confirme que les complexes se lie autant à la sonde T qu'à la sonde C, car la bande ne disparaît pas en présence des compétiteurs -515T ou -515C non marqués. La liaison est spécifique puisque la compétition avec la sonde AP2 ne fait pas disparaître les bandes (puits 9).

Ensuite, avec le SNP -95C>G (Figure 25), on peut y voir la présence de cinq différents complexes protéiques (complexe 1 à 5) qui lient de façon non différentielle autant -95C que -95G (puits 2 vs puits 6). La compétition dans les puits 3 et 4 ou dans les puits 7 et 8 confirme que les complexes se lie autant à la sonde C qu'à la sonde G, car la bande ne disparaît pas indifféremment du compétiteur -95C ou -95G non marqué. La liaison semble spécifique puisque la compétition avec la sonde AP2 ne fait pas disparaître les bandes (puits 9).

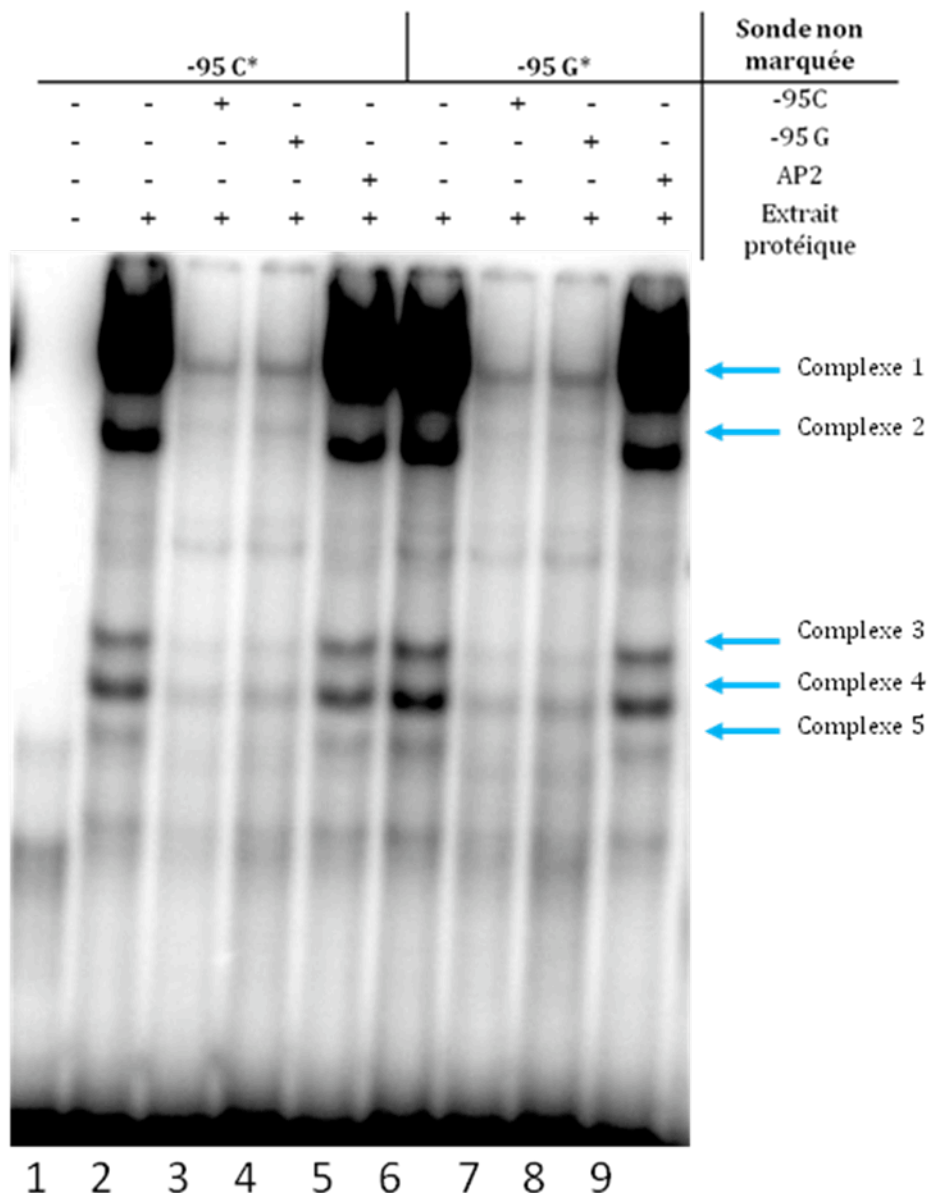
Toutes les trois lignées cellulaires pour les polymorphismes -515T>C et -95C>G ont montré aucune liaison différentielle. Il semble les conditions utilisées pour ces essais de retard sur gel ne puissent pas démontrer quels SNPs qui seraient responsable de l'activité promotrice différentielle observée.



**Figure 24 . Expérience de retard sur gel montrant une liaison non-différentielle au niveau du rSNP -515 T>C d'YWHAQ.**

Des oligonucléotides double brins et marqués (\*) correspondant aux différents allèles du SNP -515T>C sont incubées avec l'extrait nucléaire de cellules JEG3. Les puits 1 à 5 représentent la sonde marquée -515T alors que les puits 6 à 9 représentent la sonde -515C. Les sondes non-marquées utilisées pour compétitionner la liaison de protéines à l'ADN sont en excès dans un ratio de 50/1. Des compétiteurs spécifiques correspondant aux sondes non-marquées des différents allèles sont utilisés dans les puits 3, 4, 7, 8 alors qu'un compétiteur non spécifique est utilisé dans les puits 5 et 9. Les séquences des sondes utilisées sont décrites dans le Tableau XI en annexe. Les sondes non liées migrent rapidement au bas du gel alors que les complexes protéines-sondes migrent moins rapidement. Les complexes non-spécifiques sont identifiés par une flèche bleue.

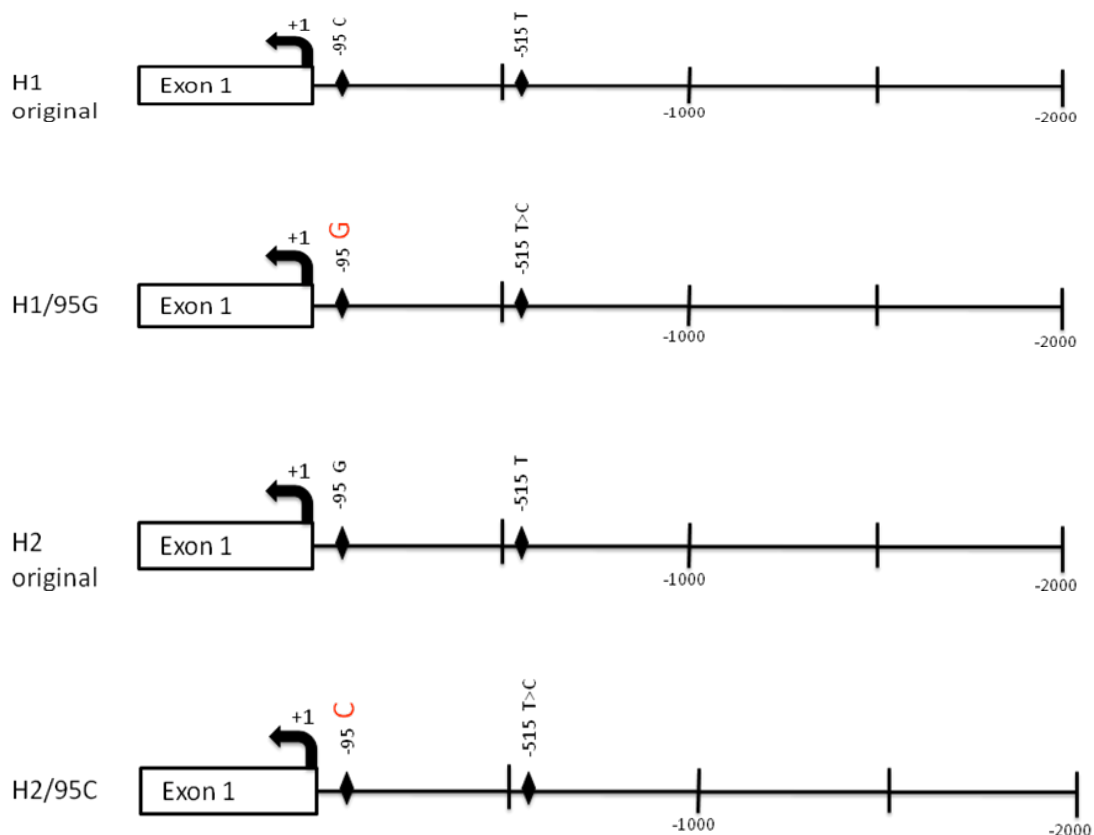




**Figure 25 . Expérience de retard sur gel montrant une liaison non-différentielle au niveau du rSNP -95 C>G d'YWHAQ.**

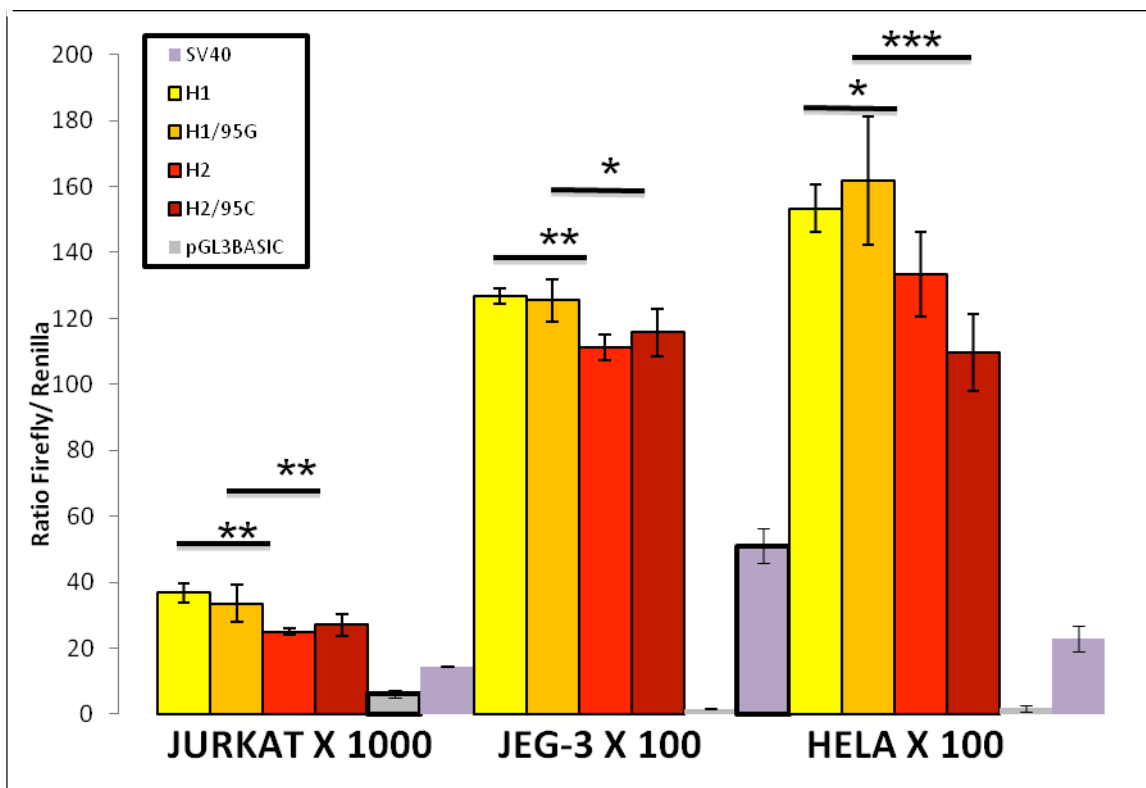
Des oligonucléotides double brins et marqués (\*) correspondant aux différents allèles du SNP -95C>G sont incubées avec l'extrait nucléaire de cellules HeLa. Les puits 1 à 4 représentent la sonde marqué -95C alors que les puits 5 à 8 représentent la sonde -95G. Les sondes non-marquées utilisées pour compétitionner la liaison de protéines à l'ADN sont en excès dans un ratio de 50/1. Des compétiteurs spécifiques correspondant aux sondes non-marquées des différents allèles sont utilisés dans les puits 3, 4, 7, 8 alors qu'un compétiteur non spécifique est utilisé dans les puits 5 et 9. Les séquences des sondes utilisées sont décrites dans le Tableau XI en annexe. Les sondes non liées migrent rapidement au bas du gel alors que les complexes protéines-sondes migrent moins rapidement. Les complexes non-spécifiques sont identifiés par une flèche bleue.

Puisqu'il semble que le SNP -95C>G soit responsable de l'activité promotrice différentielle observée entre les trois haplotypes d'YWHAQ, des essais de mutagenèse dirigée ont été réalisés pour valider cet effet. Pour ce faire, les constructions plasmidiques des haplotypes H1 et H2 ont été utilisées comme gabarits pour les différentes réactions indépendantes de mutagenèse (Figure 26). Une réaction a permis de muter l'haplotype H1 en haplotype H2 en changeant le nucléotide C en G à la position -95. Le résultat attendu était une diminution de l'activité promotrice de l'haplotype H1/95G. Une seconde réaction inverse a permis de muter l'haplotype H2 en haplotype H1 en changeant le nucléotide G en C à la position -95. Le résultat attendu était une augmentation de l'activité promotrice de l'haplotype mutant H2/95C.



**Figure 26 : Schéma des constructions utilisées lors des expériences de mutagenèse dirigée pour le gène YWHAQ**

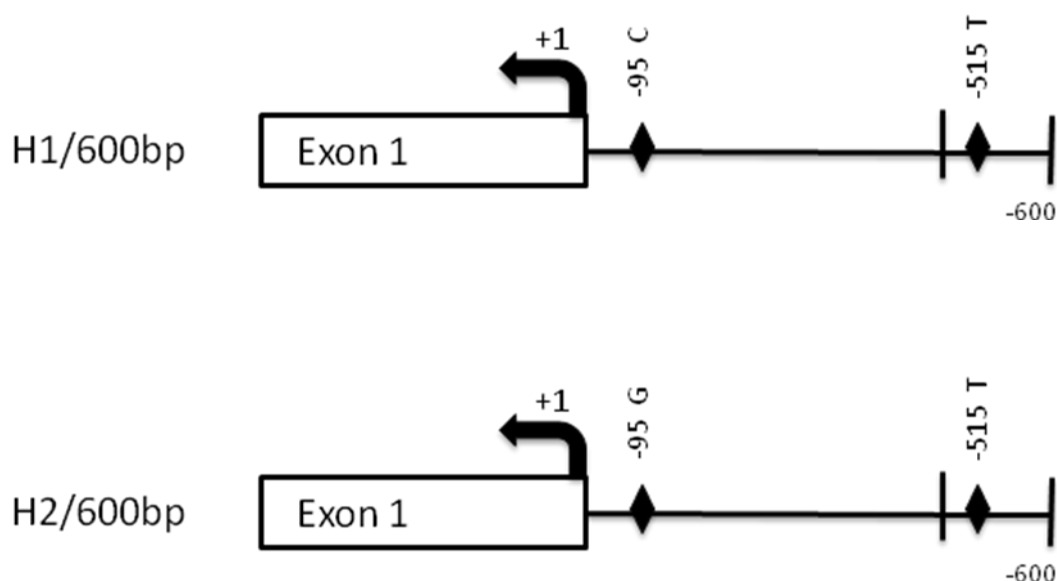
L'activité promotrice des nouvelles constructions mutées H1/95G et H2/95C a été testée par des essais de gène rapporteur pour voir l'impact des mutations sur l'activité promotrice d'YWHAQ. Le résultat de la transfection cellulaire dans les trois lignées cellulaires est montré à la Figure 27. On constate que tous les promoteurs sous-clonés sont actifs puisque ses valeurs de luciférases sont de 5 à 95 fois plus élevées que le contrôle négatif (pGL3b). Une activité différentielle est toujours observée entre les haplotypes H1 et H2 originaux ( $p < 0.05$  dans les trois lignées) où l'haplotype H1 montre une activité promotrice plus forte que l'haplotype H2 : le H1 montre une activité de 1,14 à 1,5 fois supérieure à l'haplotype H2 original. Par contre, aucune activité promotrice différentielle n'a été obtenue entre les haplotypes originaux et les haplotypes mutés correspondants (H1 vs H1/95G et H2 vs H2/95C). Le profil similaire a été observé dans toutes les lignées cellulaires testées. On observe toujours la présence d'une activité promotrice différentielle *in vitro* entre l'haplotype H1 et H2 originaux du promoteur d'YWHAQ.



**Figure 27 . Impact fonctionnel de la mutagenèse dirigée à partir des haplotypes H1 et H2 du promoteur d'YWHAQ.**

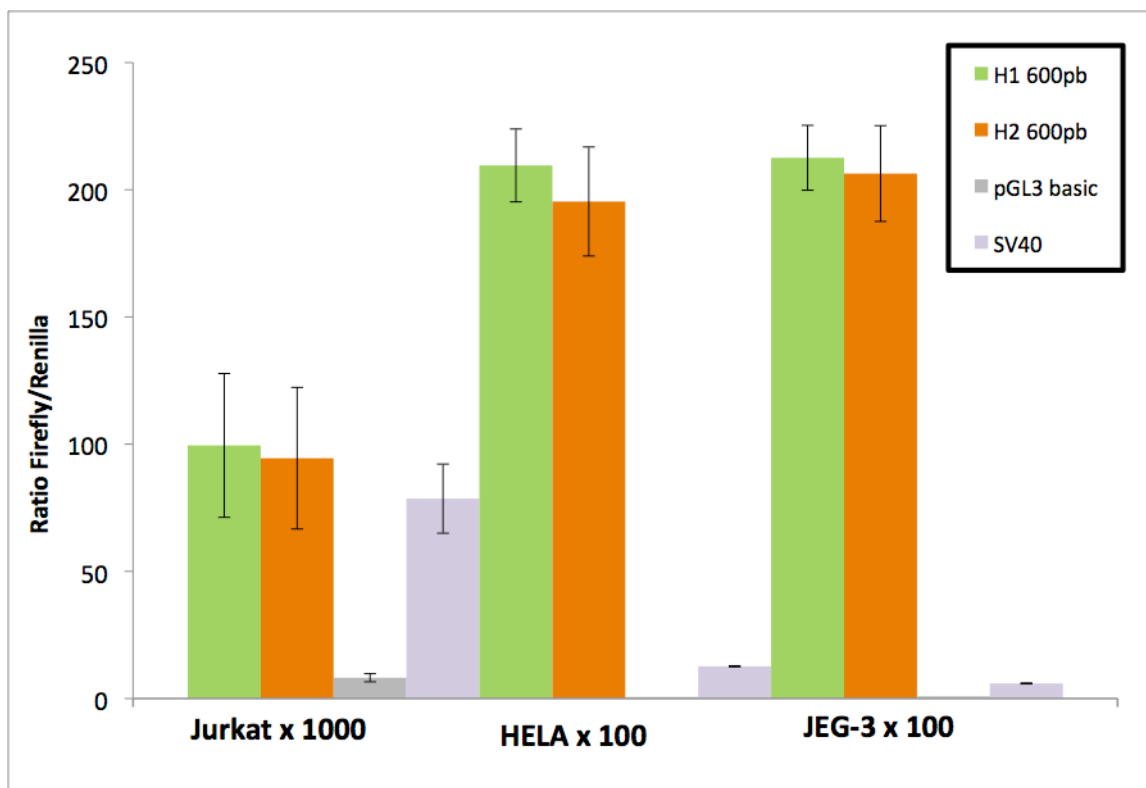
La transfection cellulaire illustrée est faite dans les trois lignées cellulaires (JURKAT, JEG-3 et HeLa). Les résultats illustrés sont tirés d'une expérience représentative parmi 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en ratio de l'activité de la Firefly / Renilla multiplié par 100 ou 1000 selon indications. Les valeurs p sont calculés à partir de 4 réplicas avec le test Student non-pairé (\* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ )

Puisque ni les essais de mutagenèse dirigée et ni les essais de retardement sur gel n'ont pas permis valider l'impact fonctionnel des deux SNPs -515T>G et -95C>G du promoteur d'YWHAQ, de nouvelles constructions raccourcis du promoteur ont été confectionnées. Ces constructions contenaient seulement 600 paires de bases et excluant ainsi la région en amont des deux SNPs du promoteur d'YWHAQ, région qui pourrait potentiellement affecter l'activité promotrice en liant ses deux SNPs. Le schéma du promoteur raccourci d'YWHAQ est illustré à la Figure 28.



**Figure 28 . Schéma des haplotypes du promoteur raccourci d'YWHAQ.**

L'activité promotrice des haplotypes raccourcis H1/600bp et H2/600bp a été testée par des essais de gène rapporteur pour voir leur impact sur l'activité promotrice d'YWHAQ (Figure 29). On constate que le promoteur raccourci sous-cloné est actif puisque ses valeurs de luciférase sont de 10 à 350 fois plus élevées que le contrôle négatif (pGL3b). Aucune activité différentielle n'est observée entre les deux haplotypes raccourcis dans les lignées cellulaires testées. Le même profil a été observé dans les trois lignées cellulaires.



**Figure 29 . Impact fonctionnel des promoteurs raccourcis d'YWHAQ.**

La transfection cellulaire illustrée est faite dans les 3 lignées cellulaires (JURKAT, HeLa et JEG-3). Les résultats illustrés sont tirés d'une expérience représentative parmi 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés en ratio de l'activité de la Firefly / Renilla multiplié soit par 100 ou par 1000 selon indications. Les valeurs p sont calculés à partir de 4 réplicats avec le test Student non-pairé (\* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ )

## DISCUSSION

### *Rappel du projet*

L'existence de variants génétiques fonctionnels semble expliquer en partie la différence inter-individuelle dans la susceptibilité à développer une maladie. Dans ce projet, mon attention s'est porté essentiellement sur les SNPs localisés dans la région de régulation des gènes (rSNPs). Ces polymorphismes peuvent affecter la liaison de facteurs de transcription ce qui engendre des altérations dans la transcription des gènes correspondants. Puisque l'élimination des cellules par le processus de mort cellulaire programmée (apoptose) est un mécanisme essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, il est probable que la présence de variants dans cette voie hautement régulée puisse augmenter le risque de développer une maladie complexe notamment le cancer. L'accumulation de cellules anormales contenant une voie d'apoptose dérégulée contribuerait à créer un environnement propice à la tumorigenèse .

Pour ce faire, j'ai déterminé le contenu en SNPs dans la région proximale des promoteurs de 11 gènes de la voie intrinsèque de l'apoptose : BAG1, BAG3, CARD9, CD47, CYCS, MAP4K3, MAPK1, MAPK8, NOD1, YWHAB et YWHAQ. L'impact fonctionnel des rSNPs correspondants et des haplotypes associés ont été effectué en combinant des essais *in vitro* et des outils de prédictions *in silico*.

### ***Sommaire des résultats obtenus***

L'étude des rSNPs dans les promoteurs a permis d'identifier 63 rSNPs et 32 haplotypes majeurs dans 11 gènes de la voie intrinsèque de l'apoptose (Tableau II). Le but de cet étude était de découvrir s'il y avait un impact fonctionnel entre les différents haplotypes pour un promoteur donné. Sur les 11 gènes étudiés, les promoteurs des gènes d'YWHAB et YWHAQ ont montré une activité promotrice différentielle. Ces résultats supportent l'hypothèse initiale qui proposait que la variabilité génétique au niveau des promoteurs pouvait mener à une activité promotrice différentielle. Plusieurs SNPs/haplotypes étaient présents dans les neuf autres promoteurs étudiés, mais aucun d'entre eux ne semble être fonctionnel, du moins dans le contexte des lignées cellulaires utilisées.



### ***La famille protéique 14-3-3***

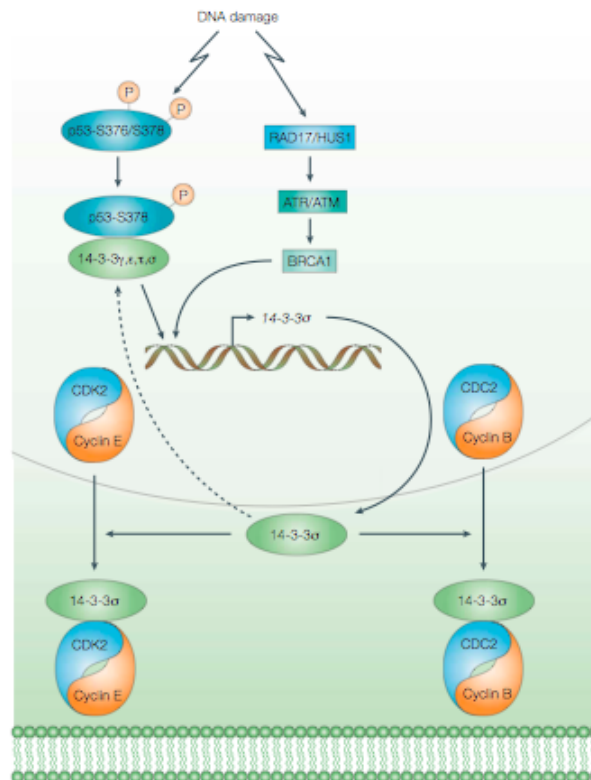
La famille 14-3-3 est un groupe de protéines très conservées entre espèces et qui sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires vitaux tels que le métabolisme, la circulation des protéines, la signalisation cellulaire, l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire (Mackintosh, 2004). La famille 14-3-3 est composée de sept isoformes nommés bêta, epsilon, zêta, éta, thêta, gamma et sigma (Jones, 1995). Ces protéines sont exprimées ubiquitairement et elles ont la capacité de s'auto-assembler en homo et hétérodimères afin de lier un large spectre de partenaires : les facteurs de transcriptions, des enzymes de biosynthèse, des protéines du cytosquelette, des molécules de signalisation, des facteurs de l'apoptose et des suppresseurs de tumeurs. Cette liaison protéique est phosphosérine-dépendante ou phosphosérine-indépendante selon le partenaire de liaison (Muslin, 1996). La fonction des protéines 14-3-3 varie selon le mode d'action sur leurs cibles (Obsilova, 2008):

1) la protéine 14-3-3 peut changer la conformation de son partenaire de liaison.

2) la protéine 14-3-3 peut obstruer physiquement les séquences-spécifiques ou les caractéristiques structurelles de son partenaire de liaison.

3) la protéine 14-3-3 peut agir comme une molécule adaptatrice et ancrer des protéines à proximité les unes des autres.

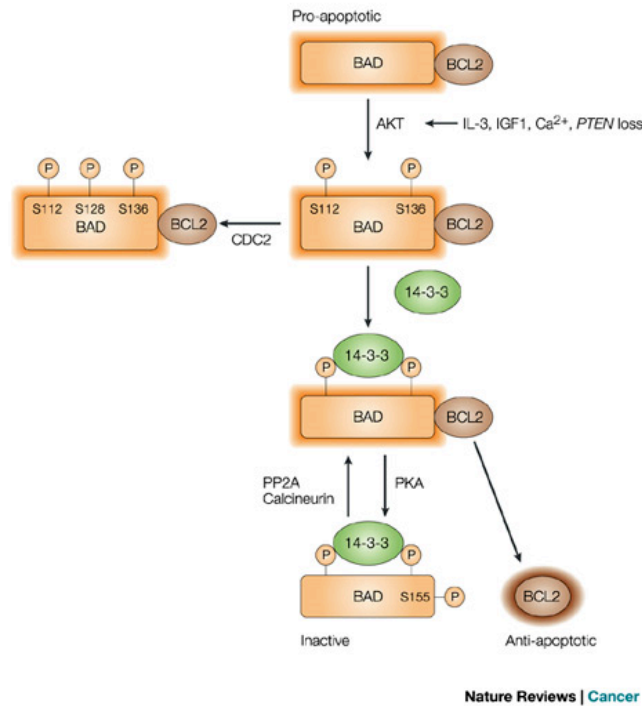
Un des mécanismes d'action des protéines 14-3-3 est leurs capacité à modifier l'activité des sites de liaison à l'ADN. Un exemple connu est la liaison avec la protéine suppresseur de tumeur p53. Après un dommage à l'ADN, la déphosphorylation de la Ser376 génère un motif de liaison des 14-3-3 à l'extrémité carboxyle de la protéine p53 (Waterman, 1998) (Figure 30). Cette association conduit à une augmentation de son activité de liaison à l'ADN. Par contre, la perte de cette capacité à lier les protéines 14-3-3 conduit à une forte réduction de la capacité de la protéine p53 à induire la transcription des gènes qui interviennent normalement dans un arrêt du cycle cellulaire après un dommage à l'ADN (Stavrudi, 2001).



**Figure 30 : Les dommages à l'ADN induisent les fonctions des protéines 14-3-3 en amont et en aval de la protéine p53 (Hermeking, 2003).**

Les protéines de la famille 14-3-3 sont connues pour prévenir un déclenchement non-désiré du mécanisme de l'apoptose et aident au maintien du bon déroulement du cycle cellulaire (Kuzelova, 2009). L'affinité des protéines 14-3-3 pour leur cibles est régulée par la phosphorylation autant sur les cibles protéiques qu'entre eux (Obsilova, 2008).

Fait important, l'implication des protéines 14-3-3 dans la régulation des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs suggère un rôle dans l'oncogénèse (Tzivion, 2006). Il a été proposé que la liaison des protéines 14-3-3 à des ligands pro-apoptotiques comme BAD et BAX constitue une étape essentielle à la survie cellulaire (Samuel, 2001), (Datta, 2000), (Master, 2001), (Subramanian, 2001), (Yang, 2001). Par exemple, YWHAQ est connu pour se lier avec BAD, une protéine BCL2-related, et ainsi supprimer sa fonction anti-apoptose en relocalisant cette protéine BAD dans le cytoplasme (Zha, 1996), (Hsu, 1997) (Figure 31).



**Figure 31 : Mécanisme d'action anti-apoptotique d'YWHAQ (14-3-3) lors de sa liaison avec BAD (Hermeking, 2003).**

La surexpression des plusieurs isoformes des protéines de la famille 14-3-3, YWHAB, YWHAQ, YWHAG, YWHAE et YWHAZ, a été démontré dans le cancer du poumon (Qi, 2003). Les isoformes 14-3-3  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\sigma$  et  $\tau$  sont fortement exprimés dans des biopsies de cancer du poumons comparativement au tissu seins(Qi, 2005). De plus, un SNPc d'YWHAQ (rs6734469) a montré une corrélation dans la résistance au traitement des patients atteints de sarcomes des tissus mous (Vazquez, 2009). Donc, les protéines 14-3-3 ont un rôle central dans la survie cellulaire, leur déplétion peut mener à l'activation de facteurs pro-apoptotiques. Lors de stress cellulaire, un mécanisme d'inhibition peut être exercé sur les protéines 14-3-3 pour contre-carrer leur effet pro-apoptotique.

### ***YWHAB (14-3-3- $\beta$ )***

YWHAB est l'isoforme béta ( $\beta$ ) de la famille 14-3-3 qui est impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires essentiels. La protéine encodée par ce gène est connue pour lier RAF1 et la phosphatase CDC25 suggérant son implication dans la signalisation mitogénique et dans la machinerie du cycle cellulaire (Conklin, 1995), (Takahara, 2000). Le promoteur de ce gène contient 7 rSNPs qui forment 3 haplotypes communs (plus de 5 % dans notre cohorte) (Tableau IV). Nous avons montré qu'il existe une activité promotrice différentielle entre les haplotypes du promoteur d'YWHAB (Figure 15). L'haplotype H8 possède une activité promotrice plus forte que les deux autres haplotypes (H1 et H11). En comparant les séquences des différents haplotypes, il est difficile d'identifier le ou les rSNPs fonctionnels à l'aide des expériences *in vitro* réalisées. Sur les 6 rSNPs testés lors de ces essais, seulement les rSNPs -730T/G et -141C/T ont montré qu'il y avait des liaisons différentielles (Figure 16 et Figure 17).

Les prédictions de liaisons de facteurs de transcription du rSNP -730 T/G ont montré une liaison différentielle. L'allèle G (H1) peut lier deux éléments "p53 tumor suppressor" tandis que l'allèle T (H8) ne lie pas ces facteurs (Tableau V). Les "scores" de la matrice pour ces deux éléments sont de 0.920 et 0.975 ce qui est qualifié un "bon" match à la matrice ( $>0,80$ ) selon les normes de MatInspector (Cartharius, 2005). Selon la littérature, le facteur de transcription p53 régule l'expression des gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires incluant le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ainsi que l'apoptose (Vogelstein, 2000). P53 peut induire l'apoptose en réponse à un dommage à

l'ADN lorsque les lésions sont très étendues ou lorsque le mécanisme de réparation à l'ADN échoue (Lane, 1993). La perte de l'activité de l'élément p53 se traduit par une tolérance aux dommages à l'ADN produits par des agents génotoxiques (Irby, 1999). Le développement du cancer est éventuellement favorisé puisque la cellule n'est plus capable d'induire l'apoptose. Ainsi, la perte de la liaison du facteur de transcription p53 par l'allèle T pourrait favoriser l'expression du gène YWHAB et accentuer l'inabilité de la cellule à induire l'apoptose ainsi qu'à intervenir dans la progression du cycle cellulaire normal.

Les expériences de mutagenèse dirigée sur les SNP -730T/G et -141 C/T n'ont pas permis de valider leur impact direct de ces SNPs sur l'activité promotrice différentielle observée pour YWHAB. Les essais de transfections cellulaires des constructions raccourcis H1/900bp et H8/900bp du gène YWHAB ont montré une activité promotrice semblable (Figure 21). La perte de l'activité promotrice différentielle entre ses deux haplotypes permet de spéculer sur le rôle d'un ou des deux SNPs exclus des constructions (-913C/G et -730T/G). La perte de ces SNPs doit empêcher la liaison d'un complexe protéique et ainsi causer la perte l'activité promotrice différentielle d'YWHAB. Ceci suggère que la région tronquée est impliquer dans l'activité promotrice différentielle antérieurement avec les constructions de 2kb.

À notre connaissance, il n'y a aucune publication visant la caractérisation de la région promotrice d'YWHAB. Cependant, plusieurs études ont été réalisées sur la quantification de l'expression génique de cet isofome de la famille 14-3-3. Une étude a démontrée que l'ARNm d'14-3-3 $\beta$  était surexprimé dans plusieurs

lignées cellulaires de tumeurs murines et qu'une réduction de 14-3-3 $\beta$  pourrait supprimer la croissance des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Sugiyama, 2003). Il a été reporté que l'isoforme  $\beta$  est surexprimé dans les cellules NIH 3T3 ce qui stimule la croissance cellulaire et la formation des tumeurs chez les souris "nude", appuyant son potentiel oncogénique. Le mécanisme d'action proposé est l'augmentation de l'activation de Raf-1 ce qui résulte en un renforcement de l'activation de la cascade MAPK (Takahara, 2000).

En considérant la littérature existante, nos résultats suggère que l'haplotype H8 associé à une plus forte activité promotrice, augmentant ainsi la quantité de l'oncogène YWHAB (anti-apoptotique), favoriserait le développement d'un cancer par une diminution de l'apoptose.

### ***YWHAQ(14-3-3- $\tau/\theta$ )***

YWHAQ est l'isoforme thétâ ( $\tau/\theta$ ) de la famille 14-3-3. YWHAQ semble réguler l'apoptose directement sous l'influence d'un stress génotoxique (Stavridi, 2001), (Waterman, 1998). YWHAQ est abondamment exprimée dans le cerveau, le cœur et le pancréas, et à des niveaux inférieurs dans les reins et le placenta (Malaspina, 2000).

Le promoteur de ce gène contient 2 SNPs qui forment 3 haplotypes communs (Tableau VIII). Nous avons montré qu'il existe une activité promotrice différentielle entre les haplotypes du promoteur d'YWHAQ (Figure 23). L'haplotype H1 possède une activité promotrice plus forte que les deux autres haplotypes (H2 et H4). En comparant les séquences des différents haplotypes, seul le rSNP -95 C/G semble affecter l'activité différentielle puisque l'allèle C est seulement observé avec l'haplotype H1 tandis que l'allèle G est observé dans les deux autres haplotypes avec l'activité promotrice plus faible. Les expériences de mutagenèse dirigée sur le SNP -95C/G n'ont pas permis de valider l'impact directe de ce SNP sur l'activité promotrice différentielle observée pour YWHAQ.

Les essais de transfections cellulaires des constructions raccourcis à 600 bp du gène YWHAQ ,H1/95G et H2/95C, ont montré une activité promotrice semblable pour les haplotypes H1 et H2 (Figure 29) i.e. une perte de l'activité promotrice différentielle. Il est connu que la liaison d'un complexe protéique tel que les facteurs de transcription peut nécessiter la liaison à plusieurs points d'ancrage à l'ADN. Ainsi, la perte d'une région entière d'ADN peut empêcher la liaison du complexe protéique de ce SNP ainsi causer la perte l'activité



promotrice différentielle d'YWHAQ. Ceci suggère que la région tronquée en amont influence ses SNPs afin de créer l'activité promotrice différentielle antérieurement avec les constructions de 2kb.

Les essais de retard sur gel n'ont pas montré de liaison différentielle au niveau des deux rSNPs et ce dans les trois lignées cellulaires testées (Figure 24 et Figure 25) avec les conditions expérimentales utilisées.

Une étude précédente a étudié l'expression de l'isoforme 14-3-3 theta sous une nouvelle forme tronquée en 3'UTR dans les cellules de Sertoli du testicule murin qui influencerait sa fonction cellulaire (Chaudhary, 2000). Une autre étude a démontré qu'YWHAQ était significativement surexprimée dans le sérum des patients atteint du cancer du poumon comparativement aux individus non-atteints (Pereira-Faca, 2007). Ils ont même proposé que cette détection dans le sérum des patients ouvrait la possibilité d'utiliser ce biomarqueur pour discriminer efficacement les différents stages du développement du cancer du poumon.

Une récente étude sur l'identification de variants fonctionnels sur des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose a permis de trouver 7 SNPs qui présentent des différences alléliques dans la réponse cellulaire à un large panel d'agents chimiothérapeutiques cytotoxiques. Parmi les SNPs trouvés, un SNP intronique du gène YWHAQ (rs6734469,  $P=5.6 \times 10^{-47}$ ) a démontré une forte association avec la faible réponse aux agents chimiothérapeutiques ainsi qu'un faible taux de survie des patients atteints du sarcome des tissus mous (Vazquez, 2009).

À notre connaissance, il n'y a aucune publication qui présente la caractérisation de la région promotrice d'YWHAQ. En combinant nos résultats avec la littérature existante, il semble que l'haplotype 1 associé à une plus forte activité promotrice favoriserait l'apparition du cancer suite à une diminution de l'apoptose.

### ***Limitations de l'étude***

Mon projet cherchait à démontrer le lien entre la variabilité génétique et l'activité promotrice différentielle. Pour ce faire nous avons ciblé le promoteur proximal défini arbitrairement comme une région de 2kb en amont de l'exon 1. Nous sommes conscients qu'il est probable que d'autres polymorphismes présents à l'extérieur de la région promotrice puissent influencer le niveau d'expression d'un gène. Une des limites importantes de notre étude est le contexte *in vitro* des expériences. Il se peut que les résultats ainsi obtenus ne reflètent pas nécessairement ce que nous pourrions observer *in vivo*. La régulation de l'expression des gènes implique généralement plusieurs éléments régulateurs ainsi que des facteurs et cofacteurs de transcriptions qui peuvent avoir été absent dans notre contexte expérimental *in vitro*. Les modifications épigénétiques du promoteur sont aussi des éléments importants pouvant influencer la disponibilité de la région promotrice à lier des facteurs de transcriptions. Pour ce qui est de nos expériences de retard sur gel, la liaison des protéines présentes dans les extraits nucléaires pourraient lier ou non différemment la sonde dans un contexte *in vitro* vs *in vivo*. Dans la cellule, le recrutement de complexes protéiques à l'ADN nécessite l'interaction avec plusieurs facteurs de transcription pour pouvoir venir lier le promoteur. Il se peut que la sonde utilisée ne contient pas les sites de liaisons de ces facteurs de transcriptions. Cette perte de ces sites de liaison influencera ainsi le recrutement de la protéine ou du complexe protéique qui se lie normalement à notre région ciblée par notre sonde. De plus, la force de liaison entre les protéines et l'ADN

varient selon le type de protéines ainsi que les conditions expérimentales. Ainsi, il est possible que les liaisons protéiques faibles avec notre sonde ont été perdues lors de la migration physique sur le gel d'acrylamide. Il est important aussi de préciser que les conditions utilisées pour tous les essais de retard sur gel étaient fixes, ce qui permet de supposer que nous avons manqué certaines faibles liaisons protéiques. Par exemple, l'utilisation de plusieurs ratios de compétiteurs auraient pu permettre d'optimiser les liaisons protéiques à l'ADN et ainsi observé un patron de bandes plus représentatif du contexte cellulaire.

## CONCLUSION

Ce projet a permis d'identifier des polymorphismes et des haplotypes présents dans les promoteurs des gènes de la voie intrinsèque de l'apoptose. Certains des rSNPs, notamment ceux dans YWHAB et YWHAQ, pourraient avoir un impact sur le niveau d'expression des gènes. Cette variabilité génétique semble pouvoir contribuer à la susceptibilité interindividuelle dans le processus de tumorigenèse. Ainsi ces marqueurs génétiques pourrait aider dans la prédiction de la susceptibilité interindividuelle à développer un cancer tel que la leucémie de l'enfant. Des études d'association à l'aide d'une cohorte de 350 patients atteints de la LLA et 350 contrôles d'origine canadienne-française sont présentement en cours.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adams J.M, Cory S. 1998.** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998, Vol. 281, pp. 1322-1326.
- Adams J.M, Harris A.W, Strasser A, Ogilvy S, Cory S. 1999.** Transgenic models of lymphoid neoplasia and development of a pan-hematopoietic vector. *Oncogene*. 1999, Vol. 18, 38, pp. 5268-5277.
- Aggarwal B.G, Darnaym B.B. 1997.** Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *J Leukoc Biol*. 1997, Vol. 61, pp. 559-566.
- Aitken, A. 2006.** 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biology*. 2006, Vol. 16, pp. 162-172.
- Albee L, Shi B, Perlman H. 2007.** Aspartic protease and caspase 3/7 activation are central for macrophage apoptosis following infection with E.Coli. *J Leukoc Biol*. 2007, Vol. 81, 1, pp. 229-237.
- Alizadeh A.A, Eisen M.B, Davis R.E and al. 2000.** Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000, Vol. 403, pp. 503-511.
- Allen J.C, Talab F, Zuzel M, Lin K, Slupsky J.R. 2010.** c-Abl regulates Mcl-1 gene expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2010, Vol. 117, 8, pp. 2414-2422.
- Altshuler D, Daly M.J, Lander E.S. 2008.** Genetic Mapping in Human Disease. *Science*. 2008, Vol. 322, 5903, pp. 881-888.
- Amarante-Mendes M.P, McGahon A.J, Nishioka W.K, Witte O.N, Green D.R. 1998.** Bl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene*. 1998, Vol. 16, 11, pp. 1383-1390.
- Aouacheria A, Brunet E, Gouy M. 1996.** Phylogenomics of life-or-death switch in multicellular animals: Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol. Chem*. 1996, Vol. 271, pp. 7440-7444.
- Ashkenazi A, Dixit V.M. 1998.** Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998, Vol. 281, pp. 1305-1308.

- Ashkenazi, A. 2002.** Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*. 2002, Vol. 2, 6, pp. 420-430.
- Bao Q, Shi Y. 2007.** Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*. 2007, Vol. 14, 1, pp. 56-65.
- Barry M, Bleackley R.C. 2002.** Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*. 2002, Vol. 2, pp. 401-409.
- Beckmann J.S, Estivill X, Antonarakis S.E. 2007.** Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genetic*. 2007, Vol. 8, pp. 639-646.
- Bélanger H, Beaulieu P, Moreau C, Labuda D, Hudson T.J, Sinnott D. 2005.** Functional promoter SNPs in cell cycle checkpoint genes. *Human Molecular Genetics*. 2005, Vol. 14, 18, pp. 2641-2648.
- Bhatia K, Siraj A.K, Hussain A, Bu R, Gutiérrez M.I. 2003.** The tumor suppressor gene 14-3-3 sigma is commonly methylated in normal and malignant lymphoid cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. February 2003, Vol. 12, 2, pp. 165-169.
- Boccia L.M, Lillicrap D, Newcombe K, Mueller C.R. 1996.** Binding of the Ets factor GA-binding protein to an upstream site in the factor IX promoter is a critical event in transactivation. *Molecular Cell Biology*. 1996, Vol. 16, pp. 1929-1935.
- Bois, P.R. 2003.** Hypermutable minisatellites, a human affair? *Genomics*. 2003, Vol. 60, pp. 349-355.
- Bond G.L, Hu W, Bond E.E and al. 2004.** A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004, Vol. 119, pp. 591-602.
- Breckenridge D.G, Germain M, Mathai J.P, Nguyen M, Shore G.C. 2003.** Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*. 2003, Vol. 22, pp. 8608-8618.
- Brimmell M, Mendiola R, Mangion J, Packham G. 1998.** BAX frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are

associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability. *Oncogene*. 1998, Vol. 16, 14, pp. 1803-1812.

**Burlacu, A. 2003.** Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med*. 2003, Vol. 7, pp. 249-257.

**Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. 2005.** MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 2005, Vol. 21, pp. 2933-2942.

**Chaudhary J, Skinner M.K. 2000.** Characterization of a Novel Transcript of 14-3-3 Theta in Sertoli Cells. *Journal of Andrology*. 2000, Vol. 21, 5, pp. 730-738.

**Chen K, Zhao H, Hu Z, Wang L, Zhang W, Sturgis E.M, Wei Q. 2008.** CASP3 polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of head and neck. *Clin Cancer Res*. 2008, Vol. 14, pp. 6343-6349.

**Chicheportiche Y, Bourdon P.R, Xu H, Hsu Y.M, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning J.L. 1997.** TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*. 1997, Vol. 272, 51, pp. 32401-32410.

**Chowdhury I, Tharakan B, Bhat G.K. 2008.** Caspases: An update. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 2008, Vol. 151, 1, pp. 10-27.

**Chrisanthar R, Knappskog S, Løkkevik E, Anker G, Ostenstad B, Lundgren S, Risberg T, Mjaaland I, Skjøsberg G.T, Schlichting E, Fjøsne H.E, Nysted A, Lillehaug J.R, PE. Lønning P.E. 2011.** Predictive and Prognostic Impact of TP53 Mutations and MDM2 Promoter Genotype in Primary Breast Cancer Patients Treated with Epirubicin or Paclitaxel. *PLoS One*. 2011, Vol. 6, 4, p. e19249.

**Clavien P.A, Rudiger H.A, Selzner M. 2000.** Mechanism of hepatocyte death after ischemia: apoptosis versus necrosis. *International Journal of Oncology*. 17, 2000, pp. 869-879.

**Cohen, G.M. 1997.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Bochem Journal*. 1997, Vol. 326, Pt1, pp. 1-16.



**Coleman S.L, Hoogendoorn B, Guy C, Smith S.K, O'Donovan M.C, Buckland P.R. 2002.** Streamlined approach to functional analysis of promoter-region polymorphisms. *Biotechniques*. 2002, Vol. 33, pp. 412-418.

**Conde L, Vaquerizas J.M, Santoyo J, Al-Shahrour F, Ruiz-Llorente S, Robledo M, Dopazo J. 2004.** PupaSNP Finder : a web tool for finding SNPs with putative effect at transcriptional level. *Nucleic Acid Research*. 2004, Vol. 32, pp. W242-W248.

**Conklin DS, Galaktionov K, Beach D. 1995.** 14-3-3 proteins associate with CDC25 phosphatases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1995, Vol. 92, pp. 7892-7896.

**Cory S, Adams J.M. 2002.** The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002, Vol. 2, pp. 647-656.

**Cryns V, Yuan J. 1998.** Proteases to die for? *Genes Dev*. 1998, Vol. 12, 11, pp. 1551-1570.

**Dai D.L, Martinka M, Bush J.A, Li G. 2004.** Reduced Apaf-1 expression in human cutaneous melanomas. *British Journal of Cancer*. 2004, Vol. 91, pp. 1089-1095.

**Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. 2004.** Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high throughput applications. *Methods*. 2004, Vol. 33, pp. 95-103.

**Datta S.R, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik S.W, Greenberg M.B, Yaffe M.E. 2000.** 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Molecular Cell*. 2000, Vol. 6, pp. 41-51.

**Degterev A, Boyce M, Yuan J. 2003.** A decade of caspases. *Oncogene*. 2003, Vol. 22, 53, pp. 8543-8567.

**Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenameele P. 2001.** Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Science*. 2001, Vol. 58, pp. 356-370.

**Dougherty M.K, Morrison D.K. 2004.** Unlocking the code of 14-3-3. *Journal of Cell Science*. 2004, Vol. 117, 10, pp. 1875-1884.

- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. 2000.** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependant caspase activation bt elimination IAP inhibition. *Cell*. 2000, Vol. 102, pp. 33-42.
- Elmore, Susan. 2007.** Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007, Vol. 35, 4, pp. 495-516.
- Esposti, MD. 2002.** The roles of BID. *Apoptosis*. 2002, Vol. 7, pp. 433-440.
- Eujanés S, Benavente Y, Bosch F, Martín-Guerrero I, Colomer D, Pérez-Alvarez S, Reina O, Ardanaz M.T, Jares P, García-Orad A and al. 2008.** Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research*. 2008, Vol. 68, pp. 10178-10186.
- Evan G, Littlewood T. 1998.** A matter of life and cell death. *Science*. 1998, Vol. 281, 5381, pp. 1317-1322.
- Evan G.I, Vousden K.H. 2001.** Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001, Vol. 411, pp. 342-348.
- Ferl R.J, Manak M.S, Reyes M.F. 2002.** The 14-3-3sigma reviews. *Genome Biology*. 2002, Vol. 3, pp. 3010.1-3010.7.
- Gazouli M, Tzanakis K, Rallis G, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Kostakis A, Anagnou N.P, Nikiteas N. 2009.** Survivin -31G/G promoter polymorphism and sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2009, Vol. 24, pp. 145-150.
- Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. Consortium, The Wellcome Trust Case Control. 2010.* 2010, Vol. 464, pp. 713-720.
- Graeber T.G, Osmanian C, Jacks T, Housman D.E, Koch C.J, Lowe S.W, Giaccia A.J. 1996.** Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 1996, Vol. 379, 6560, pp. 88-91.
- Graf M, Brobeil A, Sturm K, Steger K, Wimmer M. 2010.** 14-3-3 beta in the healthy and diseased male reproductive system. *Human Reproduction*. November 26, 2010, Vol. 0, 0, pp. 1-8.

**Gragan Y.P, Bidlack W.R, Cohen S.M, Gldsworthly T.L, Hard G.C, Howard P.C, Riley RT, Voss K.A. 2001.** Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity, and risk assessment: fumonisin B(1) as an example. *Toxicology Science*. 2001, Vol. 61, pp. 6-17.

**Gross A, McDonnell J.M, Korsmeyer S.J. 1999.** BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & developpement*. 1999, Vol. 13, pp. 189-1911.

**Hajnoczky G, Davies E ,Madesh M. 2003.** Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003, Vol. 304, 3, pp. 445-454.

**Harris N, Brill E, Shohat O and al. 1986.** Molecular basis for heterogeneity of human p53 protein. *Mol Cell Biology*. 1986, Vol. 6, pp. 4650-4656.

**Healy J, Bélanger H, Beaulieu P, Larivière M, Labuda D, Sinnett D. 2007.** Promoter SNPs in G1/S checkpoint regulators and their impact on the susceptibility to childhood leukemia. *Blood*. 2007, Vol. 109, 2, pp. 683-692.

**Healy J, Dionne J, Bélanger H, Larivière M, Beaulieu P, Labuda D, Sinnett D. 2009.** Functional impact of sequence variation in the promoter region of TGFB1. *International Journal of Cancer*. 2009, Vol. 125, pp. 1483-1489.

**Helms C, Cao L, Krueger J.G, Wijsman E.M, Chamian F, Gordon D, Heffernan M, Daw JA, Robarge J, Ott J, Kwok PY, Menter A, Bowcock A.M. 2003.** A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nature Genetics*. 2003, Vol. 35, pp. 349-356.

**Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He T.C, Zhang L , Thiagalingam S, Kinzler K.W, Vogelstein B. 1997.** 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell*. 1997, Vol. 1, 1, pp. 3-11.

**Hermeking, H. 2003.** THE 14-3-3 CANCER CONNECTION. *Nature Reviews*. 2003, Vol. 3, pp. 931-943.

**Hill M.M, Adrain C, Duriez P.J, Creagh E.M, Martin S.J. 2004.** Analysis of the composition, asse,bly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J*. 2004, Vol. 23, pp. 2134-2145.

**Hirsch T, Marchetti P, Susin S.A, Dallaporta B, Zamzamis N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G. 1997.** The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic

proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*. 1997, Vol. 15, pp. 1573-1581.

**Ho S.Y, Wang Y.J, Chen H.L, Chen C.H, Chang C.J, Wang P.J, Chen H.H, Guo H.R. 2004.** Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the -308 tumor necrosis factor-alpha promoter gene. *Cancer Causes Control*. 2004, Vol. 15, pp. 657-663.

**Hogarth L.A, Hall A.G. 1999.** Increased BAX expression is associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999, Vol. 93, pp. 2671-2678.

**Hsu H, Xiong J, Goeddel D.V. 1995.** The TNF receptor-1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*. 1995, Vol. 81, pp. 495-504.

**Hsu S.Y, Kaipia A, Zhu L, Hsueh A.J. 1997.** Interference of BAD (Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter)-induced apoptosis in mammalian cells by 14-3-3 isoforms and P11. *Molecular Endocrinology*. 11, 1997, pp. 1858-1867.

**Igney F.H, Krammer P.H. 2002.** Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nat Rev Vancer*. 2002, Vol. 2, pp. 277-288.

**Invitrogen. 2004.** *Gateway Technology with Clonase II*. 2004.

**Irby R.B, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Trudeau W, Karl R, Fujita DI, Jove R, Yeatman TJ. 1999.** Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nature Genetics*. 1999, Vol. 21, pp. 187-190.

**Jang J.S, Kim K.M, Choi J.E, Cha S.I, Kim C.H, Lee W.K, Kam S, Jung T.H, Park J.Y. 2008.** Identification of polymorphisms in the Caspase-3 gene and their association with lung cancer risk. *Molecular carcinogenesis*. 2008, Vol. 47, pp. 383-390.

**Jang J.S, Kim K.M, Kang K.H, Choi J.E, Lee W.K, Kim C.H, Kang Y.M, Kam S, Kim I.S, Jun J.E. 2008.** Polymorphisms in the survivin gene and risk of lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2008, Vol. 60, pp. 31-39.

**Jarman A.P, Wells R.A. 1989.** Hypervariable minisatellites: recombinators or innocent bystanders? *Trends Genetic*. 1989, Vol. 5, pp. 367-371.

- Jin J, Smith F.D, Stark C, Wells C.D, Fawcett J.P, Kulkarni S, Metalnikov P, O'Donnell P, Taylor P, Taylor L, Zougman A, Woodgett J.R, Langeberg L.K, Scott J.D, Pawson T. 2004.** Proteomic, Functional, and Domain-Based Analysis of In Vivo 14-3-3 Binding Proteins Involved in Cytoskeletal Regulation and Cellular Organization. *Current Biology*. 24 August 2004, Vol. 14, 16, pp. 1436-1450.
- Jobling M.A, Hurles M.E, Tyler-Smith C. 2004.** *Human evolutionary genetics: origins, peoples, and disease*. s.l. : Garland Science, 2004.
- Jones D, Ley S, Aitken A. 1995.** Isoforms of 14-3-3 protein can form Homo- and Heterodimers in vivo and in vitro: Implications for function as adapter proteins. *FEBS Letters*. 1995, Vol. 368, 1, pp. 55-58.
- Kacinski B.M, Flick M. 2001.** Apoptosis and cutaneous T cell lymphoma. *Annals of the NY Academy of Sciences*. 2001, Vol. 941, pp. 194-199.
- Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. 2002.** Cell death: Apoptosis versus necrosis. *International Journal of Oncology*. 2002, Vol. 21, 1, pp. 165-170.
- Karlin S, Burge C. 1995.** Dinucleotide relative abundance extremes: a genomic signature. *Trends Genetic*. 1995, Vol. 11, pp. 283-290.
- Kelekar A, Thompson C.B. 1998.** BCL-2 family proteins: the role of BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol*. 1998, Vol. 8, pp. 324-330.
- Kelliher M.A, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger B.Z, Leder P. 1998.** The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*. 1998, Vol. 8, pp. 297-303.
- Kesarwani P, Mandal R.K, Maheshwari R, Mittal R.D. 2011.** Influence of caspase 8 and 9 gene promoter polymorphism on prostate cancer susceptibility and early development of hormone refractory prostate cancer. *BJU Int*. 2011, Vol. 107, 3, pp. 471-476.
- King K.L, Cidlowski J.A. 1998.** Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 1998, Vol. 60, pp. 601-617.

- Kitada S, Pedersen I.M, Schimmer A.D, Reed J.C. 2002.** Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene*. 2002, Vol. 21, pp. 3459-3474.
- Knight J.C, Udalova I, Hill A.V, Greenwood B.M, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D. 1999.** A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nature Genetics*. 1999, Vol. 22, pp. 145-150.
- Knight JC, Keating BJ, Kwiatkowski DP. 2004.** Allele-specific repression of lymphotoxin-alpha by activated B cell factor-1. *Nature Genetics*. 2004, Vol. 36, pp. 394-399.
- Knight, J.C. 2005.** Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. *Journal of Molecular Medecin*. 2005, Vol. 83, pp. 97-109.
- Knögel L.F, Werle-Schneiger G, Dally H, Müller P.J, Edler L, Bartsch H, Heussel C.P, Thomas M, Risch A. 2008.** Six single-nucleotide polymorphisms in apoptotic genes and chemotherapy outcome in lung cancer patients. *J Clin Oncol*. 2008.
- Komiya Y, Kurabe N, Katagiri K, Ogawa M, Sugiyama A, Kawasaki Y, Tashiro F. 2008.** A Novel Binding Factor of 14-3-3 $\beta$  Functions as a Transcriptional Repressor and Promotes Anchorage-independent Growth, Tumorigenicity, and Metastasis. *The Journal of Biological Chemistry*. 4 July 2008, Vol. 283, 27, pp. 18753-18764.
- Kong A.N, Yu R, Hebbar V, Chen C, Owuor E, Hu R, Ee R, Madlekar S. 2001.** Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. *Mutation Research*. 2001, Vol. 481, pp. 231-241.
- Konopleva M, Tari A.M, Estrov S, Harris D, Xie Z, Zhao S, Lopez-Berestein G, Andreeff M. 2000.** Liposomal Bcl-2 antisense oligonucleotides enhance proliferation, sensitive acute myeloid leukemia to cytosine-arabioside, and induce apoptosis independent of other antiapoptotic proteins. *Blood*. 2000, Vol. 95, 12, pp. 3929-3938.
- Kornblau S.M, Vu H.T, Ruvolo P, Extrov Z, O'Brien S, Cortes J, Kantarjian H, Andreeff M, May W.S. 2000.** BAX and PKC alpha modulate the pronostic impact

of BCL-2 expression in acute myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2000, Vol. 6, 4, pp. 1401-1409.

**Kruidering M, Evan G.I. 2000.** Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"? *IUBMB Life.* 2000, Vol. 50, 2, pp. 85-90.

**Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. 2003.** Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *Journal of Immunology.* 2003, Vol. 171, pp. 4672-4679.

**Kuwana T, Newmeyer D.D. 2003.** Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2003, Vol. 15, pp. 691-699.

**Kuzelova K, Grebenova D, Pluskalova M, Kavan D, Halada P, Hrkal Z. 2009.** Isoform-specific cleavage of 14-3-3 proteins in apoptotic JURK-MK1 cells. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2009, Vol. 106, pp. 673-681.

**Labuda D, Labbe C, Langlois S, Lefebvre J.F, Freytag V, Moreau C, Sawwicki J, Beaulieu P, Pastien T, Hudson T.J. 2007.** Patterns of variation in DNA segments upstream of transcription start sites. *Human Mutations.* 2007, Vol. 28, pp. 441-450.

**Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Pulkkinen V, Salmikangas P, Mäkelä S, Rehn M, Pirskanen A, Rautanen A, Zucchelli M, Gullstén H, Leino M, Alenius H, Petäys T, Haahtela T, Laitinen A, Laprise C, Hudson T.J, Laitinen L.A, Kere J. 2004.** Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science.* 2004, Vol. 304, pp. 300-304.

**Lane, DP. 1993.** A death in the life of p53. *Nature.* 1993, Vol. 362, pp. 786-787.

**Lavrik I.N, Krammer P.H.** Life and Death decisions in the CD95 system: Main pro-and-anti-apoptotic modulators. *ActaNaturae.* pp. ISSN: 2075-8251.

**Levine, AJ. 1997.** P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997, Vol. 88, pp. 323-331.

**Li H, Zhu H, Xu C.J, Yuan J. 1998.** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998, Vol. 94, pp. 491-501.

**Li L.C, Chui R.M, Sasaki M, Nakajima K, Perinchery G, Au H.C, Nojima D, Carroll P, Dahiya R. 2006.** A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin

gene promoter alters transcriptional activities. *Cancer Research*. 2006, Vol. 60, pp. 873-876.

**Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula S.M, Ahmad M, Alnemri E.S, Wang X. 1998.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1998, Vol. 91, pp. 479-489.

**Lodygin D, Hermeking H. 2006.** Epigenetic silencing of 14-3-3sigma in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2006, Vol. 16, pp. 214-224.

—. **2005.** The role of epigenetic inactivation of 14-3-3sigma in human cancer. *Molecular Oncology*. 2005, Vol. 15, 4, pp. 237-246.

**Lu Y, Chen G-Q. 2011.** Effector Caspases and Leukemia. *International Journal of Cell Biology*. 2011, pp. 1-8.

**Ma F, Zhang H, Zhai Y, Huang W, Zhao C, Ou S, Zhou H, Yuan W, Wang Z, Wang H, Yue W, Yu L, Li P, Xia X, Cai M, Zhang Y, Cui Y, He F, Ma Y, Zhou G. 2011.** Functional Polymorphism -31C/G in the Promoter of BIRC5 Gene and Risk of Nasopharyngeal Carcinoma among Chinese. *PloS One*. 2011, Vol. 6, 2.

**Mackintosh, Carol. 2004.** Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem Journal*. 2004, Vol. 381 (Part 2), pp. 329-342.

**Makin G, Hickman J.A. 2000.** Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res*. 2000, Vol. 301, 1, pp. 143-152.

**Malaspina A, Kaushik N, de Belleruche J. 2000.** A 14-3-3 mRNA is up-regulated in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *Journal of Neurochemistry*. 2000, Vol. 75, 6, pp. 2511-2520.

**Mancini M, Nicholson D.W, Roy S, Thornberry N.A, Peterson E.P, Casciola-Rosen L.A, Rosen A. 1998.** The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *The Journal of cell biology*. 1998, Vol. 140, pp. 1485-1495.

**Master S.C, Yang H, Datta S.R, Greenberg M.E, Fu H. 2001.** 14-3-3 inhibits BAD-induced cell death through interaction with serine-136. *Molecular Pharmacology*. 2001, Vol. 60, pp. 1325-1331.



- Masters S.C, Fu H. 2001.** 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. *Journal of Biology Chemistry*. 2001, Vol. 276, 48, pp. 45193-45200.
- Matlashewski G.J, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford L.V. 1987.** Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biology*. 1987, pp. 961-963.
- McConkey D.J, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. 1989.** Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB*. 1989, Vol. 3, pp. 1843-1849.
- Medh R.D, Thompson E.B. 2000.** Hormonal regulation of physiological cell turnover and apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000, Vol. 301, 1, pp. 101-124.
- Mhaweck, Paulette. 2005.** 14-3-3 proteins- an update. *Cell Research*. 2005, Vol. 15, 4, pp. 228-236.
- Mignotte B, Vayssiere J.L. 1998.** Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem*. 1998, Vol. 252, pp. 1-15.
- Mitchison, NA. 2001.** Polymorphism in regulatory gene sequences. *Genome Biol*. 2001, Vol. 2, 1, p. COMMENT2001.
- Morrison, Deborah K. 2009.** The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends in Cell Biology*. 19, 2009, Vol. 1, pp. 16-23.
- Muslin A.J, Tanner J.W, Allen P.M, Shaw A.S. 1996.** Interaction of the 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*. 1996, Vol. 84, pp. 889-897.
- Nambiar M, Kari V, Raghavan S.C. 2009.** Chromosomal translocations in cancer. *Biochimia et Biophysica Acta*. 2009, Vol. 1786, 2, pp. 139-152.
- Nuckel H, Frey H, Bau M, Sellmann L, Stanelle J, Durig J, Jockel K.H, Duhrsen U, Siffert W. 2007.** Association of a novel regulatory polymorphism (-938C/A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007, Vol. 109, pp. 290-297.
- Obsilova V, Silhan J, Boura E, Teisinger J, Obsil T. 2008.** 14-3-3 Proteins: A Family of Versatile Molecular Regulators. *Physiology Research*. 57 (Suppl.3), 2008, pp. 11-21.

- Ohsaka Y, Nishino H. 2010.** Polymorphisms in promoter sequences of MDM2, p53, and p16 genes in normal Japanese individuals. *Genet Mol Biol.* 2010 Oct;33(4):615-26. Epub 2010 Dec 1. 2010, Vol. 33, 4.
- Opie, Eugene L. 1962.** On the relation of necrosis and inflammation to denaturation of proteins. *J Exp Med.* 1962, Vol. 115, 3, pp. 597-608.
- Park J.Y, Park J.M, Jang J.S, Choi J.E, Kim K.M, Cha S.I , Kim C.H, Kang Y.M, Lee W.K, Kam S, Park R.W, Kim I.S, Lee J.T, Jung T.H. 2006.** Caspase-9 promoter polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Human Molecular Genetics.* 2006, Vol. 15, 12, pp. 1963-1971.
- Pastinen T, Hudson T.J. 2004.** Cis-acting regulatory variation in the human genome. *Science.* 2004, Vol. 206, pp. 647-650.
- Pastinen T, Sladek R, Gurd S, Sammak A, Ge B, Lepage P, Lavergne K, Villeneuve T, Gaudin A, Brandstorm H. 2004.** A survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression. *Physiological Genomics.* 2004, Vol. 16, pp. 184-193.
- Pepper C, Hoy T, Bentley P. 1998b.** Elevated Bcl-2/bax are a consistent feature of apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia and are correlated with in vivo chemoresistance. *Leuk. Lymphoma.* 1998b, Vol. 28, 3-4, pp. 355-361.
- Pereira-Faca, Kuick, Puravs, Zhang, Krasnoselsky, Phanstiel, Qiu, Misek, Hinderer, Tammemagi, Landi, Caporaso, Pfeiffer, Edelstein, Goodman, Barnett, Thornquist, Brenner, Hanash. 2007.** Identification of 14-3-3 theta as an antigen that induces a humoral response in lung cancer. *Cancer Research.* 2007, Vol. 67, 24, pp. 12000-12006.
- Piedrafita F.J, Molander R.B, Vansant G, Orlova E.A, Pfahl M, Reynolds W.F. 1996.** An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *Journal of Biology Chemistry.* 1996, Vol. 271, pp. 14412-14420.
- Pihlajamäki J, Karjalainen L, Karhapää P, Vauhkonen I, Taskinen M-R, Deeb S.S, Laakso M. 2000.** G-250A Substitution in Promoter of Hepatic Lipase Gene Is Associated With Dyslipidemia and Insulin Resistance in Healthy Control Subjects

and in Members of Families With Familial Combined Hyperlipidemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000, Vol. 20, pp. 1789-1795.

**Pinkoski M.J, Waterhouse N.J, Heibein J.A, Wolf B.B, Kuwana T, Goldstein J.C, Newmeyer D.D, Bleackley R.C, Green D.R. 2001.** Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2 inhibitable mitochond. *J Biol Chem*. 2001, Vol. 276, pp. 12060-12067.

**Pola R, Flex A, Gaetani E, Dal Lago A, Gerardino L, Pola P, Bernabei R. 2002.** The -74 G/C polymorphism of the interleukin-6 gene promoter is associated with Alzheimer's disease in an Italian population. *Neuroreport*. 2002, Vol. 3, pp. 1645-1647.

**Porter G.W, Khuri F.R, Fu H. 2006.** Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Semin Cancer Biology*. 2006, 16, pp. 193-202.

**Qi W, Liu X, Qiai D.D, Martinez J.D. 2005.** Isoform-specific expression of 14-3-3 proteins in human lung cancer tissues. *International Journal Cancer*. 2005, Vol. 113, pp. 359-363.

**Qi W, Martinez J.D. 2003.** Reduction of 14-3-3 proteins correlates with increased sensitivity to killing of human lung cancer cells by ionizing radiation. *Radiation Reseach*. 2003, Vol. 160, 2, pp. 217-223.

**QUIAGEN. 2005.** *QUIAGEN Plasmid Purification Handbook*. 2005.

**Ramos Lopez E, Zwermann O, Segni M, Meyer G, Reincke M, Seissler J, Herwig J, Usadel K-H, Badenhoop K. 2004.** A promoter polymorphism of the CYP27B1 gene is associated with Addison's disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and type 1 diabetes mellitus in Germans. *European Journal of Endocrinology*. 2004, Vol. 151, pp. 193-197.

**Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed J.C, Perucho M. 1997.** Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*. 1997, Vol. 275, 5302, pp. 967-969.

**Redon R, Ishikawa S, Fitch K.R, Feuk L, Perry G.H, Andrews T.D, Fiegler H, Shapero M.H, Carson A.R, Chen W. 2006.** Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006, Vol. 444, pp. 444-454.

- Reed, John C. 1999.** Dysregulation of apoptosis in cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1999, Vol. 17, 9, pp. 2941-2953.
- Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. 2008.** Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008, Vol. 9, pp. 402-412.
- Rinkenberger J.L, Korsmeyer S.J. 1997.** Errors of homeostasis and deregulated apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*. 1997, Vol. 7, 5, pp. 589-596.
- Rockman M.V, Wray G.A. 2002.** Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans. *Mol. Biol. Evol*. 2002, Vol. 19, pp. 1991-2004.
- Salvesen G.S, Dixit V.M. 1997.** Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 1997, Vol. 91, 4, pp. 443-446.
- Samuel T, Weber H.O, Rauch P, Verdoodt B, Eppel J.T, McShea A, Hermeking H, Funk J.O. 2001.** The G2/M regulator 14-3-3sigma prevents apoptosis through sequestration of Bax. *Journal Biology Chemistry*. 276, 2001, Vol. 48, pp. 45201-45206.
- Sanak M, Pierzchalska M, Bazan-Socha S, Szczeklik A. 2000.** Enhanced Expression of the Leukotriene C4 Synthase Due to Overactive Transcription of an Allelic Variant Associated with Aspirin-Intolerant Asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2000, Vol. 23, pp. 290-296.
- Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S, Sheridan DP. 2002.** Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer letters*. 2002, Vol. 187, pp. 199-205.
- Schulte-Hermann R, Bursh W, Low-Baselli A, Wagner A, Grasl-Kraupp B. 1997.** Apoptosis in the liver and its role in hepatocarcinogenesis. *Cell Biol Toxicology*. 1997, Vol. 13, pp. 339-348.
- Schulte-Hermann R, Hufnagl K, Low-Baselli A, Rossmanith W, Wagner A, Ruttkay-Neky B, Bursh W, Mullauer L, Parzefall W, Grasl-Kraupp B. 1998.** Apoptosis and hepatocarcinogenesis. *Digestion*. 1998, Vol. 59, pp. 64-65.
- Shi L, Chen G, He D, Bosc D.G, Litchfield D.W, Greenberg A.H. 1996.** Granzyme B induces apoptosis and cyclin A-associated cyclin-dependant kinase

activity in all stage of cell cycle. *The Journal of Immunology*. 1996, Vol. 157, 6, pp. 2381-2385.

**Sinnott D, Beaulieu P, Bélanger H, Lefebvre JF, Langlois S, Theberge M.C, Drouin S. 2006.** Detection and characterization of DNA variants in the promoter regions of hundreds of human disease candidate genes. *Genomics*. 2006, Vol. 87, pp. 704-710.

**Soung Y.H, Lee J.W, Kim S.Y, Sung Y.J, Park W.S, Nam S.W, Kim S.H, Lee J.Y, Yoo N.J, Lee S.H. 2005.** Caspase-8 gene is frequently inactivated by frameshift somatic mutation 1225\_1226 delTG in hepatocellular carcinomas. *Oncogene*. 2005, Vol. 24, 1, pp. 141-147.

**Stavridi E.S, Chehab N.H, Malikzay A, Halazonetis T.D. 2001.** Substitutions that compromise the ionizing radiation-induced association of p53 with 14-3-3 proteins also compromise the ability of p53 to induce cell cycle arrest. *Cancer Research*. 2001, 61, pp. 7030-7033.

**Stephens M, Smith N.J, Donnelly P. 2001.** A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction. *Am. J. Hum. Genet*. 2001, Vol. 68, pp. 978-989.

**Strasser A, Harris A.W, Bath M.L, Corry S. 1990.** Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*. 348, 1990, pp. 331-333.

**Subramanian R.R, Masters S.C, Zhang H, Fu H. 2001.** Functional conservation of 14-3-3 isoforms in inhibiting BAD-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*. 2001, Vol. 271, pp. 142-151.

**Sugiyama A, Miyagi Y, Komiya Y, Kurabe N, Kitanaka C, Kato N, Nagashima Y, Kuchino Y, Tashiro F. 2003.** Forced expression of antisense 14-3-3beta RNA suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*. 2003, Vol. 24, 9.

**Susin SA, Lorenzo H.K, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost M.C, Alzari P.M, Kroemer G. 1999.** Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *Exp Med*. 1999, Vol. 189, pp. 381-394.

**Sutton V.R, Davis J.E, Cancilla M, Johnstone R.W, Ruefli A.A, Sedelies K, Browne K.A, Trapani J.A. 2000.** Initiation of Apoptosis by Granzyme B

Requires Direct Cleavage of Bid, but Not Direct Granzyme-B-Mediated Caspase Activation. *JEM*. 2000, Vol. 192, 10, pp. 1403-1414.

**Takahara Y, Matsuda Y, Hara J. 2000.** Role of the  $\beta$  isoform of 14-3-3 proteins in cellular proliferation and oncogenic transformation. *Carcinogenesis*. 2000, Vol. 21, pp. 2073-2077.

**Talpaz M, Shah N.P, Kantarjian H and al. 2006.** Dasatinib in imatinib resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England Journal of Medicine*. 2006, Vol. 345, 24, pp. 2531-2541.

**Timmer J.C, Salvesen G.S. 2007.** Caspase substrates. *Cell death and differentiation*. 2007, Vol. 14, 1, pp. 66-72.

**Trump B.F, Berezsky I.K, Chang S.H, Phelps P.C. 1997.** The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol*. 1997, Vol. 25, pp. 82-88.

**Tsujimoto Y, Croce C. 1986.** Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1986, Vol. 83, 14, pp. 5214-5218.

**TYacoubian A, Slone S.R, Harrington A.J, Hamamichi S, Schieltz J.M, Caldwell K,A, Caldwell G.A, Standaert D.G. 2010.** Differential neuroprotective effects of 14-3-3 proteins in models of Parkinson's disease. *Cell Death and Disease*. 2, 2010, Vol. 1.

**Tzivion G, Vinita Singh G, Kaplun L, Vitaly B. 2006.** 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Seminars in Cancer Biology*. 2006, Vol. 16, pp. 203-213.

**Varfolomeev E, Vucic D. 2011.** Inhibitor of apoptosis proteins: fascinating biology leads to attractive tumor therapeutic targets. *Future Oncol*. 2011, Vol. 7, 5, pp. 633-648.

**Vasiliev G.V, Merkulov V.M, Kobzev V.F, Merkulova TI, Ponomarenko MP, Kolchanov N.A. 1999.** Point mutations within 663-666 bp of intron 6 of the human TDO2 gene, associated with a number of psychiatric disorders, damage the YY-1 transcription factor binding site. *FEBS*. 1999, Vol. 462, pp. 85-88.

**Vazquez A, Grochola L, Bond E.E, Levine A.J, Taubert H, Müller T.H, Würfl P, Bond G.L. 2009.** Chemosensitivity Profiles Identify Polymorphisms in the p53

Network Genes 14-3-3 $\tau$  and CD44 That Affect Sarcoma Incidence and Survival. *Molecular and Cellular Pathobiology*. 8 December 2009, Vol. 70, 1, pp. 172-180.

**Verhagen A.M, Ekert P.G, Pakusch M., Silke J, Connolly L.M, Reid G.E, Moritz R.L, Simpson R.K, Vaux D.L. 2000.** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000, Vol. 102, pp. 43-53.

**Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. 2002.** A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol*. 2002, Vol. 34, 3, pp. 275-305.

**Vogelstein B, Lane D, Levine A. 2000.** Surfing the p53 network. *Nature*. 2000, Vol. 408, pp. 307-310.

**Vopalensky V, Masek T, Horvath O, Vicenova B, Mokrejs M, Pospisek M. 2008.** Firefly luciferase gene contains a cryptic promoter. *RNA*. 2008, Vol. 14, pp. 1720-1729.

**Wajant, H. 2002.** The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 2002, Vol. 296, pp. 1635-1636.

**Walter N.A.R, McWeeney S.K, .Peters S.T,Belknap J.L, Hitzemann R, Buck K.J. 2008.** Single-nucleotide polymorphism masking. *Alcohol Research and Health*. 2008, Vol. 31, 3, pp. 270-271.

**Wang B, Liu K, Lin F-T, Lin W-C. 2004.** A role for 14-3-3 theta in E2F1 stabilization and DNA damage-induced apoptosis. *Journal of Biology Chemistry*. 2004, Vol. 279, pp. 54140-54152.

**Wang ZY, Chen Z. 2008.** Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*. 2008, Vol. 111, 5, pp. 2505-2515.

**Waterman M.J, Stavrid E.Si, Waterman J.L, Halazonetis T.D. 1998.** ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nature Genetics*. 1998, Vol. 19, pp. 175-178.

**Willis T.G, Jadayel D.M, Du M.Q, Peng H, Perry A.R, Abdul-Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson P.G, Dyer M.J. 1999.** Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B

cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell*. 1999, Vol. 96, 1, pp. 35-45.

**Wu X, Deng Y. 2002.** Bax and BH3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. *Front Biosci*. 2002, Vol. 7, pp. d151-156.

**Wuillème-Toumi S, Robillard N, Gomez P, Moreau P, Le Guill S, Avet-Loiseau H, Harousseau J-L, Amiot M, Bataille R. 2005.** Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia*. 2005, Vol. 19, pp. 1248-1252.

**Xiao M, Zhang D-F, Zeng Y, Cheng Y-F, Yao Y-G. 2011.** Polymorphisms in the promoter region of the CASP9 gene are not associated with the non-Hodgkin's lymphoma in Chinese patients. *Ann Hematol*. 2011, pp. 1265-1273.

**Xu K, Tavernarakis N, Driscoll M. 2001.** Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of CA(2+) release from the endoplasmic reticulum. *Neuron*. 2001, Vol. 31, pp. 957-971.

**Yaffe, Michael B. 2002.** How do 14-3-3 proteins work?- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Letters*. 2002, Vol. 513, pp. 53-57.

**Yan H, Yuan W, Velculescu V.E, Vogelstein B, Kinzler K.W. 2002.** Allelic variation in human gene expression. *Science*. 297, 2002, p. 1143.

**Yan H, Zhou W. 2004.** Allelic variations in gene expression. *Curr Opin Oncol*. 2004, Vol. 16, pp. 39-43.

**Yang H, Masters S.C, Wang H, Fu H. 2001.** The proapoptotic protein BAD binds the amphipathic groove of 14-3-3 zeta. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001, Vol. 1547, pp. 313-319.

**Yoneda T, Imaizumi K, Oono L, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. 2001.** Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem*. 2001, Vol. 276, 17, pp. 13935-13940.

**Youle R.J, Strasser A. 2008.** The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews*. January 2008, Vol. 9, pp. 47-59.



- Zannis-Hadjopoulos M, Yahyaoui W, Callejo M. 2008.** 14-3-3 Cruciform-binding proteins as regulators of eukaryotic DNA replication. *Trends in biochemical sciences*. 2008, Vol. 33, pp. 44-50.
- Zeiss, CJ. 1997.** The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*. 1997, Vol. 40, pp. 481-495.
- Zerban H, Radig S, Kopp-Schneider A, Bannasch P. 1994.** Cell proliferation and cell death (apoptosis) in hepatic preneoplasia and neoplasia are closely related to phenotypic cellular diversity and instability. *Carcinogenesis*. 1994, Vol. 15, pp. 2467-2473.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer S.J. 1996.** Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. 87, 1996, Vol. 4, pp. 619-628.
- Zhu P, Zhang D, Chowdhury D, Martinvalet D, Keefe D, Shi L, Lieberman J. 2006.** Granzyme A, which causes single-stranded DNA damage, targets the double-strand break repair protein KU70. *EMBO reports*. 2006, Vol. 7, pp. 431-437.
- Zornig M, Hueber A, Baum W, Evan G. 2001.** Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica Biophysica Acta*. 2001, Vol. 1551, pp. F1-F37.

## ANNEXES

Tableau IX : Amorces pour l'amplification PCR des promoteurs des différents gènes de l'apoptose

Gènes	Amorces Sens (F) et anti-sens (R) <sup>1</sup>
BAG1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGGCCCGCACTTGTGAC (F) GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCAGCAGGCCACTCCTTA (R)
BAG3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGAAAGCCTTGCCAATAACA (F) GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTGAGTCATCGGCTATAA (R)
CARD9	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGCCTCTGGGAGATGCTG (F) GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAGAGGCCAGGTATCTGCTG (R)
CD47	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCACAGGCAGGACCCACTG (F) GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGCCTCTCATTCATTTTC (R)
CYCS	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACCGGTGTAAGTGCAACCA (F) GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGAAGACACCCCAAAACATT (R)
MAP4K3	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAAACTCCAACATGGCTTCC (F) GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCACTCAAGCCTGGACAAC (R)
MAPK1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCATGCGGATTGGTTCCTC (F) GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTCCCCAGTTTCTGAGCTTG (R)
MAPK8	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAAGGAGCTTTTCCTTGCTG (F) GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGTGTCACGCTTGCTTCT (R)
NOD1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGAAGCTGGCTGCGACTACAG (F) GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGAGGGGAGAGGTTAGATGG (R)
YWHAB	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCCAGGATTCAAATCCAATG (F) GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAGGGAACAAAGACCCTTCC (R)
YWHAB 900pb	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACTGCAGCCTACAACCTC (F) GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAGGGAACAAAGACCCTTCC (R)
YWHAQ	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCACCACTTTGATCTGCTT (F) GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAACTTGCCCAAGGTCCTG (R)
YWHAQ 600pb	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCACCACTTTGATCTGCTT (F) GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGCTTAATTCGGAGCCCTA (R)

<sup>1</sup> Les nucléotides en gras sont des queues attb1 et attb2 servant au système de recombinaison Gateway (Invitrogen)

**Tableau X : Conditions et programmes de PCR pour l'amplification des régions promotrices.**

<b>Gène</b>	<b>Conditions de PCR*</b>	<b>Programme de PCR</b>
BAG1	A	95 °C /10', 40 cycles (95°C/45'', 58 °C/45'', 70 °C/2'), 72 °C /10'
BAG3	A	95 °C /10', 40 cycles (95°C/45'', 56 °C/45'', 72 °C/2'), 72 °C /10'
CARD9	A	95 °C /10', 8 cycles (95°C/45'', 60-56 °C/45'', 70 °C/2'), 30 cycles (95°C/45'', 56°C/45'', 70 °C/2'), 72 °C /10'
CD47	A	95 °C /10', 8 cycles (95°C/45'', 60-56 °C/45'', 70 °C/2'), 30 cycles (95°C/45'', 56°C/45'', 70 °C/2'), 72 °C /10'
CYCS	A	95 °C /10', 8 cycles (95°C/45'', 60-56 °C/45'', 70 °C/2'), 30 cycles (95°C/45'', 56°C/45'', 70 °C/2'), 72 °C /10'
MAP4K3	A	95 °C /10', 8 cycles (95°C/45'', 60-56 °C/45'', 70 °C/2'), 30 cycles (95°C/45'', 56°C/45'', 70 °C/2'), 72 °C /10'
MAPK1	B	95 °C /10', 8 cycles (95°C/45'', 60-56 °C/45'', 70 °C/2'), 30 cycles (95°C/45'', 56°C/45'', 70 °C/2'), 72 °C /10'

MAPK8	A	95 °C /10', 40 cycles (95°C/45'', 58 °C/45'', 70 °C/2'), 72 °C /10'
NOD1	B	95 °C /10', 8 cycles (95°C/45'',60-56 °C/45'', 70 °C/2'), 30 cycles (95°C/45'', 56°C/45'', 70 °C/2'), 72 °C /10''
YWHAB	C	95 °C /10', 6 cycles (95°C/45'', 55-52 °C/45'', 70 °C/2'), 30 cycles (95°C/45'', 53 °C/45'', 70 °C/2'), 72 °C/10'
YWHAQ	C	95 °C /10', 14 cycles (95°C/45'', 62-55 °C/45'', 70 °C/2'), 20 cycles (95°C/45'', 55 °C/45'', 70 °C/2'), 72 °C/10'

\*A = 0.3 µM des amorces F et R, 0,2 mM dNTPs, 1X de tampon Fast Start Taq contenant MgCl<sub>2</sub> à 25mM (Roche), 1X de tampon GC rich (Roche), 2 unités d'ADN polymérase Fast Start Taq (Roche) et 20 ng d'ADN génomique dans un volume total de 50 µL.

B= 0.4 µM des amorces F et R, 0,2 mM dNTPs, 1X de tampon Fast Start Taq contenant MgCl<sub>2</sub> à 25mM (Roche), 1X de tampon GC rich (Roche), 2 unités d'ADN polymérase Fast Start Taq (Roche) et 50 ng d'ADN génomique dans un volume total de 50 µL.

C=0.5 µM des amorces F et R, 0,2 mM dNTPs, 1X de tampon Fast Start Taq contenant MgCl<sub>2</sub> à 25mM (Roche), 1X de tampon GC rich (Roche), 2 unités d'ADN polymérase Fast Start Taq (Roche) et 50 ng d'ADN génomique dans un volume total de 50 µL

**Tableau XI : Séquence des oligonucléotides utilisés pour les essais de retardement sur gel.**

Gène	SNP*	Séquence**
<b>YWHAB</b>	-913 C	CAACTACCTT <b>C</b> AGAGGAGTAG,
	-913 G	CAACTACCTT <b>G</b> AGAGGAGTAG
	-730 T	CAGGTTGGAGTGCAG <b>T</b> GGCATGACCATAGCTCACTGCAGCCT,
	-730 G	CAGGTTGGAGTGCAG <b>G</b> GGCATGACCATAGCTCACTGCAGCCT
	-531 C	AAAGAAGGAAAAGGTAAGTA <b>C</b> CCTGAAGGATTGAAAGGATTAATGAA,
	-531 T	AAAGAAGGAAAAGGTAAGTA <b>T</b> CCTGAAGGATTGAAAGGATTAATGAA
	-141 C	CGCCCTGCCCCGGCCCTGCA <b>A</b> CCTGCCTTTCGCTCT,
-141 T	CGCCCTGCCCCGGCCCTGCA <b>T</b> CCTGCCTTTCGCTCT	
	-134 T	CCTGCCCCGGCCCTGCAACCCTGCC <b>T</b> TTCGCTCTTCTTCCTCC,
	-134 C	CCTGCCCCGGCCCTGCAACCCTGCC <b>C</b> TTCGCTCTTCTTCCTCC
	-7 G	GCCAGGACCGGAGCGGAAGTGG <b>C</b> GATCGGAGCGGAAGTGGAGCTAC,
	-7 T	GCCAGGACCGGAGCGGAAGTGG <b>T</b> ATCGGAGCGGAAGTGGAGCTAC
<b>YWHAQ</b>	-515 T	TTCTTTCCTCCACCTT <b>T</b> CATCCGTGACAAAGGTTTGGATCC,
	-515 C	TTCTTTCCTCCACCTT <b>C</b> ATCCGTGACAAAGGTTTGGATCC
	-95 C	CCGCCCAATGATGCGCCGAGCT <b>T</b> CTCCCGAGAGTCCCGCCCCCAG,
	-95 G	CCGCCCAATGATGCGCCGAGCT <b>G</b> TCCCGAGAGTCCCGCCCCCAG
<b>Contrôle de spécificité</b>	AP2	GATCGAACTGACCGCTTGAGGCCCGT

\* Les positions des SNPs sont calculées en prenant le début de l'exon 1 comme étant la position +1.

\*\* Seule la séquence en brin sens est donnée

**Tableau XII : Séquence des oligonucléotides utilisés pour les essais de mutagenèse dirigée.**

Gène	SNP*	Séquence
YWHAB	-730 T⇒G	5'-CAGGTTGGAGTGCAGGGCARGACCARAGCT-3'
	-141 C⇒T	5'-CCCGGCCCTGCAATCCTGCCTTTC-3'
YWHAQ	-95 C⇒G	5'-ACTCTCGGGAAGCTCGGCGCATCATTGG-3'
	-95 G⇒C	5'-ACTCTCGGGA CAAGCTCGGCGCATCATTGG-3'

\* Les positions des SNPs sont calculées en prenant le début de l'exon 1 comme étant la position +1.

Tableau XIII : SNPs du promoteur de BAG1 avec leur position génomique.

<b>SNP*</b>	<b>Position chromosomique</b>	<b>Numéro rs</b>
-1725 A->G	chr9:33,266,445-33,266,445	rs706123
-1710 A->G	chr9:33,266,430-33,266,430	rs706122
-1023 C->A	chr9:33,265,743-33,265,743	rs11791605
-685 C->G	chr9:33,265,405-33,265,405	rs16919130
-453 C->G	chr9: 33,265,215-33,265,215	--

\*Position calculée en considérant le début de la transcription comme étant +1

\*\* USCS, dbSNP build 131

--SNP non répertorié dans dbSNP 131

Tableau XIV : SNPs du promoteur de BAG3 avec leur position génomique.

<b>SNP*</b>	<b>Position chromosomique</b>	<b>Numéro rs</b>
-1724 A->T	chr10:121,409,158-121,409,158	rs61869035
-856 G->A	chr10:121,410,026-121,410,026	rs2420641
-788 T->{DEL T,C}	chr10:121,410,094-121,410,094	rs35117013
-787 DEL A	chr10:121,410,095-121,410,095	rs34330597
-786 DEL A	chr10:121,410,096-121,410,096	rs35097693
-212 C->T	chr10:121,410,670-121,410,670	rs11199059

\*Position calculée en considérant le début de la transcription comme étant +1

\*\* USCS, dbSNP build 131

**Tableau XV : SNPs du promoteur de CARD9 avec leur position génomique.**

<b>SNP*</b>	<b>Position chromosomique</b>	<b>Numéro rs</b>
-2016 A>G	chr9:139270149-139270149	rs3088081
-1772 T>C	chr9:139269905-139269905	rs3812560
-1411 T>C	chr9:139,269,544-139,269,544	--
-1350 G>A	chr9:139269483-139269483	rs3829111
-1205 C>T	chr9:139269338-139269338	rs10781500
-1159 C>T	chr9:139,269,292-139,269,292	--
-1065 A>G	chr9:139269198-139269198	rs3829110
-1002 A>G	chr9:139269135-139269135	rs3812558
-362 A>G	chr9:139,268,495-139,268,495	--
-320 C>T	chr9:139,268, 453-139,268,453	--
-134 C>G	chr9:139,268, 267-139,268,267	--

\*Position calculée en considérant le début de la transcription comme étant +1

\*\* USCS, dbSNP build 131

--SNP non répertorié dans dbSNP 131

**Tableau XVI : SNPs du promoteur de CD47 avec leur position génomique.**

<b>SNP*</b>	<b>Position chromosomique</b>	<b>Numéro rs</b>
-1750 C->G	chr3: 107,811,685-107,811,685	--
-1281 G->A	chr3:107,811,142-107,811,142	rs326341
-1176 C->G	chr3:107,811,037-107,811,037	rs7612356
-343 C->T	chr3: 107,810,278-107,810,278	--
-308 C->T	chr3:107,810,243-107,810,243	rs62264065

\*Position calculée en considérant le début de la transcription comme étant +1

\*\* USCS, dbSNP build 131

--SNP non répertorié dans dbSNP 131



**Tableau XVII : SNPs du promoteur de CYCS avec leur position génomique.**

<b>SNP*</b>	<b>Position chromosomique</b>	<b>Numéro rs</b>
-1432 A->G	chr7:25,166,387-25,166,387	rs2107123
-882 A->G	chr7: 25,165,837-25,165,837	--
-847 C->T	chr7: 25,165,802-25,165,802	--
-769 A->G	chr7:25,165,724-25,165,724	rs3846998
-719 DEL AT	chr7:25,165,674-25,165,675	rs5882962

\*Position calculée en considérant le début de la transcription comme étant +1

\*\* USCS, dbSNP build 131

--SNP non répertorié dans dbSNP 131

**Tableau XVIII : SNPs du promoteur de MAP4K3 avec leur position génomique.**

<b>SNP*</b>	<b>Position chromosomique</b>	<b>Numéro rs</b>
-1370 T>C	chr2: 39,665,589-39,665,589	--
-440 C>T	chr2: 39,664,659-39,664,659	rs56128332
-316 C>T	chr2:39,664,535-39,664,535	--

\*Position calculée en considérant le début de la transcription comme étant +1

\*\* USCS, dbSNP build 131

--SNP non répertorié dans dbSNP 131

**Tableau XIX : SNPs du promoteur de MAPK1 avec leur position génomique.**

<b>SNP*</b>	<b>Position chromosomique</b>	<b>Numéro rs</b>
-1334 A>T	chr22:22,223,303-22,223,303	rs9607343
-1040 del T	chr22: 22,223,009-22,223,009	--
-351 T>G	chr22:22,222,320-22,222,320	rs9607340
-134 A>T	chr22:22,222,103-22,222,103	rs9610505

\*Position calculée en considérant le début de la transcription comme étant +1

\*\* USCS, dbSNP build 131

--SNP non répertorié dans dbSNP 131

**Tableau XX : SNPs du promoteur de MAPK8 avec leur position génomique.**

<b>SNP*</b>	<b>Position chromosomique</b>	<b>Numéro rs</b>
-1937 G->A	chr10:49,607,750-49,607,750	rs11101312
-1695 C->T	chr10:49,607,992-49,607,992	rs17697972
-1049 G->A	chr10:49,608,638-49,608,638	rs10857561
-897 C->T	chr10:49,608,790-49,608,790	rs17697978
-674 DEL C	chr10:49,609,013-49,609,013	rs11332662
-509 A->G	chr10:49,609,178-49,609,178	rs17698002
-285 T->C	chr10:49,609,402-49,609,402	rs28395807
-109 C->A	chr10:49,609,578-49,609,578	rs3730154

\*Position calculée en considérant le début de la transcription comme étant +1

\*\* USCS, dbSNP build 131

**Tableau XXI : SNPs du promoteur de NOD1 avec leur position génomique.**

<b>SNP*</b>	<b>Position chromosomique</b>	<b>Numéro rs</b>
-1684 C>A	chr7:30,520,076-30,520,076	rs5743322
-972 C>T	chr7: 30,519,364-30,519,364	--
-638 C>T	chr7: 30,519,030-30,519,030	--
-210 G>A	chr7:30,518,602-30,518,602	rs2075816
-174 A>G	chr7:30,518,566-30,518,566	rs2066973
-146 G>C	chr7:30,518,538-30,518,538	rs7790806
-86 A>C	chr7:30,518,478-30,518,478	rs2108356
-85 A>T	chr7:30,518,477-30,518,477	rs2108355

\*Position calculée en considérant le début de la transcription comme étant +1

\*\* USCS, dbSNP build 131

--SNP non répertorié dans dbSNP 131

**Tableau XXII : Haplotypes fréquents de la région promotrice du gène BAG1 et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte de contrôles et de patients.**

Haplotype	-1725	-1710	-1023	-685	-453	Fréquence %		
	A>G	A>G	C>A	C>G	C>G	Cohorte	Contrôles	Patients LLA
<b>1</b>	G	A	C	C	C	23,75%	27,5 %	20,0 %
<b>3</b>	G	A	A	G	C	6,25%	5,0 %	7,5 %
<b>4</b>	G	G	C	C	C	68,75%	67,5 %	70,0 %

**Tableau XXIII : Haplotypes fréquents de la région promotrice du gène BAG3 et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte de contrôles et de patients.**

Haplotype	-1724	-856	-788	-787	-786	-212	Fréquence %		
	A>T	G>A	DEL T ou C	DEL A	DEL A	C>T	Cohorte	Contrôles	Patients LLA
<b>1</b>	A	G	T	A	A	C	55,0	60,5 %	45,5 %
<b>3</b>	A	A	-	-	-	T	33,3	31,6 %	36,4 %
<b>4</b>	T	G	T	A	A	C	10,0	7,9 %	13,6 %

**Tableau XXIV : Haplotypes fréquents de la région promotrice du gène CARD9 et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte de contrôles et de patients.**

Hap.	-2016	-1772	-1411	-1350	-1205	-1159	-1065	-1002	-	-	-	Fréquence %		
	A>G	T>C	T>C	G>A	C>T	C>T	A/G	A/G	362 A/G	320 C/T	134 C/T	Cohorte	Contrôles	Patient LLA
<b>1</b>	A	T	T	G	C	C	A	A	A	C	C	56,6 %	55,0 %	58,3 %
<b>6</b>	G	C	T	A	T	C	G	G	A	C	C	27,6 %	27,5 %	27,8 %
<b>8</b>	G	C	T	A	T	C	G	G	A	T	C	5,3 %	5,0 %	5,6 %

**Tableau XXV : Haplotypes fréquents de la région promotrice du gène CD47 et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte de contrôles et de patients.**

Haplotype	-1750	-1281	-1176	-343	-308	Fréquence %		
	C>G	G>A	C>G	C>T	C>T	Cohorte	Contrôles	Patients LLA
<b>1</b>	C	G	C	C	C	48,75%	52,5 %	45,0 %
<b>2</b>	C	A	C	C	C	22,50%	20,0 %	25,0 %
<b>4</b>	C	A	G	C	C	25,00%	25,0 %	25,0 %

**Tableau XXVI : Haplotypes fréquents de la région promotrice du gène CYCS et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte de contrôles et de patients.**

Haplotype	-1432	-882	-847	-769	-719	Fréquence %		
	A>G	A>G	C>T	A>G	AT/-	Cohorte	Contrôles	Patients LLA
<b>1</b>	A	A	C	A	-	22,5 %	25,0 %	20,0 %
<b>3</b>	G	A	C	A	-	27,5 %	25,0 %	30,0 %
<b>4</b>	G	A	C	G	-	45,0 %	45,0 %	45,0 %

**Tableau XXVII : Haplotypes fréquents de la région promotrice du gène MAP4K3 et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte de contrôles et de patients.**

Haplotype	-1370	-440 C>T	-316	Fréquence %		
	T>C		C>T	Cohorte	Contrôles	Patients LLA
<b>1</b>	T	C	C	59,3%	50,0%	67,4 %
<b>2</b>	T	T	C	38,4 %	50,0 %	28,3 %

**Tableau XXVIII : Haplotypes fréquents de la région promotrice du gène MAPK1 et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte de contrôles et de patients.**

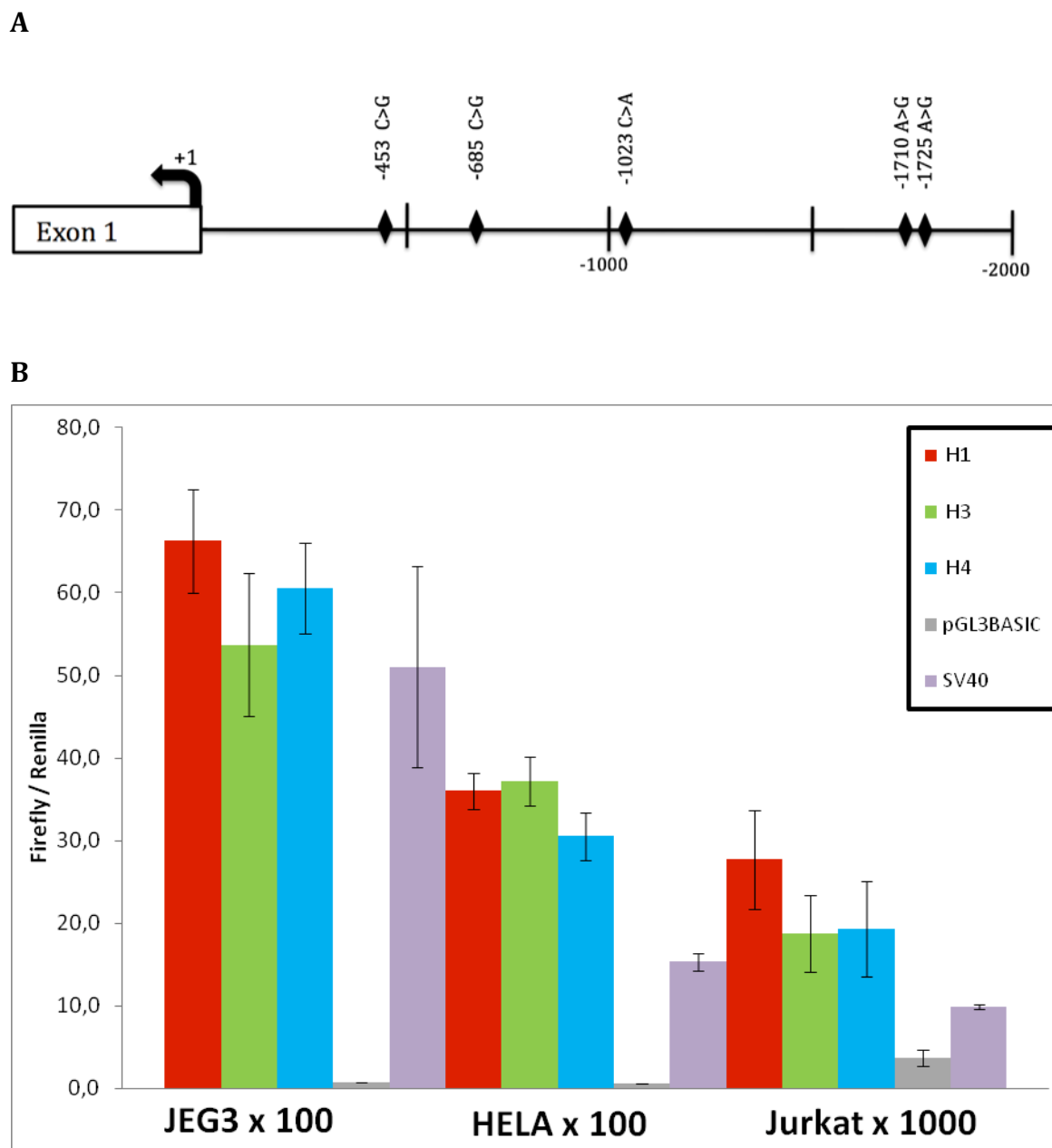
Haplotype	-1334	-1040	-351	-134	Fréquence %		
	A>T	DEL T	T>G	A>T	Cohorte	Contrôles	Patients LLA
<b>1</b>	A	--	G	T	46,0 %	46,9 %	44,4 %
<b>4</b>	A	T	T	A	44,0 %	43,8 %	44,4 %

**Tableau XXIX : Haplotypes fréquents de la région promotrice du gène MAPK8 et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte de contrôles et de patients.**

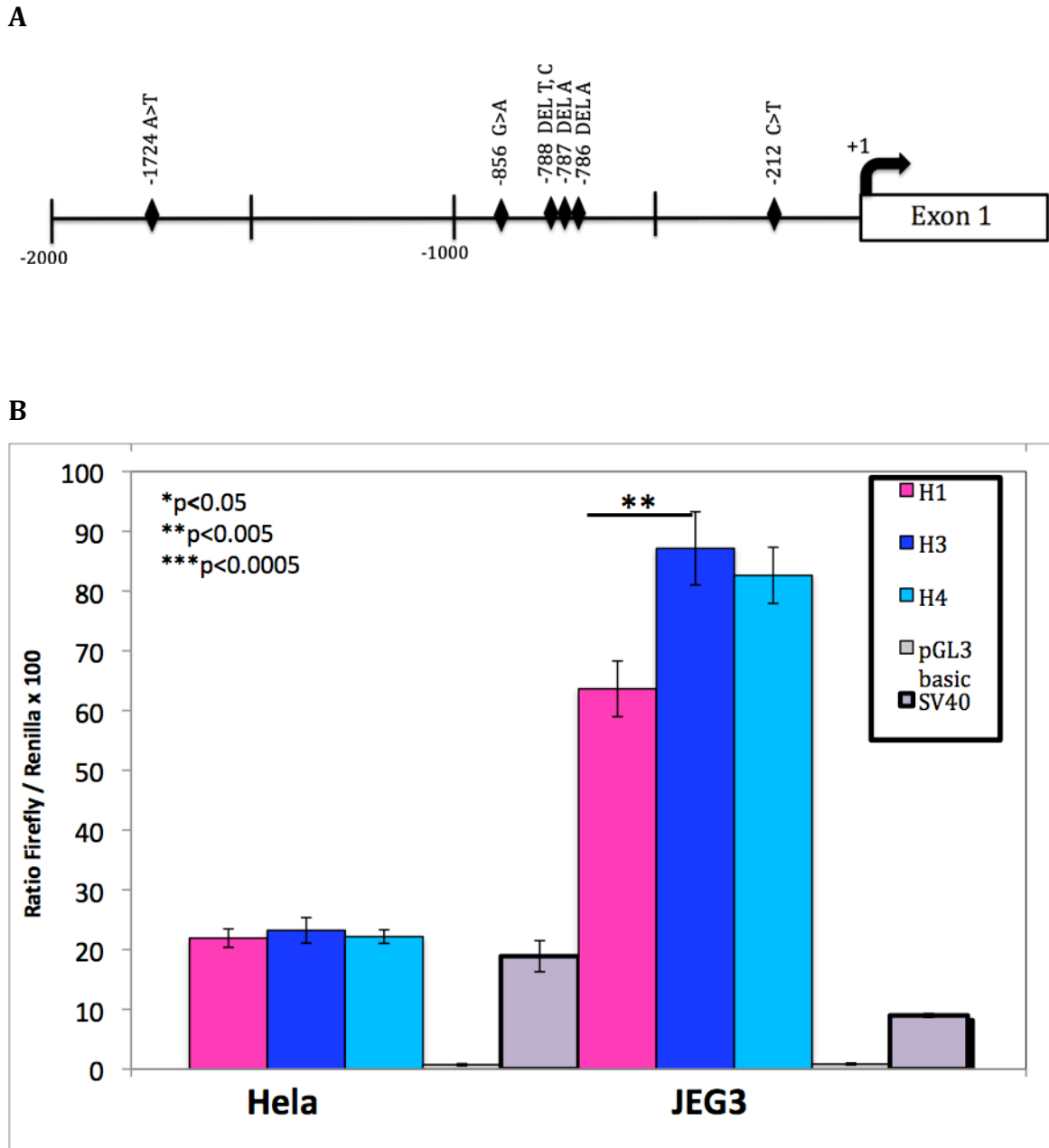
Haplotype	-1937	-1695	-1049	-897	-674	-509	-285	-109	Fréquence %		
	G>A	C>T	G>A	C>T	C/-	A/G	T>C	C>A	Cohorte	Contrôles	Patients LLA
<b>1</b>	G	C	G	C	C	A	T	A	57,50%	65,0 %	50,0%
<b>4</b>	G	C	A	C	-	A	T	A	20,00%	15,0 %	25,0 %
<b>5</b>	G	T	G	C	-	A	T	A	6,25%	5,0 %	7,5 %
<b>6</b>	A	C	A	C	-	A	T	A	10,00%	7,5 %	12,5 %

**Tableau XXX : Haplotypes fréquents de la région promotrice du gène NOD1 et leur fréquence allélique observée dans notre cohorte de contrôles et de patients.**

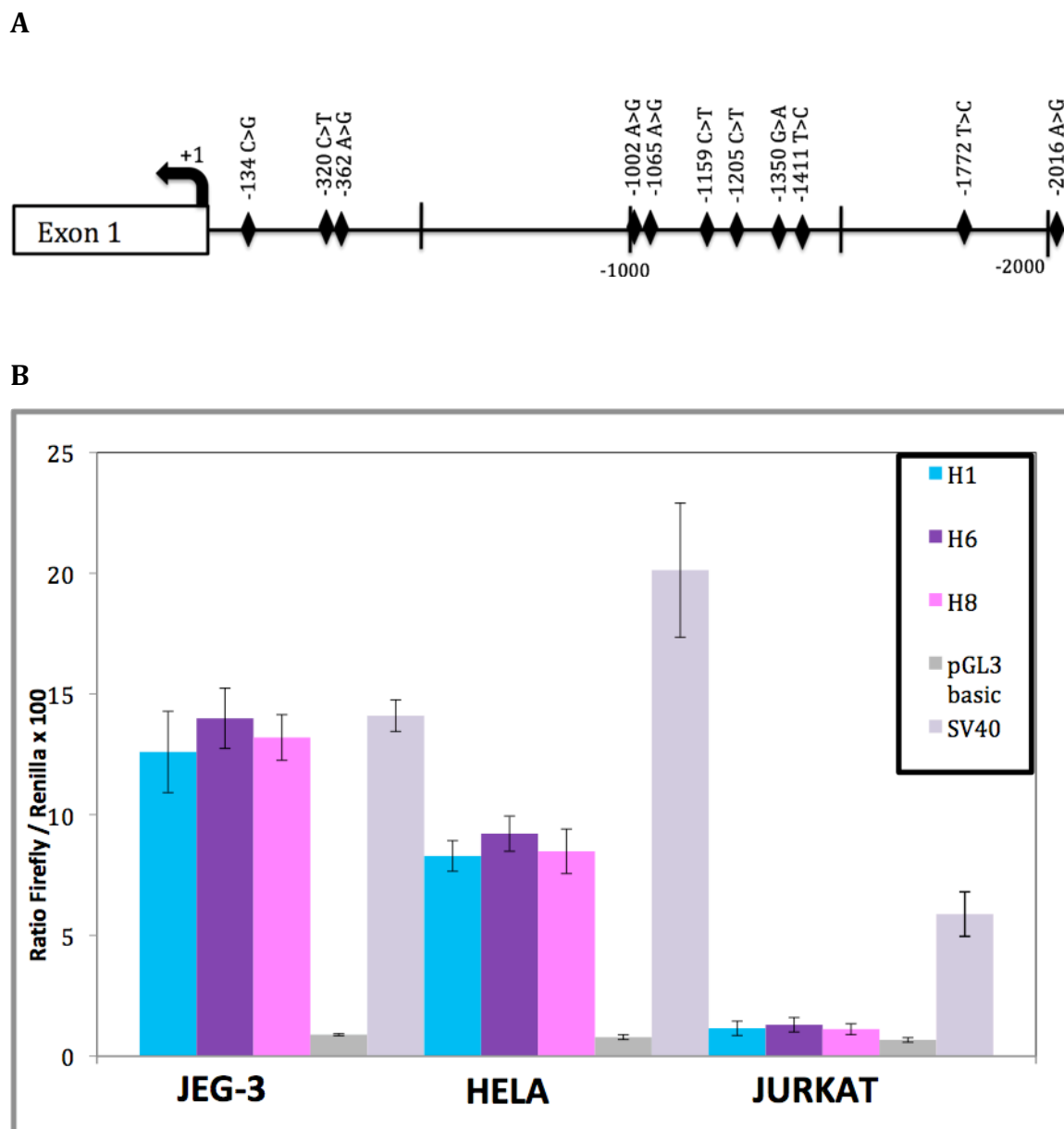
Haplotype	-1684	-972	-638	-210	-174	-146	-86	-85	Fréquence %		
	C>A	C>T	C>T	G>A	A/G	G>C	A>C	A>T	Cohorte	Contrôles	Patients LLA
<b>1</b>	C	C	C	G	A	G	A	A	53,0 %	50,0 %	60,0 %
<b>5</b>	C	C	T	A	G	G	A	A	21,0 %	17,9 %	30,0 %
<b>7</b>	A	C	T	G	A	C	A	A	16,0 %	17,9 %	10,0 %



**Figure 1. (A) Schéma du promoteur du gène BAG1. (B) Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur de BAG1.** La transfection est faite dans 3 lignées cellulaires différentes (JEG3, HeLa et Jurkat). Les résultats illustrés sont d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés comme ratio de la Firefly / Renilla multiplié par 100 ou 1000 selon indication. Le vecteur pGL3basic seul est utilisé comme contrôle négatif et le vecteur SV40 est utilisé comme contrôle positif.



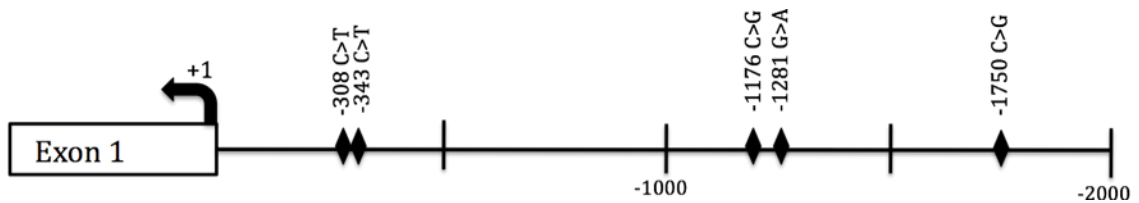
**Figure 2. (A) Schéma du promoteur du gène BAG3. (B) Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur de BAG3.** La transfection est faite dans 2 lignées cellulaires différentes (HeLa et JEG3). Les résultats illustrés sont d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés comme ratio de la Firefly / Renilla multiplié par 100. Le vecteur pGL3basic seul est utilisé comme contrôle négatif et le vecteur SV40 est utilisé comme contrôle positif.



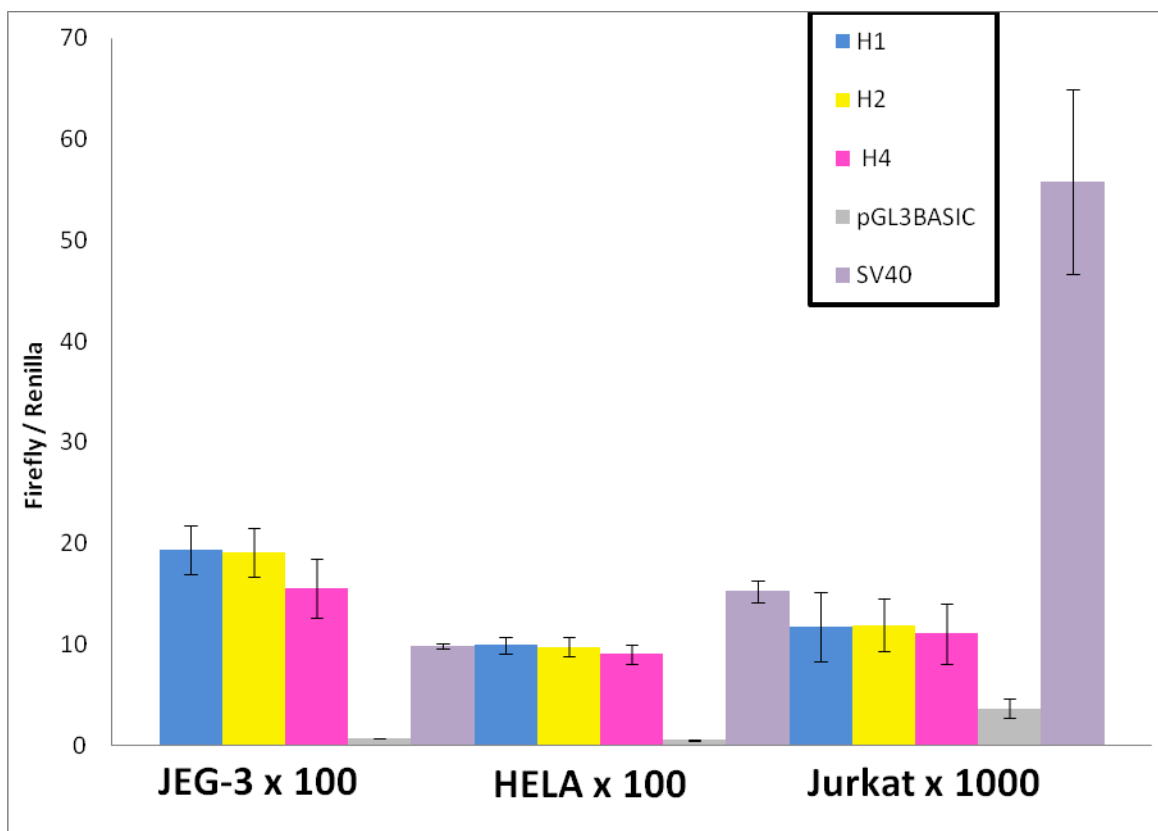
**Figure 3. (A) Schéma du promoteur du gène CARD9. (B) Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur de CARD9.** La transfection est faite dans 3 lignées cellulaires différentes (HeLa, JEG3 et Jurkat). Les résultats illustrés sont d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés comme ratio de la Firefly / Renilla multiplié par 100. Le vecteur pGL3basic seul est utilisé comme contrôle négatif et le vecteur SV40 est utilisé comme contrôle positif.



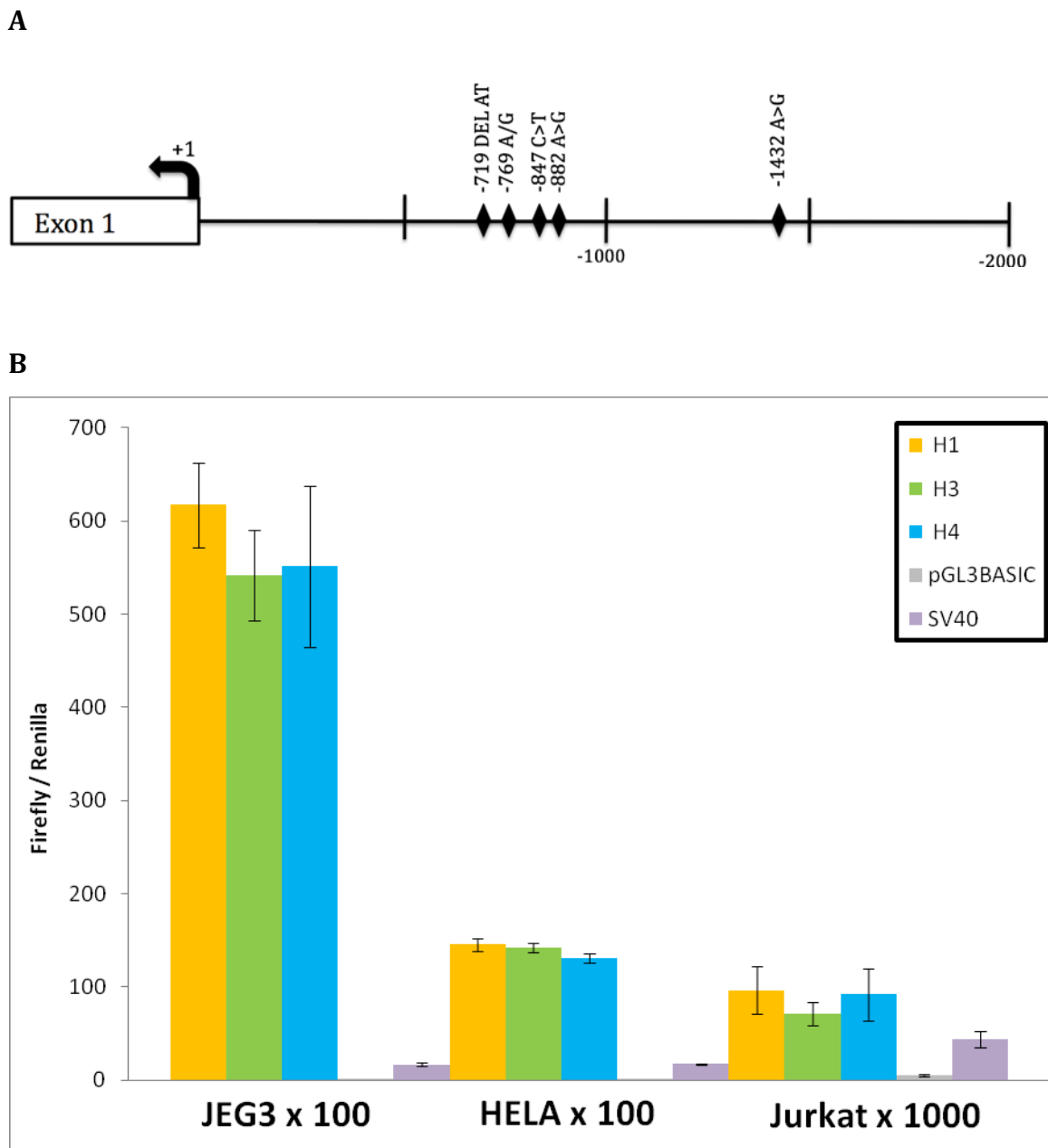
A



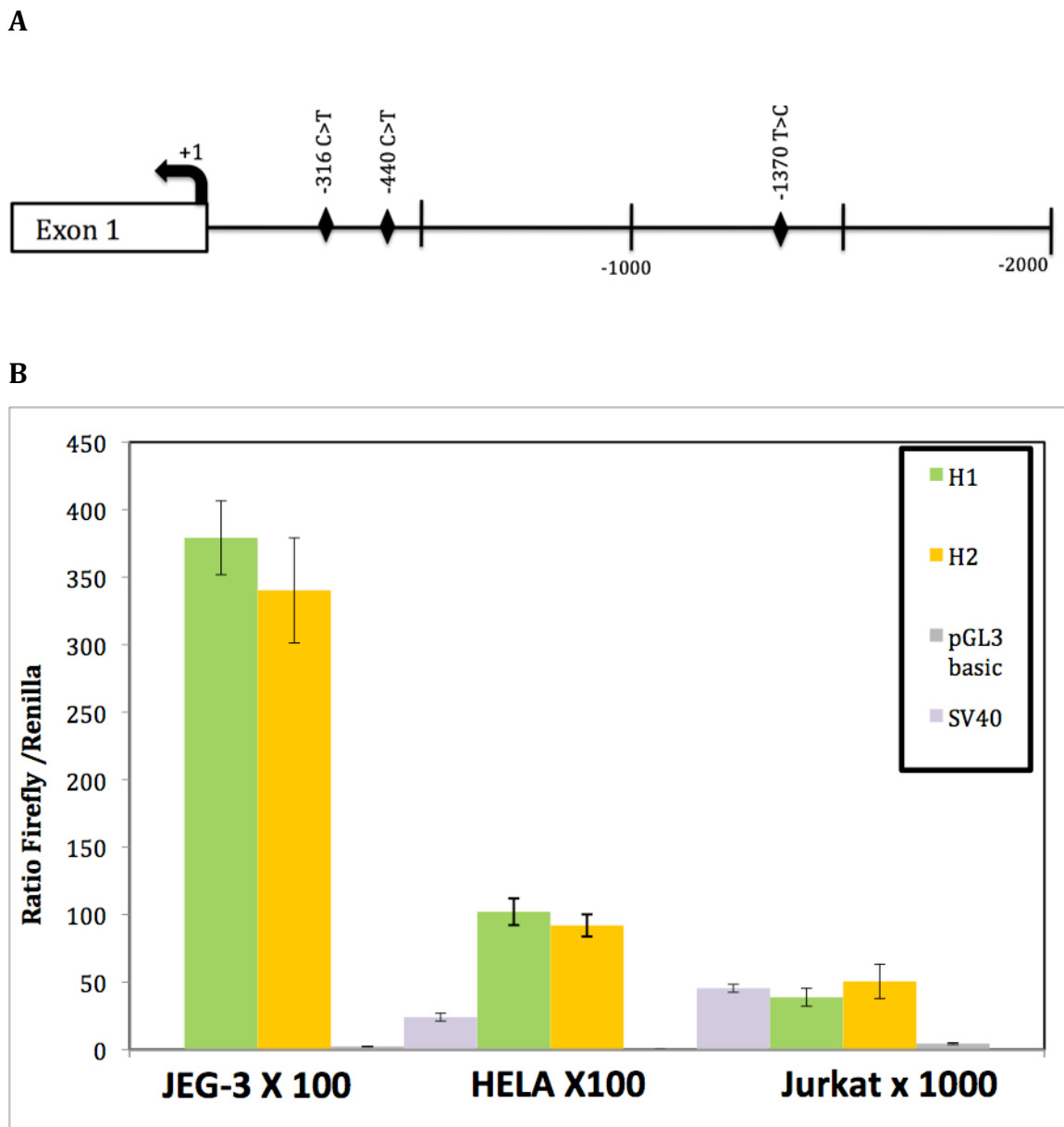
B



**Figure 4. (A) Schéma du promoteur du gène CD47. (B) Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur de CD47.** La transfection est faite dans 3 lignées cellulaires différentes (JEG3, HeLa et Jurkat). Les résultats illustrés sont d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés comme ratio de la Firefly / Renilla multiplié par 100 ou 1000 selon indication. Le vecteur pGL3basic seul est utilisé comme contrôle négatif et le vecteur SV40 est utilisé comme contrôle positif.

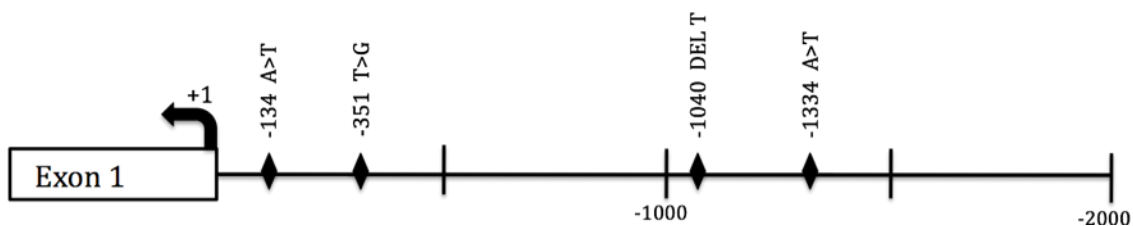


**Figure 5. (A) Schéma du promoteur du gène CYCS. (B) Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur de CYCS.** La transfection est faite dans 3 lignées cellulaires différentes (JEG3, HeLa et Jurkat). Les résultats illustrés sont d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés comme ratio de la Firefly / Renilla multiplié par 100 ou 1000 selon indication. Le vecteur pGL3basic seul est utilisé comme contrôle négatif et le vecteur SV40 est utilisé comme contrôle positif.

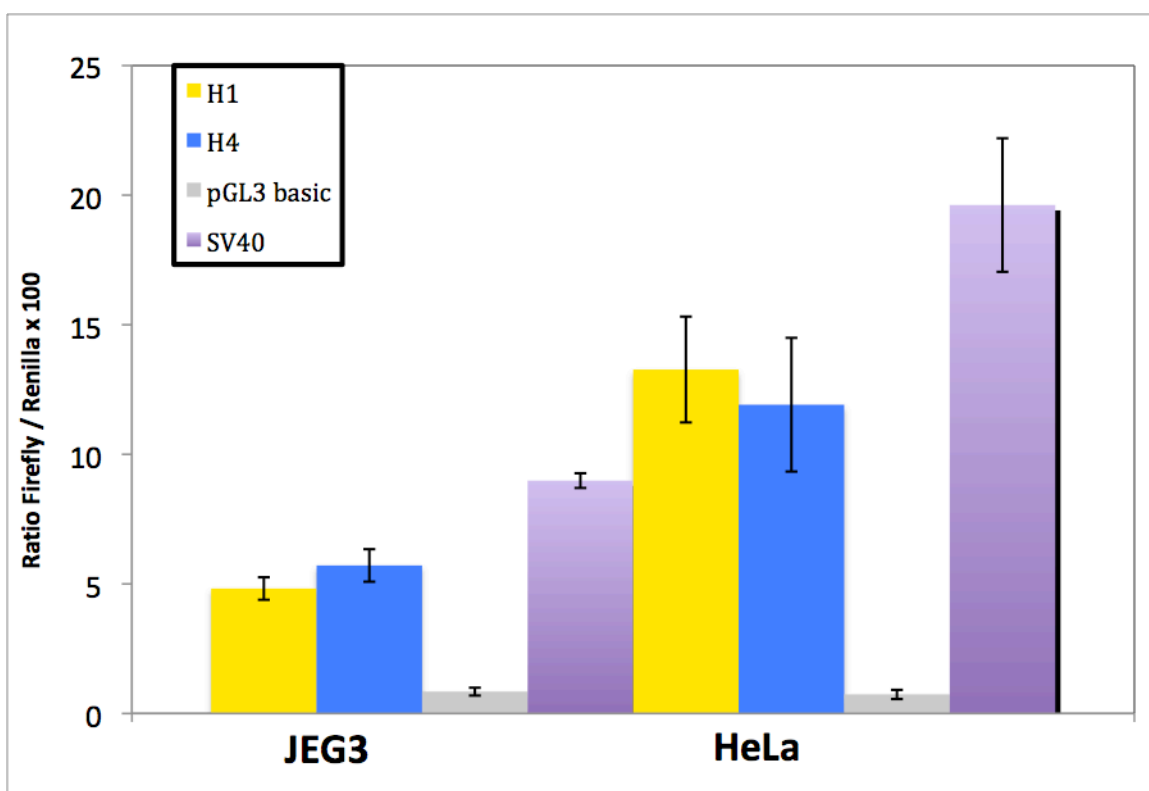


**Figure 6. (A) Schéma du promoteur du gène MAP4K3. (B) Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur de MAP4K3.** La transfection est faite dans 3 lignées cellulaires différentes (HeLa, JEG3 et Jurkat). Les résultats illustrés sont d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés comme ratio de la Firefly / Renilla multiplié par 100 ou 1000 selon indication. Le vecteur pGL3basic seul est utilisé comme contrôle négatif et le vecteur SV40 est utilisé comme contrôle positif.

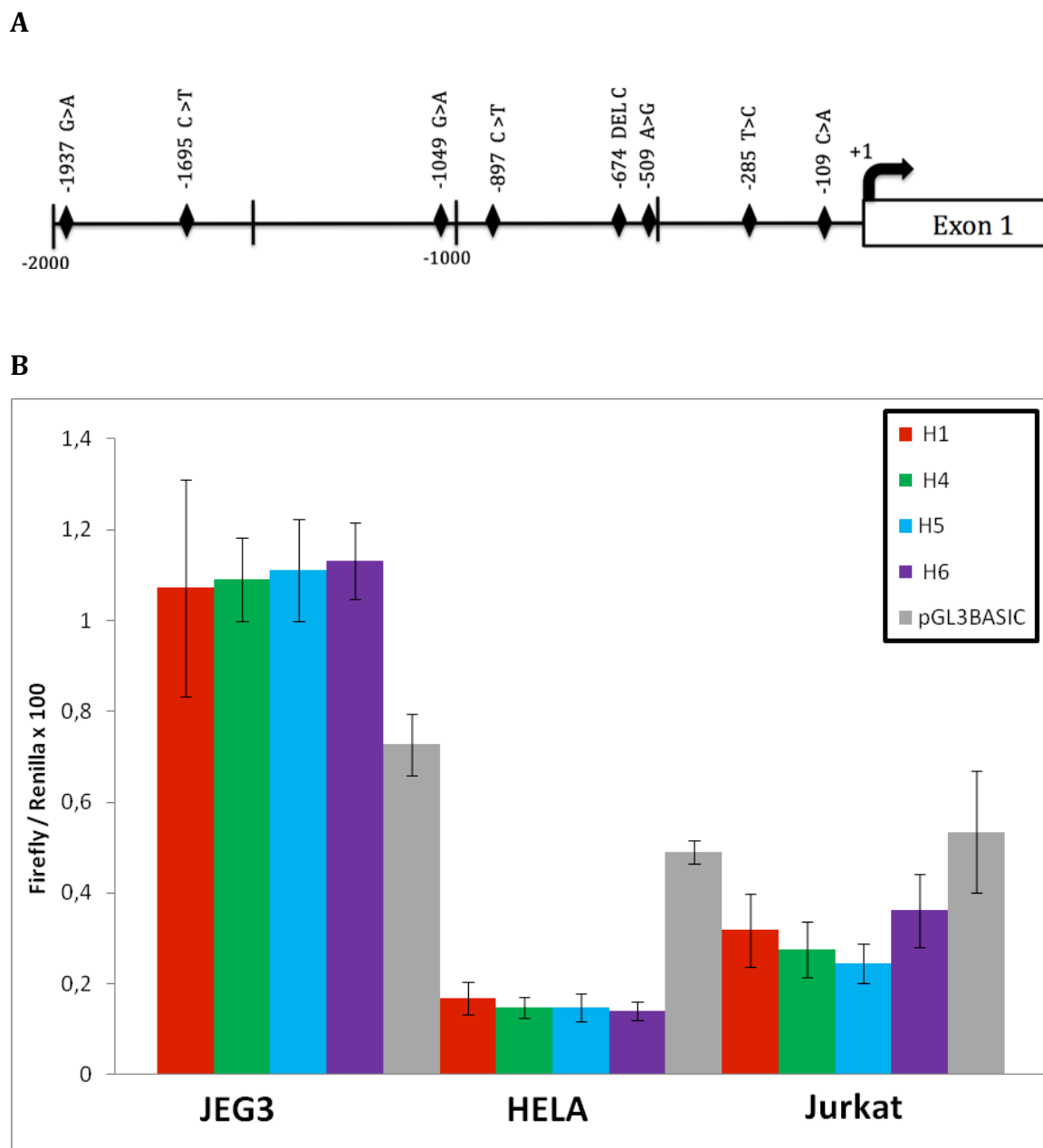
A



B

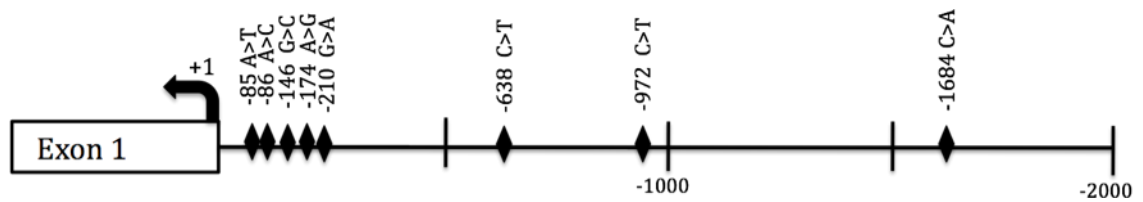


**Figure 7. (A) Schéma du promoteur du gène MAPK1. (B) Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur de MAPK1.** La transfection est faite dans 2 lignées cellulaires différentes (JEG3 et HeLa). Les résultats illustrés sont d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés comme ratio de la Firefly / Renilla multiplié par 100. Le vecteur pGL3basic seul est utilisé comme contrôle négatif et le vecteur SV40 est utilisé comme contrôle positif.

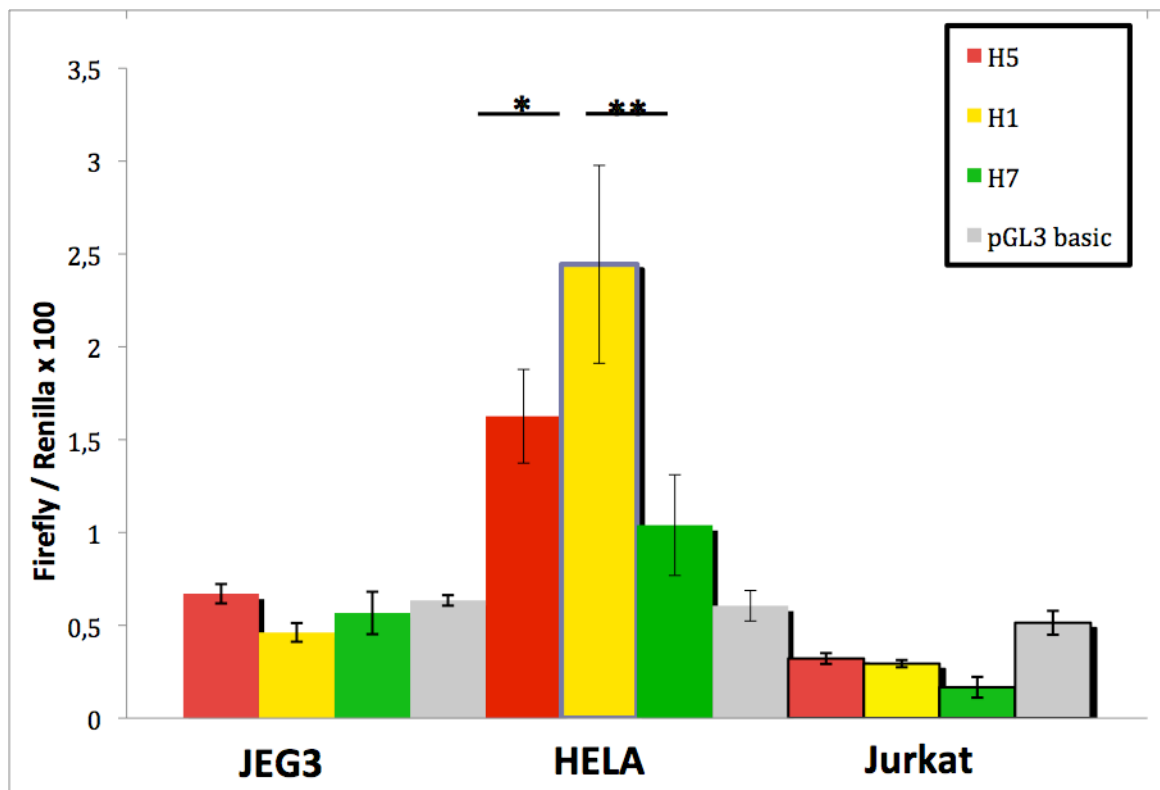


**Figure 8. (A) Schéma du promoteur du gène MAPK8. (B) Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur de MAPK8.** La transfection est faite dans 3 lignées cellulaires différentes (JEG3, HeLa et Jurkat). Les résultats illustrés sont d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés comme ratio de la Firefly / Renilla multiplié par 100. Le vecteur pGL3basic seul est utilisé comme contrôle négatif et le vecteur SV40 comme contrôle positif (non illustré).

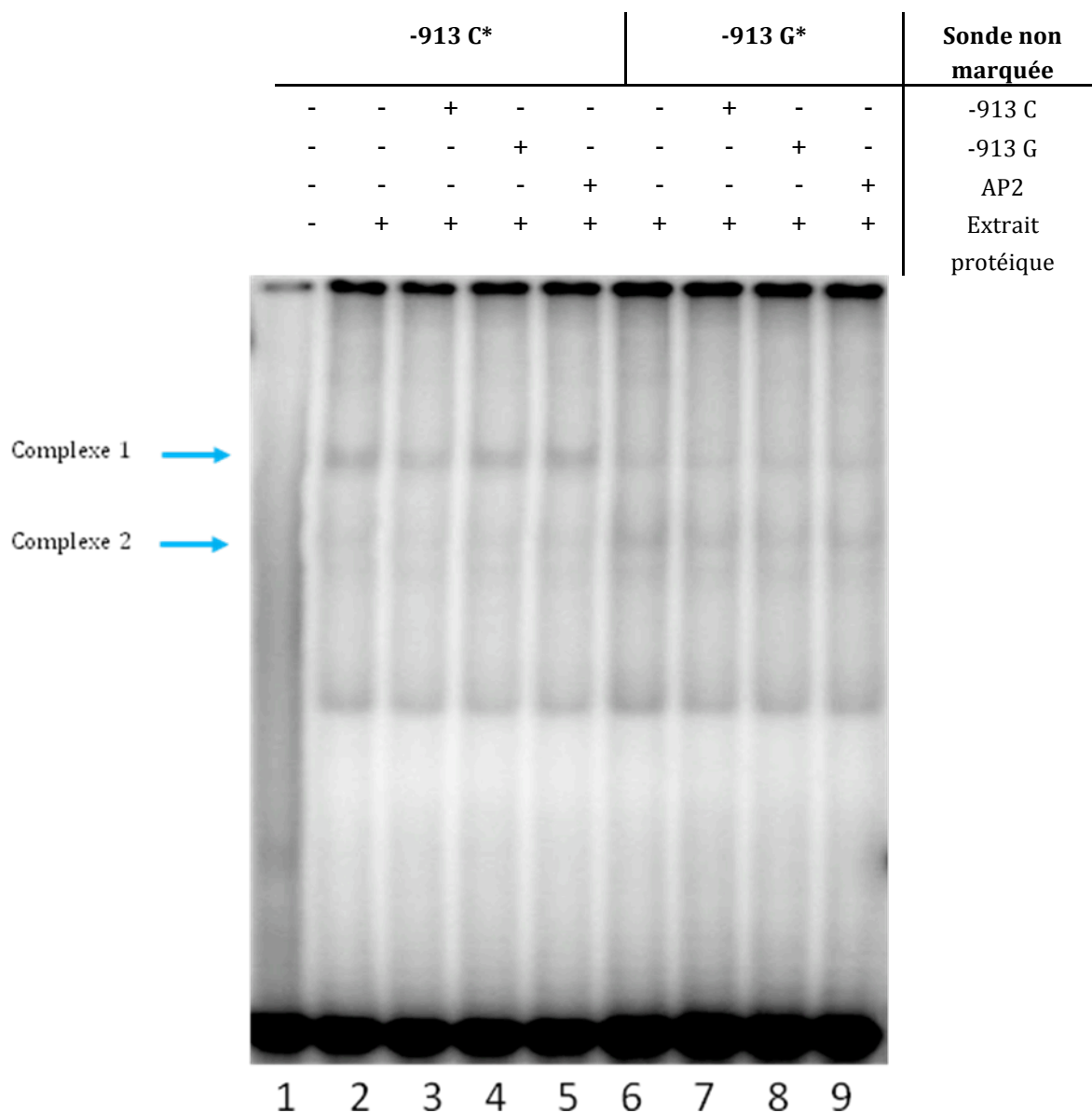
A



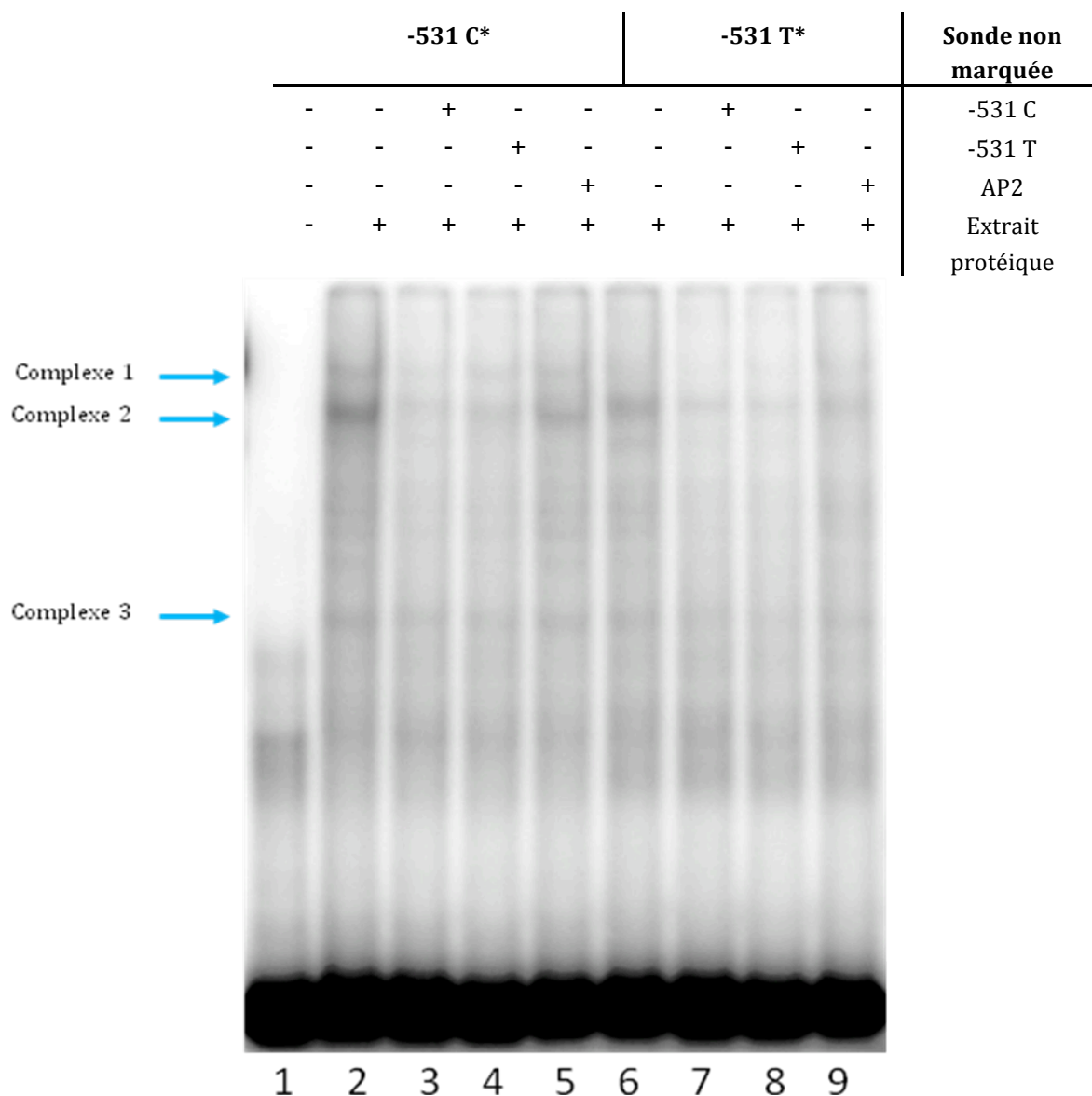
B



**Figure 9. (A) Schéma du promoteur du gène NOD1. (B) Impact fonctionnel des haplotypes du promoteur de NOD1.** La transfection est faite dans 2 lignées cellulaires différentes (JEG3 et HeLa). Les résultats illustrés sont d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes. Les résultats sont exprimés comme ratio de la Firefly / Renilla multiplié par 100 ou 1000 selon indication. Le vecteur pGL3basic seul est utilisé comme contrôle négatif et le vecteur SV40 comme contrôle positif (non illustré).

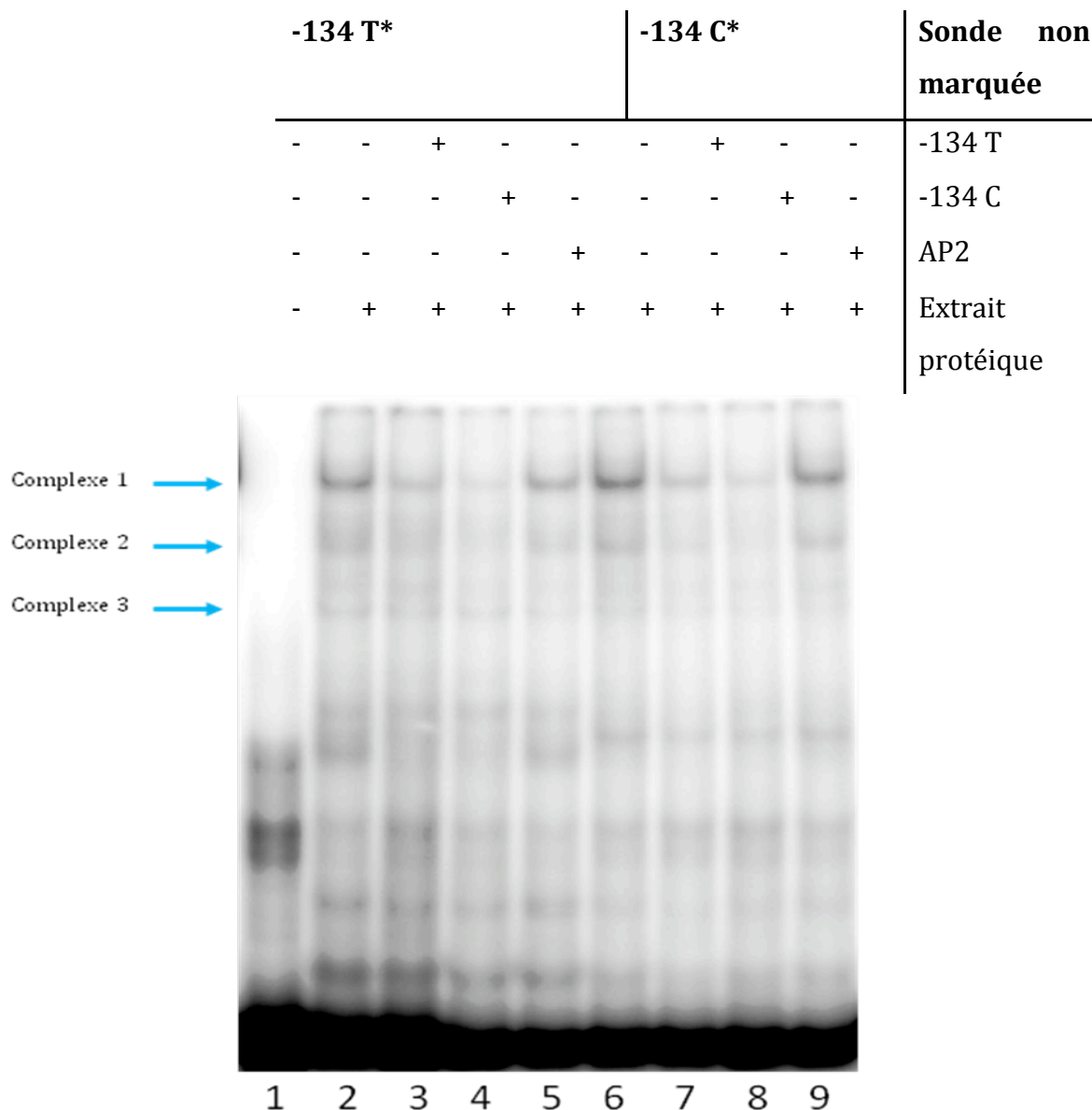


**Figure 10. Retard sur gel montrant une liaison différentielle au niveau du rSNP -913 C>G d'YWHAB.** Des oligonucléotides double brins et marqués (\*) correspondant aux différents allèles du SNP -913 C>G sont incubées avec l'extrait nucléaire de cellules JURKAT. Les puits 1 à 5 représentent la sonde marqué -913 C alors que les puits 6 à 9 représentent la sonde -913G. Les sondes non-marquées utilisées pour compétitionner la liaison de protéines à l'ADN sont en excès dans un ratio de 50/1. Des compétiteurs spécifiques correspondant aux sondes non-marquées des différents allèles sont utilisés dans les puits 3, 4, 7, 8 alors qu'un compétiteur non spécifique est utilisé dans les puits 5 et 9. Les séquences des sondes utilisées sont décrites dans Tableau XI en annexe. Les sondes non liées migrent rapidement au bas du gel alors que les complexes protéines-sondes migrent moins rapidement. Les complexes spécifiques sont identifiés par une flèche rouge tandis que les complexes non-spécifiques sont identifiés par une flèche bleue.

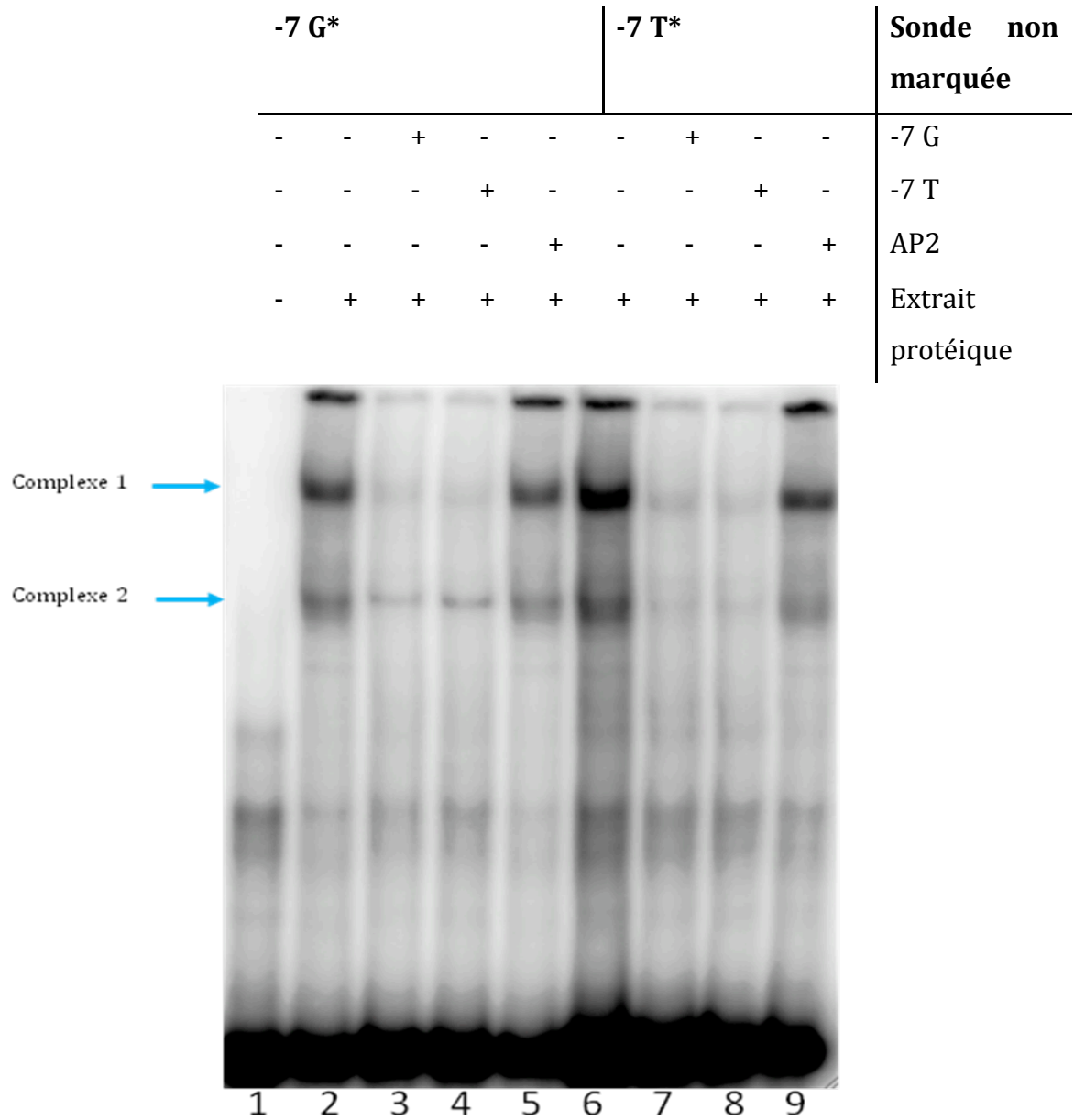


**Figure 11. Retard sur gel montrant une liaison différentielle au niveau du rSNP -531 C>T d'YWHAB.** Des oligonucléotides double brins et marqués (\*) correspondant aux différents allèles du SNP -531 C>T sont incubées avec l'extrait nucléaire de cellules JEG3. Les puits 1 à 5 représentent la sonde marqué -531 C alors que les puits 6 à 9 représentent la sonde -531 T. Les sondes non-marquées utilisées pour compétitionner la liaison de protéines à l'ADN sont en excès dans un ratio de 50/1. Des compétiteurs spécifiques correspondant aux sondes non-marquées des différents allèles sont utilisés dans les puits 3, 4, 7, 8 alors qu'un compétiteur non spécifique est utilisé dans les puits 5 et 9. Les séquences des sondes utilisées sont décrites dans le Tableau XI en annexe. Les sondes non liées migrent rapidement au bas du gel alors que les complexes protéines-sondes migrent moins rapidement. Les complexes spécifiques sont identifiés par une flèche rouge tandis que les complexes non-spécifiques sont identifiés par une flèche bleue.





**Figure 12. Retard sur gel montrant une liaison différentielle au niveau du rSNP -134 T>C d'YWHAB.** Des oligonucléotides double brins et marqués (\*) correspondant aux différents allèles du SNP -134 T>C sont incubées avec l'extrait nucléaire de cellules HeLa. Les puits 1 à 5 représentent la sonde marqué -134 T alors que les puits 6 à 9 représentent la sonde -134 C. Les sondes non-marquées utilisées pour compétitionner la liaison de protéines à l'ADN sont en excès dans un ratio de 50/1. Des compétiteurs spécifiques correspondant aux sondes non-marquées des différents allèles sont utilisés dans les puits 3, 4, 7, 8 alors qu'un compétiteur non spécifique est utilisé dans les puits 5 et 9. Les séquences des sondes utilisées sont décrites dans le Tableau XI en annexe. Les sondes non liées migrent rapidement au bas du gel alors que les complexes protéines-sondes migrent moins rapidement. Les complexes spécifiques sont identifiés par une flèche rouge tandis que les complexes non-spécifiques sont identifiés par une flèche bleue.



**Figure 13. Retard sur gel montrant une liaison différentielle au niveau du rSNP -7 G>T d'YWHAB.** Des oligonucléotides double brins et marqués (\*) correspondant aux différents allèles du SNP -7 G>T sont incubées avec l'extrait nucléaire de cellules JEG3. Les puits 1 à 5 représentent la sonde marqué -7 G alors que les puits 6 à 9 représentent la sonde -7 T. Les sondes non-marquées utilisées pour compétitionner la liaison de protéines à l'ADN sont en excès dans un ratio de 50/1. Des compétiteurs spécifiques correspondant aux sondes non-marquées des différents allèles sont utilisés dans les puits 3, 4, 7, 8 alors qu'un compétiteur non spécifique est utilisé dans les puits 5 et 9. Les séquences des sondes utilisées sont décrites dans le Tableau XI en annexe. Les sondes non liées migrent rapidement au bas du gel alors que les complexes protéines-sondes migrent moins rapidement. Les complexes spécifiques sont identifiés par une flèche rouge tandis que les complexes non-spécifiques sont identifiés par une flèche bleue.

