



HAL
open science

Identification de gènes impliqués dans le développement des lymphocytes cutanés primitifs CD30+

Emilie Loreau

► **To cite this version:**

Emilie Loreau. Identification de gènes impliqués dans le développement des lymphocytes cutanés primitifs CD30+. Immunologie. Université Victor Segalen - Bordeaux II, 2003. Français. NNT: . tel-00011307

HAL Id: tel-00011307

<https://theses.hal.science/tel-00011307>

Submitted on 10 Feb 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2003

Thèse n°1017

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences Biologiques et Médicales

Option : Biologie Santé

Présentée et soutenue publiquement

Le lundi 26 mai 2003

par **LOREAU Emilie**

Née le 07 novembre 1974 à Paris (14^{ème})

**Identification de gènes impliqués dans le développement des
Lymphomes Cutanés Primitifs CD30+**

Membres du jury

Pr Jacques Emile Bonnet	Professeur à l'université de Bordeaux 2	Président
Pr Gilles Favre	Professeur à l'université de Toulouse	Rapporteur
Pr Pierre Brousset	Professeur à l'université de Toulouse	Rapporteur
Pr Jean Philippe Merlio	Professeur à l'université de Bordeaux 2	Directeur de thèse

Sommaire

1	INTRODUCTION.....	13
1.1	Gènes et cancers.....	13
1.1.1	Oncogènes ou proto-oncogènes.....	13
1.1.2	Gènes suppresseurs de tumeur ou anti-oncogènes.....	16
1.2	Lymphomes.....	18
1.2.1	Définition des lymphomes.....	18
1.2.2	Lymphomes cutanés primitifs	18
1.2.3	Les lymphoproliférations CD30+.....	19
1.3	Etude du profil d'expression des gènes	27
1.3.1	Approches ciblées	28
1.3.2	Approches globales	29
2	OBJECTIF DE LA THESE.....	33
2.1	Intérêt.....	33
2.2	Démarche scientifique.....	34
3	REALISATION DES BANQUES DE SOUSTRACTION	35
3.1	Introduction.....	35
3.2	Extraction des ARN totaux.....	38
3.3	PCR Raf : absence d'ADN génomique dans les extractions d'ARN.....	41
3.4	Synthèse des ADNc par la technique SMART ⁷⁷	42
3.5	Digestion par <i>RsaI</i>.....	44
3.6	Ligation des adaptateurs	45
3.7	Hybridations et amplifications.....	48
3.7.1	Hybridation 1 et 2.....	49
3.7.2	PCR 1 et 2	49
3.8	Efficacité de la soustraction.....	51
3.9	Clonage.....	52
3.10	Commentaire des résultats	53
4	CRIBLAGE DES BANQUES ET SEQUENÇAGE	54
4.1	Introduction.....	54
4.2	Sonde radiomarquée	54
4.3	Criblage à partir des clones bactériens	55
4.3.1	Réalisation des membranes	55

4.3.2	Hybridation des sondes radioactives.....	56
4.4	Criblage à partir des ADNc soustraits.....	58
4.5	Séquençage.....	59
4.6	Commentaire des résultats	64
4.6.1	SSH 1 et SSH 7.....	64
4.6.2	SSH 2.....	68
4.6.3	SSH 8.....	70
5	ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES CANDIDATS	71
5.1	Introduction	71
5.2	Sélection et étude des gènes candidats potentiellement surexprimés	72
5.2.1	Par dot blot	72
5.2.2	Par intérêt bibliographique	74
5.3	Analyse de l'expression des gènes candidats	75
5.3.1	PCR en temps réel	75
5.3.2	Choix d'un gène de ménage	79
5.3.3	Résultats des gènes sélectionnés par Dot Blot.....	82
5.3.4	Résultats des gènes sélectionnés par intérêt bibliographique	85
5.3.5	Microdissection et RT-PCR en temps réel	88
5.4	Commentaires des résultats.....	89
5.4.1	Kératine 6 (NM_005554)	89
5.4.2	THW (AJ251830).....	90
5.4.3	p120 caténine (AF062343).....	93
5.4.4	SPARC (J03040)	95
5.4.5	PTTG1 (NM_004219).....	98
5.4.6	Humanine (AY029066).....	100
5.4.7	CIN 85 (AF230904).....	103
5.4.8	Bcl11B (NM_022898).....	107
5.4.9	CD30, CD30 variant (M83554) et CD30 L	112
6	CONCLUSION GENERALE.....	114
7	ANNEXE : PROTOCOLES	119
7.1	Coupe au Cryostat et coloration	119
7.2	Préparation des lymphocytes activés à la PHA.....	119
7.3	Microdissection des échantillons	120
7.3.1	Microdissection	120
7.3.2	Extraction des ARN.....	120
7.3.3	Transcription inverse	121
7.4	Extraction des ARN.....	122
7.4.1	Solution D.....	122
7.4.2	Trizol (Invitrogen Life Technologies).....	123
7.4.3	PCR Raf.....	124
7.5	Réalisation d'une banque de soustraction	125
7.5.1	Synthèse de l'ADNc : technique SMART	125
7.5.2	Digestion des ADNc par <i>Rsa</i> I.....	128

7.5.3	Ligation des adaptateurs	130
7.5.4	Hybridations	132
7.5.5	Amplifications par PCR	134
7.5.6	Contrôle de l'efficacité de soustraction par PCR	135
7.5.7	Clonage du produit de soustraction	136
7.6	Criblage des banques de soustraction	138
7.6.1	A partir de clones bactériens	138
7.6.2	A partir des ADNc soustraits.....	139
7.6.3	Réalisation des sondes radio-marquées	140
7.6.4	Hybridation des sondes sur les membranes	142
7.7	Analyse des séquences.....	143
7.7.1	Mini préparation d'ADN plasmidique.....	143
7.7.2	Séquençage.....	144
7.7.3	Analyse bio-informatique des séquences	145
7.7.4	Clonalité B : PCR Ca1 / Ca2	145
7.8	Quantification par RT-PCR en temps réel	146
7.8.1	Transcription inverse : technique hexamère	146
7.8.2	PCR en temps réel	147
7.8.3	Séquences des amorces utilisées	148
7.9	Adresses des fournisseurs	149
8	ANNEXE : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151

Liste des figures

Figure 1 : Exemple d'une accumulation de mutations dans les cancers du colon.....	12
Figure 2 : Schéma du promoteur du gène CD30 ³⁰	19
Figure 3 : Voies de signalisations associées au CD30.....	21
Figure 4 : Coupe de biopsie cutanée - LCP CD30+ (A) - Peau saine (B).....	35
Figure 5 : Qualité des ARN.....	38
Figure 6 : Schéma de la PCR Raf.....	41
Figure 7 : Séquences des amorces Raf.....	41
Figure 8 : Test d'absence d'ADN génomique dans une préparation d'ARN.....	42
Figure 9 : Amorces utilisées lors de la synthèse de l'ADNc - technique SMART.....	43
Figure 10 : Choix du nombre de cycles lors de la LD-PCR.....	43
Figure 11 : Contrôle de la digestion par <i>RsaI</i>	44
Figure 12 : Adaptateur lié à l'ADNc tumoral.....	45
Figure 13 : Ligation des adaptateurs - schéma d'une molécule d'ADNc après ligation avec l'adaptateur 1 - position des amorces G3PDH 3' et PCR 1.....	46
Figure 14 : Ligation des adaptateurs - schéma d'une molécule d'ADNc après ligation avec l'adaptateur 2R - position des amorces G3PDH 5' et PCR 1.....	46
Figure 15 : Ligation des adaptateurs - gel d'agarose 2 % w/v.....	46
Figure 16 : Hybridation soustractive suppressive.....	48
Figure 17 : Amplification des produits de soustraction.....	50
Figure 18 : Efficacité de soustraction - PCR semi-quantitative G3PDH.....	51
Figure 19 : Membrane B pour la SSH 1 - film d'autoradiographie.....	56
Figure 20 : Membrane A pour la SSH 2 - film d'autoradiographie.....	57
Figure 21 : Membranes H3 a et b pour la SSH 8 - film d'autoradiographie.....	58
Figure 22 : Séquence du gène de l'ARN 18S humain (M10098).....	67
Figure 23 : Etude de la clonalité B - Echantillons de la SSH 2.....	69
Figure 24 : Membranes bilan - film d'autoradiographie.....	72
Figure 25 : Représentation du programme de RQ-PCR.....	75
Figure 26 : Courbe de fusion - RQ-PCR.....	76
Figure 27 : Cinétique - RQ-PCR.....	77
Figure 28 : Gamme de dilution - RQ-PCR.....	78
Figure 29 : Choix d'un gène de ménage - Ct des quatre gènes.....	79
Figure 30 : Analyse des résultats avec la bêta actine comme référence.....	80
Figure 31 : Analyse des résultats avec PO comme référence.....	80
Figure 32 : Analyse des résultats avec la GAPDH comme référence.....	81
Figure 33 : Analyse des résultats avec la G6PD comme référence.....	81
Figure 34 : Dot Blot Kératine 6 - Criblage de la SSH 1 (A) - Criblage SSH 7 (B).....	89
Figure 35 : Dot Blot THW - Criblage de la SSH 1 (A) - Sélection des gènes (B).....	90
Figure 36 : Dot Blot p120 - Criblage de la SSH 1.....	93
Figure 37 : Dot Blot SPARC - Criblage de la SSH 2 (A) - Sélection des gènes (B).....	95
Figure 38 : Dot Blot PTTG1 - Criblage de la SSH 8.....	98
Figure 39 : Dot Blot Humanine - Criblage de la SSH 1 (A) - Sélection des gènes (B).....	100
Figure 40 : Dot Blot CIN 85 - Criblage de la SSH 2.....	103
Figure 41 : Structures des protéines CIN 85 et CMS ¹⁵¹	104
Figure 42 : Dot Blot Bcl11B - Criblage de la SSH 8.....	107
Figure 43 : Schéma des protéines Bcl11A et Bcl11B ¹⁵⁹	108

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des LCP CD30+	23
Tableau 2 : Différences entre la PLy de type A et le LCP CD30+	24
Tableau 3 : Différences entre le lymphome ganglionnaire CD30+ et le LCP CD30+	26
Tableau 4 : Banques de soustraction	36
Tableau 5 : Bilan des extractions d'ARN	40
Tableau 6 : Efficacité de ligation des différentes SSH	47
Tableau 7 : Efficacité de soustraction des différentes SSH	51
Tableau 8 : Nombre de clones générés par clonage des différentes SSH	52
Tableau 9 : Pourcentages d'incorporation du radio élément	54
Tableau 10 : Nom des membranes pour les SSH 1 et 2	55
Tableau 11 : Nombre de clones sélectionnés - SSH 1	56
Tableau 12 : Pourcentages de clones sélectionnés pour les différentes SSH	59
Tableau 13 : Séquençage des clones de la SSH 1 - blast nr	60
Tableau 14 : Séquençage des clones de la SSH 2 - blast nr	61
Tableau 15 : Séquençage des clones de la SSH 7 - blast nr	62
Tableau 16 : Séquençage des clones de la SSH 8 - blast nr	63
Tableau 17 : Redondance des différentes SSH	64
Tableau 18 : Gènes N° 1 à 22 - Sélection par Dot Blot	73
Tableau 19: Gènes N° 23 à 40 - Sélection par intérêt bibliographique	74
Tableau 20 : Séquences des amorces de RQ-PCR pour les gènes de ménages	79
Tableau 21 : Conditions de RQ-PCR	83
Tableau 22 : Résultats de RQ-PCR - gènes sélectionnés par dot blot (N° 1 à 22)	84
Tableau 23 : Conditions de RQ-PCR	85
Tableau 24 : Résultats de RQ-PCR - seconde série	86
Tableau 25 : Résultats de RQ-PCR - valeurs d'expression	87
Tableau 26 : Taux d'expression de THW et de la kératine 6 - microdissection	88
Tableau 27 : Protéines interagissant avec CIN 85 ¹⁵¹	105
Tableau 28 : Programme de la PCR Raf	124
Tableau 29 : Synthèse du second brin d'ADNc - Programme de la PCR	126
Tableau 30 : Test de l'efficacité de ligation - préparation des tubes - volume en µL	131
Tableau 31 : Test de l'efficacité de ligation - Programme de la PCR	131
Tableau 32 : Première hybridation - Préparation des tubes - Volume en µL	132
Tableau 33 : Préparation d'ADNc driver dénaturé - Préparation du tube - Volume en µL ...	133
Tableau 34 : Première amplification - Programme de la PCR	134
Tableau 35 : Seconde amplification - Programme de la PCR	135
Tableau 36 : Efficacité de la soustraction - Programme de la PCR	136
Tableau 37 : PCR en plaque 96 puits - Programme de la PCR	139
Tableau 38 : Séquençage - Programme de la PCR	144
Tableau 39 : Clonalité B - Programme de la PCR Ca1 / Ca2	146
Tableau 40 : PCR en temps réel - Programme de la PCR	147
Tableau 41 : Séquences des amorces pour la RQ-PCR	148

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au sein du laboratoire d'Histologie et Pathologie Moléculaire des Tumeurs (EA2406) de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2, sous la direction du Professeur Jean Philippe Merlio. Je tiens à lui exprimer mes remerciements pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour avoir encadré ma thèse. Je le remercie également pour la formation scientifique qu'il m'a permis d'acquérir et pour la confiance qu'il m'a témoignée dans la réalisation de ce travail.

Je remercie le Professeur Jacques Emile Bonnet, Professeur de Biologie Moléculaire à l'Université de Bordeaux 2 pour m'avoir fait l'honneur de présider cette thèse.

Je remercie très sincèrement les Professeurs Gilles Favre et Pierre Brousset de l'Université Paul Sabatier de Toulouse pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie les membres du laboratoire du Professeur Antoine De Mascarel d'Anatomie Pathologie de l'Hôpital Haut Lévêque, et tout particulièrement Mme Beau pour son aide administrative et l'équipe de Biologie Moléculaire pour leur collaboration active.

Mes remerciements vont aussi à l'ensemble du laboratoire du Professeur Merlio pour leur accueil chaleureux et plus particulièrement à Jackie Ferrer pour son aide technique, Nathalie Carrère pour sa participation dans la dernière ligne droite de ma thèse, Edith Chevret pour ses conseils scientifiques et son soutien, Dominique Bertheau pour sa bonne humeur, Fanny Pelluard pour son amitié et Armelle Bolzec.

Une pensée toute particulière aux deux autres thésards du laboratoire, Martina Prochazkova et Cédric Barrière, courage vous allez y arriver vous aussi !

Je tiens également à remercier le professeur Marie Beylot Barry du service de Dermatologie de l'hôpital Haut Lévêque, Marie Parrens et Béatrice Vergier du laboratoire d'Anatomie Pathologie de l'hôpital Haut Lévêque pour le recrutement des cas sur lesquels repose mon travail.

Enfin, je n'oublie pas toutes les personnes qui ont contribué à ce travail par leur aide technique et leurs conseils, tout particulièrement Christophe Barthe, Nicolas Bitteau et Brigitte Tauzin.

Une pensée particulière à Sylvain Caillol, pour ses conseils et son soutien tout au long de ma thèse.

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de la recherche clinique d'Aquitaine.

Liste des communications

Juin 2000 - Carcans Maubuisson : Présentation d'un poster dans le cadre des Doctoriales des Universités d'Aquitaine.

Avril 2001 - Arcachon : Présentation d'un poster sur l'avancement de mes travaux de thèse dans le cadre de la première journée scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences Biologiques et Médicales.

Avril 2002 - Arcachon : Présentation orale « Identification de gènes impliqués dans le Lymphome Cutané CD30+ » dans le cadre de la seconde journée scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences Biologiques et Médicales.

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNg : ADN génomique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomal
ATP : Adénosine triphosphate
BET : Bromure d'éthidium
BSA : Albumine de sérum de bovin
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
cpm : Coup par minute
dCTP : Désoxycytidine triphosphate
DEPC : Diéthyl pyrocarbonate
dNTP : Désoxynucléoside triphosphate
DTT : Dithiothreitol
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
g : accélération de l'apesanteur
GTP : Guanosine triphosphate
kb : Kilobase
L. systémique CD30+ : Lymphome systémique CD30+
LCP : Lymphome cutané primitif
mM : Millimolaire
nr : Non redondante
pb : Paire de base
PCR : *Polymerase chain reaction*
PLy : Papulose lymphomatoïde
rpm : Rotation par minute
RQ-PCR : RT-PCR quantitative
RT-PCR : Reverse transcription PCR
SDS : *Sodium dodecyl sulfate*
SSC : *Saline sodium citrate*
SSH : *Suppressive subtraction hybridization*
TA : Température ambiante = 20°C
Tm : Température de fusion
UTR : *Untranslated region*
v/v : Volume / volume
w/v : Poids / volume
µg : Microgramme
µL : Microlitre

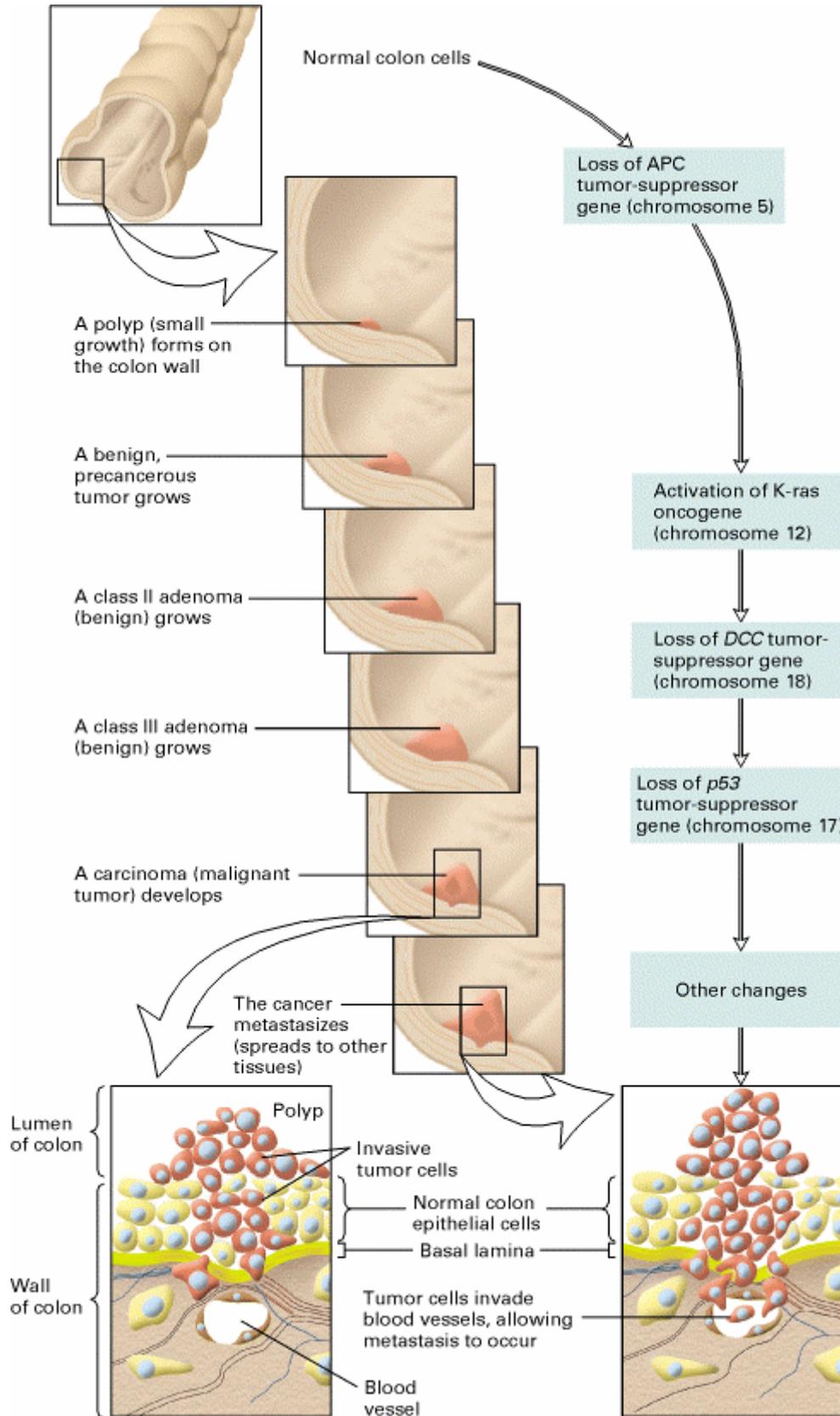


Figure 1 : Exemple d'une accumulation de mutations dans les cancers du colon

1 INTRODUCTION

1.1 Gènes et cancers

Un cancer est dû à une prolifération anormale d'une cellule donnée. Les cancers provenant d'une cellule épithéliale sont appelés carcinomes, ceux issus du tissu conjonctif ou d'une cellule musculaire sont nommés sarcomes, les cancers hématopoïétiques et lymphoïdes regroupent les leucémies et les lymphomes, la dernière entité regroupe les cancers issus des cellules du système nerveux ¹. Dans la majorité des cancers hématopoïétiques et lymphoïdes, la prolifération est composée de cellules appartenant toutes à un même clone cellulaire. Cette monoclonalité des cancers a été vérifiée dans de nombreux cas à l'aide de marqueurs phénotypiques, par exemple en étudiant le polymorphisme du gène G6PD ² ou à l'aide de marqueurs génotypiques, par l'étude du réarrangement somatique des gènes des immunoglobulines ³ ou des récepteurs T ⁴.

Une altération génétique unique ne suffit pas à induire un cancer chez l'homme ⁵. Par exemple dans les carcinomes colo-rectaux, on note une accumulation de mutations pour le développement d'une tumeur maligne ^{6,7}. Une cellule unique présente une mutation qui va lui conférer un avantage prolifératif. Cette cellule va ensuite accumuler d'autres mutations sur des oncogènes et sur des gènes suppresseurs de tumeurs. L'ensemble de ces modifications géniques va aboutir, toujours par sélection, à la formation d'un cancer (cf. figure 1). Dans certaines leucémies, une seule altération suffit ⁸.

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les cancers repose sur deux grands types de gènes : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur ^{9,10}.

1.1.1 Oncogènes ou proto-oncogènes

La plupart des oncogènes connus codent pour des protéines qui ont un rôle positif dans les voies de signalisations impliquées dans la prolifération cellulaire, soit en activant le cycle cellulaire, soit en inhibant l'apoptose. L'altération oncogénique de ces gènes est responsable d'un gain de fonction donc ces oncogènes sont appelés dominants. En effet l'activation d'un seul des deux allèles favorise l'apparition d'un cancer⁹.

Les proto-oncogènes correspondent à des gènes qui codent pour des protéines nécessaires au développement, à la division ou à la survie des cellules normales. Les proto-oncogènes peuvent se transformer en oncogènes de différentes façons :

- Par une mutation qui altère la séquence nucléique et la structure de la protéine, la rendant plus stable, constitutivement activée ou lui conférant une nouvelle fonction.
- Par une mutation au niveau des séquences régulatrices ce qui induit une surexpression de la protéine normale, une expression à un moment inhabituel dans le cycle cellulaire ou encore une expression ectopique dans un type cellulaire aberrant.
- Lors d'un réarrangement chromosomique, la régulation de l'expression du proto-oncogène normal peut se retrouver dans un environnement différent et provoquer une surexpression de la protéine normale ou une expression atypique.
- Lors d'une modification épigénétique, le promoteur d'un proto-oncogène peut se retrouver hypométhylé ce qui provoque l'expression de l'oncogène.

Ces différentes modifications peuvent participer à la dérégulation d'une cellule et au développement d'un cancer.

Le premier oncogène identifié est le gène src du virus du sarcome aviaire¹¹. En fait ce gène correspond à un gène cellulaire qui a été incorporé dans le génome viral lors d'une infection précédente. Src est une protéine tyrosine kinase impliquée dans la transduction du signal lors de processus tels que la prolifération, la différenciation, la motilité et l'adhésion. Dans les cellules normales, Src est principalement maintenu dans un état inactif, sauf lors de la mitose.

Dans les cellules tumorales, des mutations de Src induisent son activation constitutive ce qui perturbe le bon déroulement des voies signalétiques ¹².

Un des oncogènes les plus étudiés est la petite protéine G-Ras. Le proto-oncogène Ras joue un rôle central dans les voies de signalisation intracellulaire. Ras intervient dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation ou encore de l'apoptose. Par exemple, en passant par la voie de signalisation PI-3K, Ras va activer la prolifération cellulaire ; de même en utilisant la voie Raf/MEK, il y a activation de la prolifération ¹³. L'activation de l'oncogène Ras se fait par mutation ponctuelle. Celle-ci induit la synthèse d'une protéine Ras constitutivement activée car elle est toujours fixée au GTP. Cette activation de l'oncogène Ras est retrouvée dans un grand nombre de cancers humains ¹⁴.

1.1.2 Gènes suppresseurs de tumeur ou anti-oncogènes

Les gènes suppresseurs de tumeur codent pour des protéines qui inhibent la croissance cellulaire et empêchent la prolifération aberrante des cellules. Les mutations de ces gènes sont généralement récessives car l'inactivation des deux allèles est nécessaire pour la tumorigenèse¹⁰. Toutefois, l'altération d'un seul des deux allèles peut induire l'inactivation du second. Ceci peut être provoqué par :

- Une mutation qui altère la séquence nucléique et la structure de la protéine, la rendant non fonctionnelle. Par exemple, la création d'un codon stop dans le cadre de lecture induit la synthèse d'une protéine tronquée.
- Une mutation au niveau des séquences régulatrices ce qui induit une perte d'expression de la protéine normale.
- Lors d'un réarrangement chromosomique, le gène suppresseur de tumeur peut se retrouver dans un environnement différent et provoquer une perte d'expression de la protéine normale.
- Par une délétion de la région chromosomique contenant la séquence du gène suppresseur de tumeur.
- Lors de modification épigénétique, la région régulatrice peut se retrouver hyperméthylée et ne plus être transcrite en ARNm.

Ces différentes modifications peuvent participer à la dérégulation d'une cellule et au développement d'un cancer.

Le premier gène suppresseur de tumeur identifié est *RB*. L'altération de ce gène est responsable d'une tumeur rare, le rétinoblastome. Ce cancer est fréquent dans certaines familles, mais peut également survenir sporadiquement. Dans la forme familiale, les enfants héritent d'un de leur parent d'un allèle muté ; ils ne développent la maladie qu'après une altération sporadique du second allèle¹⁵. Le gène *RB* code pour la protéine pRb, qui intervient dans le contrôle du cycle cellulaire lors du passage de la phase G1 à la phase S¹⁶.

Lorsque pRb est absente, les cellules prolifèrent sans contrôle G1-S et peuvent ainsi accumuler de nouvelles altérations génomiques jusqu'au développement d'un cancer.

Le gène suppresseur de tumeur le plus souvent impliqué dans les cancers humains est *p53*, il est muté dans environ 50% des cas ¹⁷. Le produit de ce gène, p53 est un facteur de transcription, qui active notamment l'expression de p21 (inhibiteur du cycle cellulaire). La protéine p53 agit aussi dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 lors de lésions de l'ADN génomique. Si des lésions trop importantes sont constatées sur l'ADN génomique, p53 active l'apoptose ¹⁸. Certaines mutations de la protéine p53 induisent sa transformation en dominant négatif. En effet, la protéine altérée forme des tétramères avec la p53 endogène non mutée et ces complexes sont alors inactifs ^{19,20}. Ces différentes fonctions montrent bien l'importance de ce gène pour protéger les cellules d'un développement ou d'une survie anarchiques.

1.2 Lymphomes

1.2.1 Définition des lymphomes

Les lymphomes non-Hodgkiniens sont des proliférations malignes d'origine lymphocytaire B ou T ; ils appartiennent au groupe des maladies hématopoïétiques et lymphoïdes ²¹. Dans la majorité des cas ils sont localisés dans les ganglions et sont alors plus souvent de phénotypes B ²². Le diagnostic de lymphome est donné selon des aspects cliniques, évolutifs, morphologiques, cytologiques et architecturaux, mais repose essentiellement sur la mise en évidence d'une monoclonalité. Cette monoclonalité est mise en évidence par des techniques de PCR sur les gènes des récepteurs B (BcR) pour les lymphomes de phénotypes B ou des récepteurs T (TcR) pour les lymphomes de phénotypes T ^{3,4,23}.

1.2.2 Lymphomes cutanés primitifs

Les lymphomes cutanés primitifs (LCP) sont des lymphoproliférations malignes strictement localisées dans la peau sans extension extra-cutanée pendant au moins 6 mois après le diagnostic ²⁴. Cette définition ne s'applique pas pour deux pathologies appartenant aux LCP : le mycosis fongoïdes et le syndrome de Sézary. Le phénotype T est dominant dans les LCP dans 80 à 90 % des cas. Avec une incidence annuelle comprise entre 0,5 et 1/100000, les LCP constituent le deuxième groupe des lymphomes extra-ganglionnaires après les lymphomes digestifs ²⁵.

Les LCP forment un groupe très hétérogène à la fois par leurs caractères cliniques, histologiques, phénotypiques, génotypiques et pronostiques. Leur histoire clinique est différente de celle de lymphomes ganglionnaires de même type histologique. Cette hétérogénéité et ces particularités ont amené à élaborer une classification propre aux LCP proposée par l'EORTC ^{25,26}. Selon cette classification, les LCP sont rangés en fonction de leur phénotype T ou B puis de leur pronostic.

1.2.3 Les lymphoproliférations CD30+

Parmi les LCP de phénotypes T, certains expriment l'antigène de surface CD30 : les lymphomes cutanés primitifs T à grandes cellules CD30+, la papulose lymphomatoïde de type A et les cas frontière (PLy type C). Ils forment un spectre continu allant de la papulose au lymphome. Il existe également des lymphomes ganglionnaires qui expriment l'antigène CD30. Ces différentes entités sont regroupées sous le terme de lymphoproliférations CD30+.

1.2.3.1 L'antigène CD30 et son ligand

L'antigène de surface CD30 est un récepteur transmembranaire de 120 kDa de la famille du récepteur du TNF et du NGF^{27,28}. Son gène est localisé sur le chromosome 1 en 1p36, dans la même région que les autres membres de la famille du TNF. Le ligand de l'antigène CD30, le CD30L est une cytokine qui présente des homologies avec le TNF²⁹. Son gène est localisé sur le chromosome 9 en 9q33.

Le promoteur du gène CD30 ne contient pas de séquence « TATA box » mais il est riche en dinucléotides GC³⁰. Il contient trois sites reconnus par le facteur de transcription Sp1. Des mutations dans les sites Sp1 induisent une perte de l'expression du CD30. Ce promoteur contient aussi un site pour le facteur de transcription Sp3 or des mutations sur ce site induisent une surexpression du CD30. Les sites Ets et LVc sont reconnus par des facteurs de transcriptions spécifiquement exprimés dans les cellules lymphoïdes.

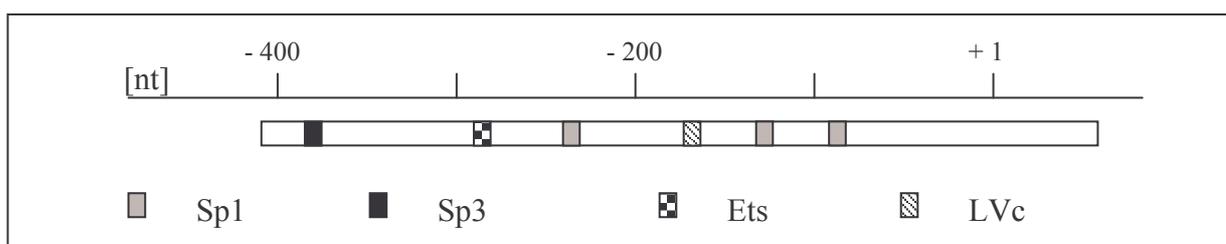


Figure 2 : Schéma du promoteur du gène CD30³⁰

L'expression du CD30 est régulée par le ratio Sp1 / Sp3, plus celui-ci est élevé, plus l'expression du gène est importante. Les facteurs de transcriptions qui se fixent sur les séquences Ets et LVC confèrent la spécificité tissulaire de l'expression du CD30³⁰.

Il existe un autre promoteur localisé dans le troisième intron du gène CD30. Lorsque la transcription est initiée à partir de ce promoteur, un ARNm de 2,3 kb est généré. Il correspond à une autre isoforme du CD30 qui contient uniquement la région C-terminale du domaine transmembranaire et la totalité de la région cytoplasmique, appelée CD30v. Ce dernier a été initialement isolé à partir de la lignée cellulaire de leucémie myéloïde HL-60^{31,32}. L'ARNm du CD30v est retrouvé dans 70 % des lymphoproliférations de phénotypes B mais seulement dans 25 % des lymphoproliférations de phénotypes T³³. Son expression dans les LCP CD30+ n'est pas documentée.

Dans le tissu lymphoïde normal, le CD30 est détectable dans une sous-population de cellules mononucléées de grandes tailles situées autour des follicules B, dans la rate, dans le thymus. Ces cellules correspondent à des lymphocytes T, B ou nul à fort index de prolifération comme en témoigne leur expression de l'antigène nucléaire Ki-67³⁴. Il est également exprimé dans 15 à 20 % des lymphocytes T activés³⁵. Le CD30L est exprimé dans les lymphocytes sanguins T, dans les lymphocytes T activés et dans les monocytes³⁶.

Au niveau pathologique, le CD30 est exprimé par différents types de lymphomes non-Hodgkiniens tel que les L. systémiques CD30+, les PLY et les lymphomes cutanés CD30+³⁷. Le CD30L est exprimé dans certaines lignées cellulaires issues de lymphomes de Burkitt³⁶. Le CD30L est trouvé plus fortement exprimé dans des LCP CD30+ en phase de régression que dans des lymphomes de même type en phase de prolifération. Un LCP CD30+ en phase de prolifération est déterminé par l'absence de nécrose, d'ulcération et ou de cicatrice³⁸.

La signalisation médiée par le récepteur membranaire CD30 est induite par la fixation du CD30L à son domaine extracellulaire et par le regroupement des récepteurs²⁹. La protéine CD30 ne contenant pas d'activité enzymatique dans sa région cytoplasmique, la signalisation

se poursuit à l'intérieur de la cellule par le recrutement des protéines TRAF pour « TNF associated factors ». Les voies de NF Kappa B et des MAPK sont ainsi allumées³⁹⁻⁴¹.

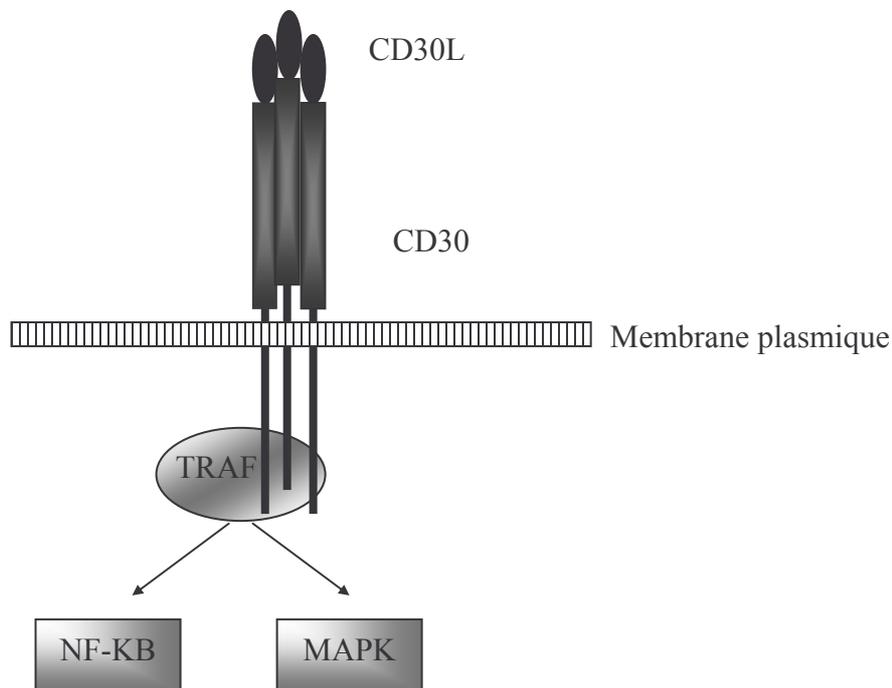


Figure 3 : Voies de signalisations associées au CD30

La signalisation médiée par le CD30 est capable de promouvoir la prolifération cellulaire et la survie cellulaire autant que l'apoptose, le choix entre ces différents processus biologiques dépend du type cellulaire ainsi que des autres gènes activés⁴¹. Le CD30L induit l'apoptose sur des lignées cellulaires anaplasiques CD30+³⁷. De même dans les lymphomes CD30+, la fixation du CD30L à son récepteur induit l'apoptose des cellules tumorales^{42,43}.

Une étude a récemment mis en évidence que l'activation de la voie de signalisation de NF Kappa B via le CD30 ne nécessite pas la fixation du ligand sur son récepteur. Une surexpression de la protéine CD30 induit une agrégation autonome du récepteur CD30, le recrutement des protéines TRAF peut alors avoir lieu⁴⁴. Ce mécanisme peut théoriquement exister pour les différentes voies de signalisations médiées par le CD30 et les protéines TRAF.

Il existe également une forme soluble du CD30, le CD30s. Cette protéine de 85 kDa est générée par clivage protéolytique du CD30. Le CD30s correspond à la partie extra-cellulaire

du récepteur. Il est détectable dans le sérum de patient atteint de la maladie de Hodgkin ou de lymphome ganglionnaire CD30+ ⁴⁵. Des études *in vitro* montrent que la forme soluble du CD30 est capable de lier le CD30L et ainsi bloquer la voie de signalisation médiée par le CD30 ⁴⁶. Ces résultats suggèrent une fonction biologique non négligeable pour la protéine CD30s.

1.2.3.2 *Le lymphome cutané primitif à grandes cellules CD30+*

Le lymphome cutané à grandes cellules CD30+ représente 9 % des LCP selon la classification de l'EORTC ²⁵. Il est défini comme une lymphoprolifération non épidermotropique, de phénotype T avec plus de 70 % des cellules qui expriment le CD30. Au niveau génomique, un réarrangement clonal du récepteur T (TcR) est mis en évidence dans au moins 70 % des cellules. Une étude réalisée dans le laboratoire du Pr Merlio a montré un réarrangement clonal du TcR dans quasiment 100% des cellules ⁴⁷. Le patient ne doit pas avoir d'antécédent de papulose lymphomatoïde, de mycosis fongoïde ou d'autre lymphome ni de localisation extra-cutanée dans les six mois qui suivent le diagnostic ²⁴. Le terme de LCP CD30+ regroupe en fait des lymphomes à grandes cellules de morphologie cellulaire variable auxquels l'expression du CD30 donne un caractère commun de bon pronostic. Le pronostic de cette pathologie, avec une survie à 5 ans de 95 %, est favorable ; lors d'une extension extra-cutanée, le pronostic est moins favorable avec une survie à 5 ans de seulement 25 %.

Survenant en général chez l'adulte (l'âge moyen est de 60 ans), les lésions sont solitaires ou localisées dans une même zone sans localisation préférentielle, rarement disséminées. Ce sont des papules, nodules, petites tumeurs uniques ou multiples ou parfois une volumineuse tumeur ulcérée. Une rémission partielle ou totale des lésions est fréquente et caractéristique de ces lymphomes ⁴⁸. Une atteinte extra-cutanée, essentiellement ganglionnaire, survient ultérieurement dans 25 % des cas ²⁴.

Depuis que le bon pronostic vital des LCP CD30+ a été reconnu, le traitement ne repose pas sur des chimiothérapies agressives. En effet celles-ci ne permettent pas d'obtenir de meilleure

réponse²⁴ et doivent être réservées à des malades avec une extension extra-cutanée secondaire^{49,50}. La radiothérapie ou la chirurgie est indiquée pour des lésions loco- régionales. Le méthotrexate est utilisé pour des lésions multicentriques. Toutefois, quel que soit le traitement entrepris, de fréquentes récurrences cutanées sont observées, dans 41 % des cas. Même si elles ne sont pas associées à un mauvais pronostic vital⁵⁰, elles peuvent retentir considérablement sur la qualité de vie des malades⁵¹. Actuellement aucune caractéristique clinique histologique ou phénotypique ne permet de prédire ces récurrences et donc de sélectionner des malades à risque qui pourraient bénéficier d'un traitement général adapté.

Pour résumer, les caractéristiques des LCP CD30+ sont regroupées ci-dessous.

Clinique	Non agressif, tumeur cutanée souvent localisée, régression spontanée, récurrence
Age	60 à 70 ans
Pronostic	Survie à 5 ans = 95 %, si extension extracutanée = 25 %
Histologie	Lymphoprolifération dermique dense de grandes cellules
Phénotype	T ou nul, CD30+
Génotype	Réarrangement clonal du gène codant pour le TcR : 70 %

Tableau 1 : Caractéristiques des LCP CD30+

1.2.3.3 La papulose lymphomatoïde de type A et les cas frontières

Les papuloses lymphomatoïdes (PLy) représentent 11 % des LCP selon la classification de l'EORTC²⁵. La moyenne d'âge des sujets atteints est légèrement inférieure à celle des LCP CD30+. La PLy de type A se caractérise par la survenue chronique d'éruptions auto-régressives constituées de lésions multiples de différents types en fonction de leur âge. La lésion initiale est une papule érythémateuse qui va évoluer en quelques jours vers la nécrose puis vers une régression spontanée en quelques semaines. Plus rarement il peut exister des nodules ou des plaques. Les lésions sont nombreuses (10 à 100) et disséminées sur le corps avec une prédominance sur le tronc et les membres. Elle est de bon pronostic⁵².

Au niveau histologique, la PLY de type A est caractérisée par un infiltrat non épidermotrope. Il est fait de plusieurs nids de grands lymphocytes T CD30+ mêlés à un infiltrat polymorphe de petits lymphocytes, d'histiocytes, de neutrophiles et d'éosinophiles⁵³. La détection d'une population clonale T dans les PLY est retrouvée dans environ 50 % des cas²².

Le diagnostic différentiel entre PLY et LCP CD30+ n'est pas toujours aisé et il existe même d'authentiques formes frontières entre PLY et LCP CD30+ où la clinique et l'histologie sont discordantes. Ainsi, il peut s'agir d'une tumeur unique évoquant cliniquement un LCP CD30+ mais ayant une histologie de PLY, Willemze considère alors le malade comme ayant un LCP CD30+⁴⁹. Il peut, à l'inverse, s'agir d'une éruption de multiples papules évoluant vers la régression évoquant cliniquement une PLY mais dont l'histologie est celle d'un LCP CD30+, il s'agit alors d'une PLY de type C, dont le pronostic paraît semblable à celui d'une papulose classique⁵⁴. Il est donc important d'étudier les lésions à la fois cliniquement et histologiquement.

Les PLY de type B ne font quant à elles pas partie du spectre des lymphoproliférations CD30+.

Le tableau suivant confronte les caractéristiques des LCP CD30+ et des différentes PLY.

	PLY type A	Cas frontière : PLY Type C	Autre cas frontière	LCP CD30+
<i>Histologie</i>				
- Cellules CD30+	dispersées	en amas	dispersées	en amas
- Cellules inflammatoires	nombreuses	rare/modérées	nombreuses	rare/modérées
<i>Clinique</i>				
- Type de lésions	papule>nodule	papule>nodule	nodule>tumeur	nodule>tumeur
- Distribution	généralisée	généralisée	loco-régionale	loco-régionale
<i>Evolution</i>				
- Régression spontanée	toujours	toujours	fréquente 50 %	fréquente 30 %
- Atteinte extra-cutanée	exceptionnelle	exceptionnelle	rare ?	25 % des cas

Tableau 2 : Différences entre la PLY de type A et le LCP CD30+

1.2.3.4 Le lymphome ganglionnaire CD30+

Le lymphome ganglionnaire ou L. systémique CD30+ représente 5 % à 8 % des lymphomes ganglionnaires. Sa distribution est bimodale. En effet, s'il est plus fréquent chez l'enfant ou le jeune adulte avec un premier pic vers 20 à 30 ans, un second pic existe vers 70 ans. Cette pathologie est volontiers agressive surtout chez l'enfant et le jeune adulte où plus de 50 % des patients sont d'emblée aux stades III ou IV. Il existe des signes généraux (> à 40 %), une polyadénopathie et souvent une atteinte extra-ganglionnaire, en particulier cutanée (20 à 30 %) et osseuse ⁵⁵.

Histologiquement, on observe une prolifération diffuse, de grandes cellules lymphomateuses, à prédominance intrasinusoidale, détruisant l'architecture du ganglion. Ces grandes cellules sont en majorité de phénotype T (75 %) ou nul (non B, non T) ; elles expriment le CD30 et dans 60 % des cas, un réarrangement clonal du TcR est retrouvé par PCR ⁵⁶.

Au niveau génomique, on retrouve dans 50 % des lymphomes systémiques CD30+ la translocation t(2,5) ⁵⁷. Cette translocation provoque la fusion des gènes NPM et ALK. Le gène NPM code pour une phosphoprotéine ubiquitaire exprimée dans le noyau ^{58,59}, celui de ALK code pour un récepteur tyrosine kinase qui n'est pas exprimé dans les cellules lymphoïdes normales ^{60,61}. La fusion des deux gènes permet l'expression du domaine catalytique tyrosine kinase (partie cytoplasmique) du gène ALK qui se retrouve sous la régulation du promoteur du gène NPM dans les cellules lymphoïdes ^{62,63}.

Lorsque la translocation est présente dans un L. systémique CD30+, la protéine de fusion NPM-ALK est exprimée dans le cytoplasme et dans le noyau ⁸.

Les propriétés oncogéniques de la protéine de fusion NPM-ALK ont été démontrées. Cette protéine est capable de transformer *in vitro* des fibroblastes de rats ⁶⁴. Des études *in vivo* ont également été réalisées. Lorsqu'on introduit le gène de fusion dans des cellules

hématopoïétiques de souris, l'injection de ces cellules dans des souris induit la formation de lymphomes en trois à quatre mois ⁶⁵.

Ces lymphomes nécessitent un traitement par chimiothérapie agressive, voire des greffes médullaires. Toutefois ils réagissent souvent bien à ces traitements malgré leur présentation clinique agressive et indépendamment du stade d'extension initial ⁵⁶. Leur pronostic est variable en fonction de l'âge des patients, avec une survie à 5 ans de 54 % chez les malades âgés alors qu'elle est de 77 % chez les sujets jeunes ^{55,66}.

Le tableau suivant présente une comparaison des caractéristiques des LCP CD30+ et des L. systémiques CD30+.

	L ganglionnaire CD30+	LCP CD30+
Age	Bimodal : 20 ans et 70 ans	60 à 70 ans
Clinique	Agressif : polyadénopathie Atteinte extra-ganglionnaire osseuse ou cutanée (20 à 30 %)	Non agressif Tumeur cutanée souvent localisée
Histologie	Prolifération diffuse de grandes cellules détruisant l'architecture du ganglion	Prolifération dermique dense de grandes cellules
Phénotype	T, nul ou rarement B, CD30+	T ou nul, CD30+
Génotype	Réarrangement clonal du gène du TcR	Réarrangement clonal du gène du TcR
Pronostic	Relativement favorable survie à 5 ans de 77 % pour les sujets jeunes et de 54 % pour les sujets âgés	Très favorable survie à 5 ans de 95 %, si extension extra-cutanée 25 %

Tableau 3 : Différences entre le lymphome ganglionnaire CD30+ et le LCP CD30+

1.3 Etude du profil d'expression des gènes

A la suite du séquençage du génome humain, la communauté scientifique admet que notre génome contient environ 30000 gènes différents ⁶⁷. Ces gènes ne sont pas tous exprimés en même temps dans toutes les cellules de notre organisme, 10 à 20 % d'entre eux sont exprimés en fonction du type cellulaire. La majorité des ARN exprimés sont des gènes nécessaires au fonctionnement des cellules, seulement 100 à 1000 ARN sont spécifiques d'un type cellulaire ⁶⁸.

C'est le choix des gènes exprimés ou non et l'intensité avec laquelle ils le sont qui va déterminer l'ensemble des processus vitaux : prolifération et différenciation, réponse aux agressions, régulation du cycle cellulaire, vieillissement et apoptose... Lors d'un processus pathologique, par exemple dans le cas des cancers, le profil d'expression des cellules varie par rapport au profil des cellules normales.

La comparaison du profil d'expression des cellules tumorales par rapport à celui des cellules non tumorales permet d'apporter des informations sur les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'oncogenèse. Cependant cette approche comporte des limites et elle doit être associée à d'autres approches, telle que l'étude des régulations traductionnelles ou post-traductionnelles des protéines.

L'étude du transcriptome peut se faire de manière ciblée ou non ⁶⁹⁻⁷¹.

1.3.1 Approches ciblées

Les approches ciblées permettent de regarder le niveau d'expression d'un gène connu. Les techniques utilisées sont des RT-PCR classiques ou en temps réel. Dans les deux cas, la transcription inverse est réalisée sur l'ensemble des ARN. L'initiation de la transcription se fait en 3' des ARNm à l'aide d'un oligo(dT) ou en interne avec des hexamères. Dans ce dernier cas la totalité des ARN est rétro transcrite.

La synthèse du second brin d'ADNc est réalisée par PCR avec des amorces spécifiques du gène étudié. Le résultat peut être observé de différentes manières :

- En fin d'amplification par migration du produit de PCR sur un gel d'agarose. La quantification n'est pas possible car la PCR est en phase de saturation.
- En prélevant à différents cycles un aliquote de la réaction de PCR. Par migration des produits de PCR sur un gel d'agarose, la cinétique de la réaction peut être visualisée. La quantification des ARN est possible en comparant les signaux obtenus pour différents échantillons. Il est alors important de choisir les cycles de manière à se situer dans la phase exponentielle de la PCR pour respecter une proportionnalité des amplicons par rapport à la quantité des transcrits initiaux.
- Tout au long de l'amplification en utilisant des machines de PCR en temps réel comme le Light Cycler (Roche Applied Science), le Taqman (PE Applied Biosystems) ou encore le SMART PCR (Eurogentech). Pour visualiser la PCR, la technique la plus simple est d'incorporer un fluorochrome dans le mix de PCR. Ce fluorochrome, le SYBR-Green, se fixe uniquement sur l'ADN double brin, au niveau du petit sillon. A chaque cycle d'amplification, la fluorescence est mesurée. Par cette technique la quantification des ARN est beaucoup plus fiable car la mesure est faite lors de l'apparition du produit de PCR et pas en phase de saturation.

Ces techniques sont facilement réalisables, mais il faut *a priori* connaître le ou les gènes cibles à étudier. Lorsque ce n'est pas le cas, nous utilisons des approches globales.

1.3.2 Approches globales

Sans être exhaustif sur l'ensemble des stratégies expérimentales permettant d'isoler des gènes spécifiquement exprimés dans une population cellulaire donnée, nous avons choisi de détailler les techniques de puce à ADNc, de mRNA differential display et d'hybridation soustractive.

1.3.2.1 Puces à ADNc ou micro-array

Cette technologie est fondée sur la miniaturisation des supports et sur l'hybridation moléculaire. Sur une lame de verre sont fixés des milliers de fragments d'ADNc correspondant chacun à un gène connu ou choisi. Deux échantillons d'ARN sous forme d'ADNc sont co-hybridés sur la puce à ADNc. Les deux échantillons marqués par un fluorophore différent (par exemple Cy-3 vert ou Cy-5 rouge) s'hybrident simultanément avec les molécules fixées sur la puce. L'intensité du signal lumineux est alors mesurée, à l'aide d'un microscope confocale, aux deux longueurs d'ondes correspondant aux différents fluorophores. Le rapport de fluorescence rouge/vert ainsi déterminé permet de comparer les taux d'expression relatifs de chacun des gènes pour les deux échantillons d'ADNc ⁷²⁻⁷⁵.

1.3.2.2 mRNA differential display (dd RT-PCR)

Cette technique, décrite en 1992 par Liang et Pardee ⁷⁶, est basée sur l'amplification de fragments d'ADNc obtenus à partir de sous-populations d'ARNm. Elle permet de comparer plus de deux populations d'ARN en une seule expérience. Cette technique comporte différentes étapes qui sont décrites ci-dessous, pour chaque population d'ARN :

- Rétro transcription des ARN à partir de plusieurs oligonucléotides dégénérés : chaque oligonucléotide générant une sous population d'ADNc.

- Amplification par PCR avec comme amorce l'oligonucléotide correspondant et une amorce de 10 résidus arbitraires en 5'. Chaque réaction de PCR est réalisée en double.
- Migration, sur gel polyacrylamide, des produits de PCR des différentes populations d'ARN pour un même couple d'amorces.
- Les bandes différentielles sont découpées et l'ADN en est extrait.
- Les bandes sont réamplifiées avec le couple d'amorces adéquat et clonées.
- Le clone est enfin séquencé.

1.3.2.3 *Hybridation soustractive suppressive ou Suppressive subtraction hybridization (SSH)*

Cette technique est fondée sur l'hybridation des acides nucléiques. La technique initiale d'hybridation soustractive est la suivante :

- Deux populations d'ARN distincts sont rétro transcrites en ADNc simple brin.
- Les ADNc simple brin des deux populations sont hybridés.
- Les ADNc double brin formés sont éliminés.

Plusieurs cycles d'hybridations et éliminations des ADNc hybridés sont nécessaires. Les séquences simple brin restantes correspondent à des gènes présents uniquement dans une des deux populations.

La technique optimisée par Diatchenko en 1996⁷⁷⁻⁸⁰ permet, en un seul cycle, de combiner les effets de normalisation et de suppression de la PCR. La normalisation a lieu lors de la première hybridation et la suppression lors de l'amplification par PCR. L'effet suppressif de la SSH est dépendant de l'efficacité de la digestion et de la ligation des adaptateurs. En fait, lors de l'amplification par PCR, les adaptateurs vont préférentiellement s'hybrider entre eux et ainsi former des molécules pseudo-circulaires. De même, l'hybridation des oligonucléotides sur les adaptateurs est moins stable que l'hybridation des adaptateurs entre eux. Les principales étapes sont décrites ci-contre :

- Rétro transcription des ARN des deux populations (*tester* et *driver*) en ADNc double brin. La soustraction est réalisée dans le sens suivant : *tester* moins *driver*.
- Digestion des ADNc par l'enzyme de restriction *RsaI* afin d'homogénéiser la taille des ADNc. A cette étape la préparation de l'ADNc *driver* est terminée.
- Deux populations d'ADN *tester* sont créées par ligation d'adaptateurs différents aux extrémités des ADNc *tester* : *tester* 1 et 2R.
- Deux premières hybridations sont réalisées : *tester* 1 et *driver*, *tester* 2R et *driver*. C'est à cette étape qu'a lieu la normalisation de la SSH. En effet, les gènes fortement exprimés vont s'hybrider plus rapidement que les gènes faiblement exprimés. La durée de cette première hybridation est critique, il faut qu'elle soit suffisamment longue pour que les ADNc présents dans les deux populations puissent s'hybrider mais pas trop longue afin qu'il reste des ADNc simple brin.
- La seconde hybridation est réalisée entre les produits des deux premières hybridations en présence de *driver*.
- Amplification par PCR avec une amorce spécifique des extrémités 5' des adaptateurs 1 et 2R. Les ADNc différentiellement exprimés sont amplifiés de façon exponentielle.
- Amplification par PCR nichée avec deux amorces spécifiques des extrémité 3' des adaptateurs 1 et 2R. Le bruit de fond est ainsi diminué.
- Clonage du produit de seconde PCR : création de la banque soustraite.
- Les clones sont enfin séquencés. Une étape de criblage peut être réalisée avant le séquençage pour éliminer les faux positifs.

Les études à l'aide des puces à ADN nécessitent des moyens techniques importants et un investissement financier non négligeable, tant pour la réalisation des puces que pour l'analyse informatique des résultats. Pour notre étude, nous n'avons pas choisi cette approche car ces techniques n'étaient pas accessibles localement au début de notre travail et que nous n'étions pas sûr que les gènes d'intérêts soient représentés sur la puce utilisée. Le transcriptome des LCP CD30+ étant très peu étudié, nous avons opté pour une technique nous permettant d'étudier l'ensemble des gènes sans sélection préalable lors de la création d'une puce ou par l'utilisation des puces commerciales. De plus il n'y avait pas à l'époque dans notre environnement de compétences ou d'équipement nous permettant d'accéder à ces nouvelles technologies.

La technique de mRNA differential display a été utilisée dans le laboratoire avant mon arrivée. Elle a généré beaucoup de résultats non informatifs. En effet lors du séquençage des clones différenciellement exprimés, de nombreuses séquences correspondaient à des régions 3' UTR.

La réalisation de banques soustraites nous a semblé être une bonne approche pour étudier le transcriptome des LCP CD30+. Elle contient une étape de digestion par *RsaI* qui génère des fragments d'environ 500 pb. Cette technique qui est basée sur une transcription inverse complète, permet théoriquement d'étudier l'ensemble du transcriptome en une seule et même expérience, au contraire des techniques de « mRNA differential display ».

2 OBJECTIF DE LA THESE

2.1 Intérêt

Les lymphomes cutanés primitifs (LCP) CD30+ sont des lymphoproliférations malignes de phénotype T. Ils se caractérisent, par rapport aux lymphomes systémiques CD30+, par un bon pronostic et par des phénomènes de régression spontanée et de récurrence.

Dans 60 % à 85 % des lymphomes systémiques CD30+, la translocation t(2,5) est présente²². Des études précédemment menées dans le laboratoire par Marie Beylot-Barry ont montré l'absence de cette translocation dans les LCP CD30+⁸¹. Leur oncogenèse reste à ce jour inconnue.

Le but de cette thèse a été d'identifier des gènes surexprimés spécifiquement dans les LCP CD30+ afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans le développement de ce cancer. Ces altérations pourront également être utilisées comme marqueurs des LCP CD30+ et ainsi aider au diagnostic ou encore servir de cibles thérapeutiques.

2.2 Démarche scientifique

Dans un premier temps, une banque de soustraction est réalisée par la technique de SSH (Hybridation Soustractive Suppressive). Cette technique permet de comparer le profil d'expression de deux populations cellulaires et de mettre en évidence des gènes surexprimés dans une des deux populations ⁷⁷. Les échantillons utilisés sont des LCP CD30+ et des lymphocytes sanguins de patients sains (ne présentant aucune maladie lymphoproliférative). Nous recherchons des gènes surexprimés dans les LCP CD30+.

La seconde étape consiste à cribler cette banque de soustraction de manière à réduire le nombre de faux positifs. Ce criblage est réalisé par des techniques de Dot Blot avec des sondes radiomarquées spécifiques des échantillons étudiés.

La troisième étape permet de valider la variation d'expression des gènes sélectionnés lors du criblage. Elle est effectuée par des techniques de PCR semi-quantitative en temps réel.

3 REALISATION DES BANQUES DE SOUSTRACTION

3.1 Introduction

La première étape de notre travail consiste à créer des banques d'ADNc enrichies en gènes spécifiques des LCP CD30+. L'approche choisie est celle des banques soustraites ou SSH.

Le choix pour la soustraction de la population cellulaire non tumorale (*driver*) est complexe. Dans le cas d'un LCP CD30+, nous sommes en présence d'une population dense de lymphocytes T clonaux, localisée dans le derme. Les biopsies contiennent donc des lymphocytes tumoraux T et des cellules du derme (fibroblastes). Nous trouvons également des cellules de l'épiderme, principalement des kératinocytes. Pour chaque biopsie nous disposons de coupes colorées à l'hématoxyline de Harris. Nous pouvons ainsi vérifier l'environnement de la tumeur. Nous avons également éliminé par macrodissection l'épiderme et la zone non tumorale présents dans certains prélèvements avant l'extraction des ARN totaux.

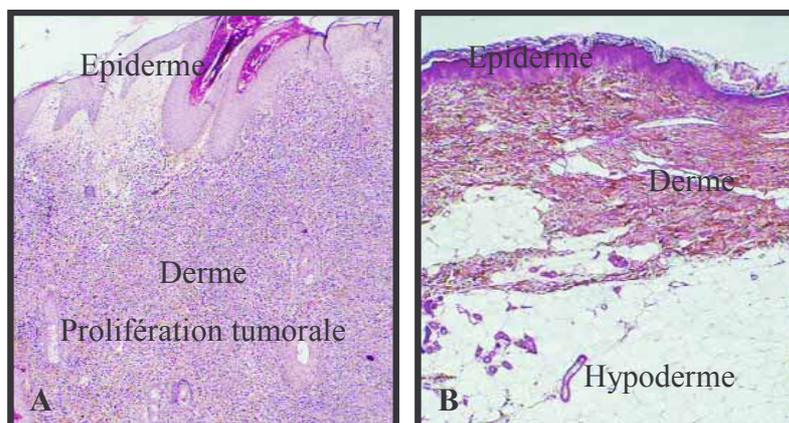


Figure 4 : Coupe de biopsie cutanée - LCP CD30+ (A) - Peau saine (B)

Nous avons donc le choix entre différentes populations cellulaires non tumorales : des lymphocytes T, des kératinocytes ou encore des fibroblastes. La meilleure étant un mélange de ces trois populations dans les mêmes proportions que dans la biopsie tumorale. Ceci n'est pas réalisable car ces proportions cellulaires varient pour chaque biopsie tumorale. Nous

avons donc opté pour la population cellulaire la plus importante qui correspondait à l'équivalent normal des cellules tumorales : les lymphocytes T. Nous avons donc utilisé des lymphocytes circulants qui sont composés à 75 % de lymphocytes T.

Dans un premier temps, nous pensions utiliser des culots de lymphocytes circulants prélevés sur le patient atteint de LCP CD30+ en même temps que la tumeur pour éventuellement éviter des variations individuelles. Ceci n'a pas été possible du fait de la dégradation des ARN dans les culots de lymphocytes stockés plus de trois mois dans le service de pathologie à l'hôpital Haut-Lévêque. Nous avons donc réorienté notre choix vers des lymphocytes de patients sains ne présentant aucune maladie lymphoproliférative, ce qui présentait également l'avantage de pouvoir réaliser des pools.

Plusieurs banques ont été réalisées à partir de différents prélèvements de LCP CD30+ auxquels nous avons soustrait une population cellulaire non tumorale. Ces banques sont regroupées dans le tableau suivant.

Banque	ARN tumoral (tester)	ARN non tumoral (driver)
SSH 1	P3	LP7 (lymphocytes sains)
SSH 2	P10	PHA (lymphocytes activés à la PHA)
SSH 3	P3	LP7
SSH 4	P3	LP7
SSH 5	P3	Lm (pool de lymphocytes sains : La + Lb + Lc + Ld)
SSH 6	P11A	Lm
SSH 7	P3	L1 (pool de 3 lymphocytes sains)
SSH 8	P11A	L1

Tableau 4 : Banques de soustraction

Nous avons également utilisé, pour la SSH 2, des lymphocytes de patients sains que nous avons activé à la PHA. Ceci a été réalisé une seule fois car nous avons obtenu de faibles quantités d'ARN à partir de ces lymphocytes activés à la PHA.

Pour les SSH 5 à 8, nous avons regroupé trois ou quatre échantillons de patients sains pour former la population d'ARN non tumorale. Ceci nous a permis d'éliminer toute variation individuelle.

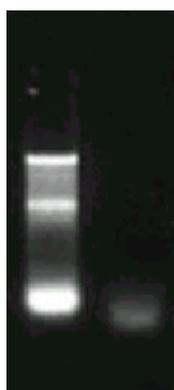
La réalisation des banques est contrôlée à chaque étape et si un contrôle n'est pas concluant l'expérience est abandonnée.

3.2 Extraction des ARN totaux

Les ARN sont extraits à partir de biopsies cutanées ou d'un culot de lymphocytes sanguins conservés à -80°C. L'épiderme a été éliminé par macrodissection pour les échantillons utilisés dans les banques soustraites.

La technique de Chomczynski et Sacchi ⁸² a été modifiée dans le laboratoire afin d'améliorer le rendement de l'extraction à partir de petites quantités de matériel. Nous avons également utilisé la technique Trizol qui est plus rapide et qui donne également de bons résultats mais peut entraîner une co-extraction d'ADN génomique plus fréquemment, ce qui a nécessité un traitement des ARN par la DNase I.

La qualité des ARN extraits est estimée par migration sur gel d'agarose non dénaturant. La piste 1 correspond à des ARN de bonnes qualités tandis que la piste 2 correspond à des ARN fortement dégradés. Les bandes majoritaires présentes dans la première piste correspondent aux ARN 28S et 18S. La bande des ARN 28S doit être plus intense que celle des ARN 18S pour considérer qu'il n'y a pas de dégradation des ARN.



Gel d'agarose 1,2 % w/v

1. ARN P3 (800 ng)

2. ARN LP1 (300 ng)

Figure 5 : Qualité des ARN

La qualité des ARN extraits dépend de l'état du prélèvement. Dans le cas des lymphocytes sanguins qui sont conservés sous forme de culot sec à -80°C, la dégradation est importante après quelques mois de congélation à -80°C, c'est le cas de l'échantillon LP1. Ceci nous a

conduit à prendre des lymphocytes sanguins de patients sains (ne présentant aucune maladie lymphoproliférative) et non ceux du patient étudié.

Pour la réalisation des banques de soustractions, seuls les ARN de bonne qualité sont utilisés. Les résultats des différentes extractions sont regroupés dans le tableau suivant.

Code	Pathologie	Type de prélèvement	Quantité (ng/μl)	Qualité	Technique
P1	LCP CD30+	Peau	283	-	Solution D
P3	LCP CD30+	Peau	1817	+	
LP1	LCP CD30+	Lymphocytes	44	-	
LP3	LCP CD30+	Lymphocytes	132	-	
LP6	Sain	Lymphocytes	188	+	
LP7	Sain	Lymphocytes	856	+	
LP8	Sain	Lymphocytes	328	+	
PHA	Sain activé à la PHA	Lymphocytes	386	+	
LPx	Sain	Lymphocytes activés (IL2)	1132	+	
LPy	Sain	Lymphocytes activés (IL2)	1024	+	
P10	LCP CD30+	Peau	826	+	
La	Sain	Lymphocytes	259	+	
Lb	Sain	Lymphocytes	175	+	
Lc	Sain	Lymphocytes	355	+	
Ld	Sain	Lymphocytes	261	+	
P11A	LCP CD30+	Ganglion	2273	+	
L1	Sain	Mix de 3 lymphocytes	1059	+	
L2	Sain	Mix de 3 lymphocytes	831	+	
P14	L. systémique CD30+	Ganglion	1082	+	
P15	Eczéma	Peau inflammatoire	430	+	
LP3	Sain	Mix de 3 lymphocytes	607	+	
LP4	Sain	Mix de 3 lymphocytes	1646	+	
P16	LCP CD30+	Peau	740	+	
P11C	LCP CD30+	Peau	976	+	
P9	LCP CD30+	Peau	780	+	
P4	LCP CD30+	Peau	764	+	
P5	LCP CD30+	Peau	1072	+	
P17	LCP CD30+	Peau	808	+	
P18	LCP CD30+	Peau	676	+	
GP24	L systémique CD30+	Ganglion	1250	+	
GP25	L systémique CD30+	Ganglion	355	-	
GP26	L systémique CD30+	Ganglion	917	+	
LP27	Sain	Lymphocytes frais	319	+	
LP28	Sain	Lymphocytes frais	528	+	
LP29	Sain	Lymphocytes frais	511	+	
LP30	Sain	Lymphocytes frais	370	+	

Tableau 5 : Bilan des extractions d'ARN

3.3 PCR Raf : absence d'ADN génomique dans les extractions d'ARN

L'absence d'ADN génomique dans les préparations d'ARN est contrôlée par PCR avec des amorces pour le gène Raf⁸³. Le système est le suivant :

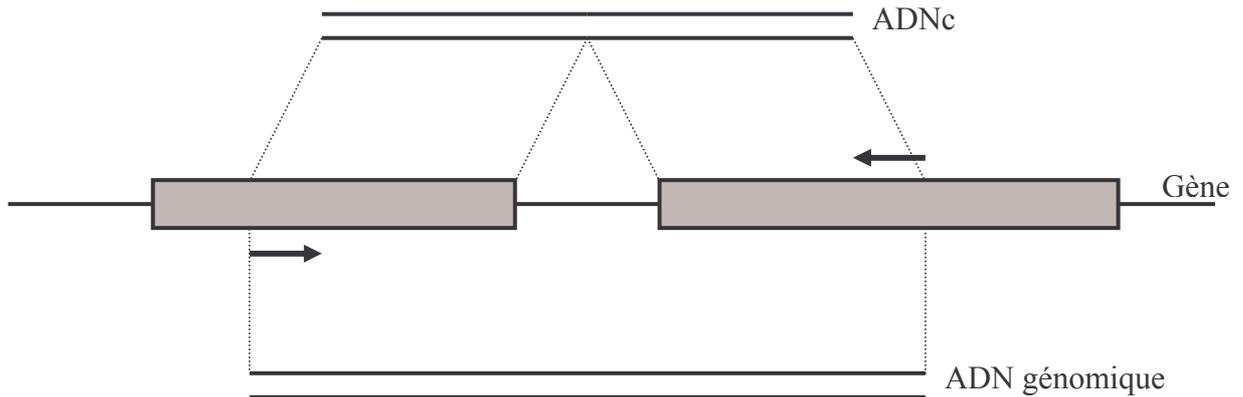


Figure 6 : Schéma de la PCR Raf

Les amorces choisies sont situées de part et d'autre d'un intron de 100 pb. La taille du produit de PCR varie en fonction de la matrice :

- En présence d'ADN génomique, l'intron est présent, le produit de PCR est de 249 pb.
- En présence d'ADNc, l'intron est absent et le produit de PCR est de 149 pb.

Amorce Raf exon 8 : 5'GATGCAATTCGAAGTCACAGCG 3' T_m = 66°C
 Amorce Raf exon 9: 5' TTTTCTCCTGGGTCCCAGATA 3' T_m = 62°C

Figure 7 : Séquences des amorces Raf

Lorsqu'une préparation d'ARN contient également de l'ADN génomique, les deux bandes sont visibles. L'amplification comporte 35 cycles donc en cas d'absence du fragment le plus long, nous pouvons considérer la préparation d'ARN exempte d'ADN génomique.

La photo ci-dessous montre les résultats obtenus pour des extractions d'ARN réalisées selon la technique solution D. Aucune trace d'ADN génomique n'est détectée.

Toutes les préparations d'ARN sont ainsi contrôlées et aucune présence d'ADN génomique n'a été montrée après le traitement des ARN à la DNase I.

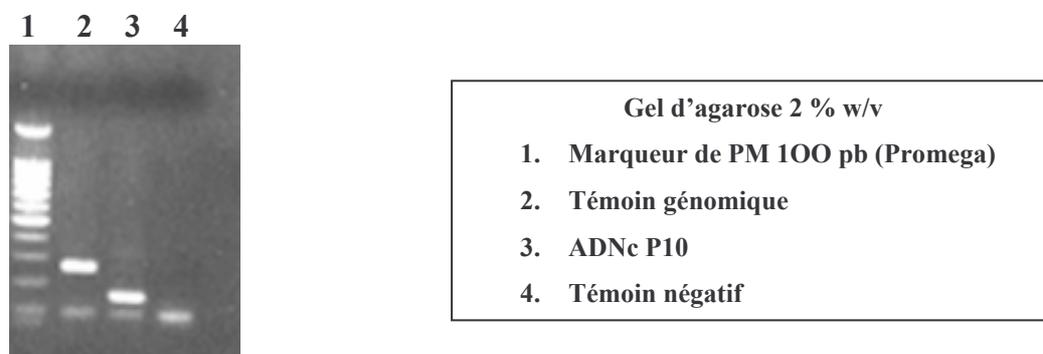


Figure 8 : Test d'absence d'ADN génomique dans une préparation d'ARN

3.4 Synthèse des ADNc par la technique SMART ⁷⁷

Cette technique comporte une étape d'amplification lors de la synthèse du second brin d'ADNc. Les prélèvements tumoraux sont rares et souvent de petite taille, donc précieux. Par cette approche, il est donc possible de travailler à partir de faibles quantités d'ARN totaux.

La synthèse du premier brin d'ADNc est réalisée sur 1 µg d'ARN totaux, par transcription inverse à partir d'une amorce CDS contenant un oligo(dT) ancré ainsi qu'une séquence de 25 résidus contenant un site de restriction *RsaI*. L'oligo(dT) ancré permet de faire la transcription inverse de l'ensemble des ARN poly A. Les 25 résidus en 5' seront utilisés ultérieurement lors de la digestion par *RsaI* et lors des étapes de PCR. Lorsque la transcriptase inverse arrive en fin de matrice, elle ajoute une série de C. L'amorce SMART II s'hybride alors à la série de C et la synthèse du premier brin d'ADNc se poursuit jusqu'à la fin de l'amorce. Finalement chaque ADNc premier brin contient à ces extrémités les séquences des amorces CDS et SMART II. L'amorce SMART II contient également un site de restriction *RsaI*.

Amorce CDS : 5' AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT₍₃₀₎N₁N 3'

Amorce SMART II : 5' AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG 3'

Site de restriction *RsaI*

Figure 9 : Amorces utilisées lors de la synthèse de l'ADNc - technique SMART

La synthèse du second brin est réalisée par PCR avec l'amorce 5' PCR Primer. Le nombre de cycles pour cette PCR doit être optimisé à chaque expérience. La figure suivante représente les résultats obtenus pour un échantillon à différents cycles. La PCR doit être arrêtée avant qu'elle n'arrive à sa phase de plateau. Le nombre de cycles choisi dans l'exemple suivant est de 21 cycles pour P10 et pour PHA.

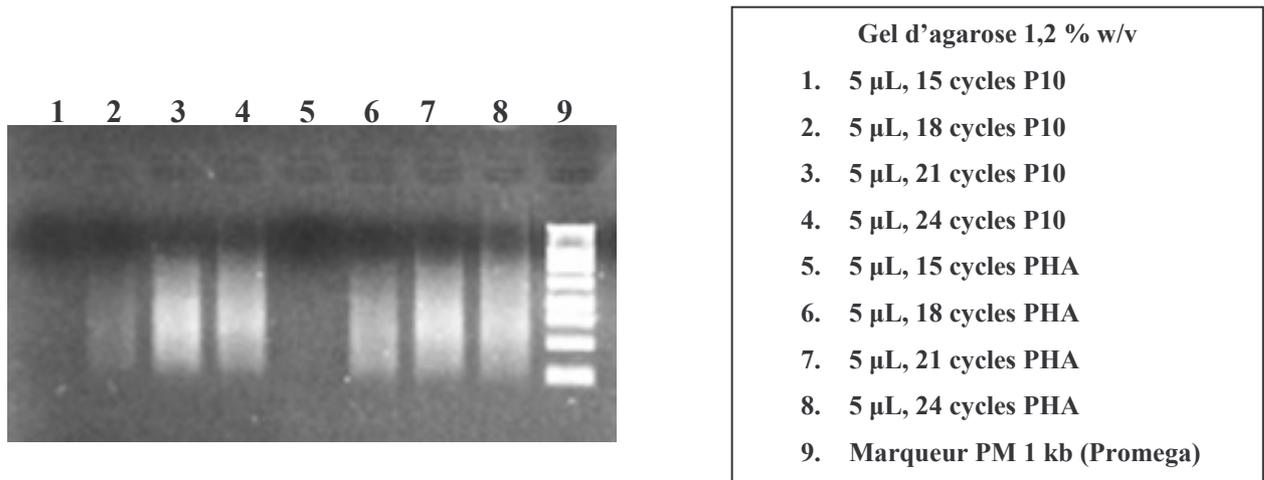


Figure 10 : Choix du nombre de cycles lors de la LD-PCR

Pour les différents échantillons utilisés lors de ma thèse, le nombre de cycles optimal varie entre 19 et 24 cycles pour la synthèse du second brin d'ADNc.

Les produits de SMART sont ensuite purifiés sur des colonnes CHROMA SPIN 1000. Cette étape permet d'éliminer les amorces et les nucléotides non incorporés.

3.5 Digestion par *RsaI*

Les ADNc *tester* et *driver* sont digérés en parallèle par l'enzyme de restriction *RsaI*. Cette étape génère des fragments d'environ 500 pb. Ceci permet de normaliser les différents gènes, leur cinétique lors des étapes d'hybridation sera indépendante de leur taille. La digestion des ADNc est vérifiée par migration sur gel d'agarose avant et après digestion. Avant digestion, l'ADNc obtenu par la technique SMART correspond à une traînée qui monte jusqu'à environ 10 kb. Après digestion par *RsaI*, la traînée ne monte pas au-delà de 3 kb.

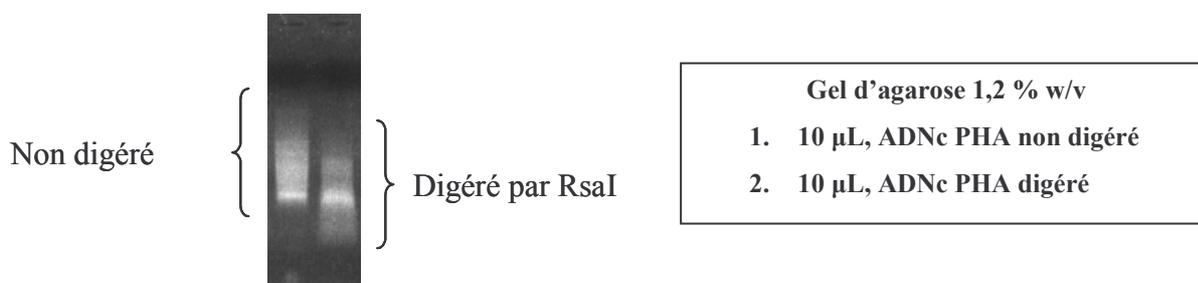


Figure 11 : Contrôle de la digestion par *RsaI*

A cette étape l'ADNc *driver* est terminé.

C'est après cette étape que les soustractions SSH 3, SSH 4 et SSH 6 sont abandonnées. Le matériel observé sur ce gel était en trop faible quantité pour les ADNc *tester* et *driver*.

3.6 Ligation des adaptateurs

La ligation des adaptateurs est réalisée uniquement sur l'ADNc *tester* (tumoraux). Cette étape permet de fixer des adaptateurs partiellement double brin (1 ou 2R) aux extrémités 5' et 3' de chaque molécule d'ADNc. Les ADNc *tester* sont divisés en deux fractions équivalentes. Chaque fraction est liée avec un type d'adaptateur, 1 ou 2R. Nous obtenons ainsi deux populations d'ADNc *tester* : *tester-1* (T-1) et *tester-2R* (T-2R).

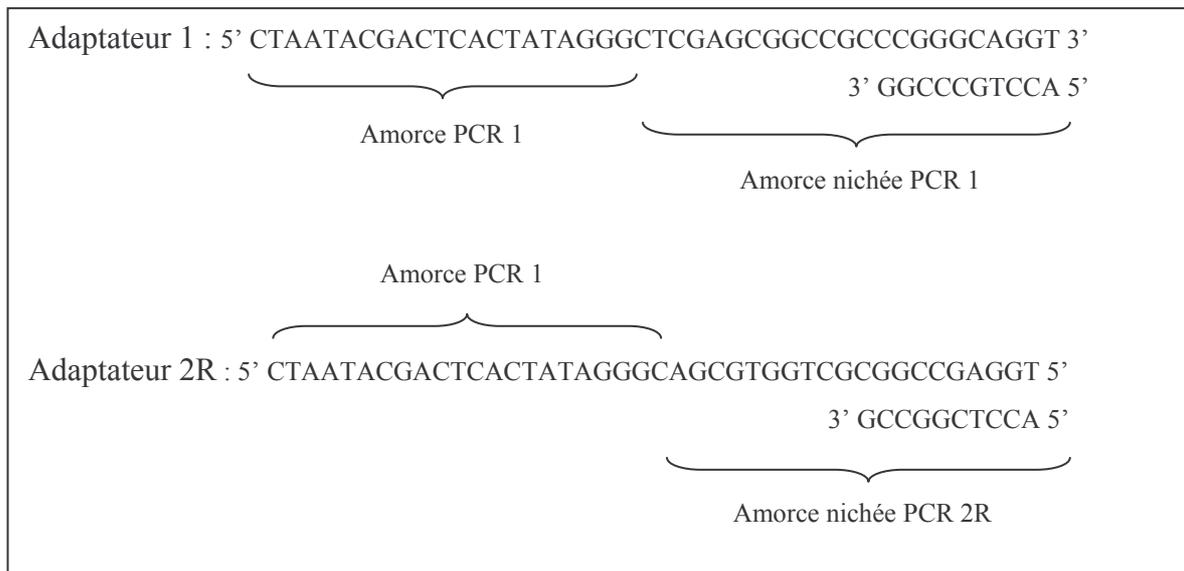


Figure 12 : Adaptateur lié à l'ADNc tumoral

Afin de vérifier l'efficacité de ligation des adaptateurs, deux PCR sont réalisées pour chaque ADNc *tester*.

- La première, avec les amorces du gène de la G3PDH, correspond à l'ensemble des ADNc G3PDH liés ou non avec un des adaptateurs (cf. piste B et D).
- La seconde avec une des amorces G3PDH (5' ou 3') et l'amorce PCR 1 correspond à l'ensemble des ADNc G3PDH liés à un des adaptateurs. La piste A correspond au *tester-1*, la piste C au *tester-2R*.



Figure 13 : Ligation des adaptateurs - schéma d'une molécule d'ADNc après ligation avec l'adaptateur 1 - position des amorces G3PDH 3' et PCR 1



Figure 14 : Ligation des adaptateurs - schéma d'une molécule d'ADNc après ligation avec l'adaptateur 2R - position des amorces G3PDH 5' et PCR 1

L'efficacité de ligation est estimée pour chaque *tester* en comparant les signaux obtenus : piste A et B pour le *tester-1* et piste C et D pour le *tester-2R*. Il faut qu'au moins 25 % des molécules soient liées avec un des adaptateurs.

Dans l'exemple ci-dessous (P3, SSH 7), 50 % des molécules sont liées à l'adaptateur 1 ou 2R.

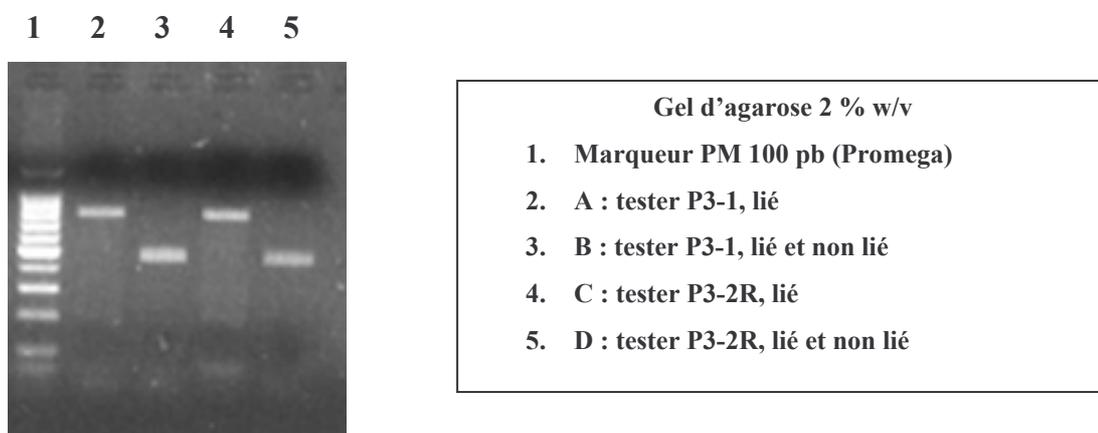


Figure 15 : Ligation des adaptateurs - gel d'agarose 2 % w/v

Pour les différentes SSH réalisées, nous n'avons pas eu de problème lors de la ligation des adaptateurs.

SSH 1	SSH 2	SSH 5	SSH 7	SSH 8
75%	40%	40%	50%	30%

Tableau 6 : Efficacité de ligation des différentes SSH

3.7 Hybridations et amplifications

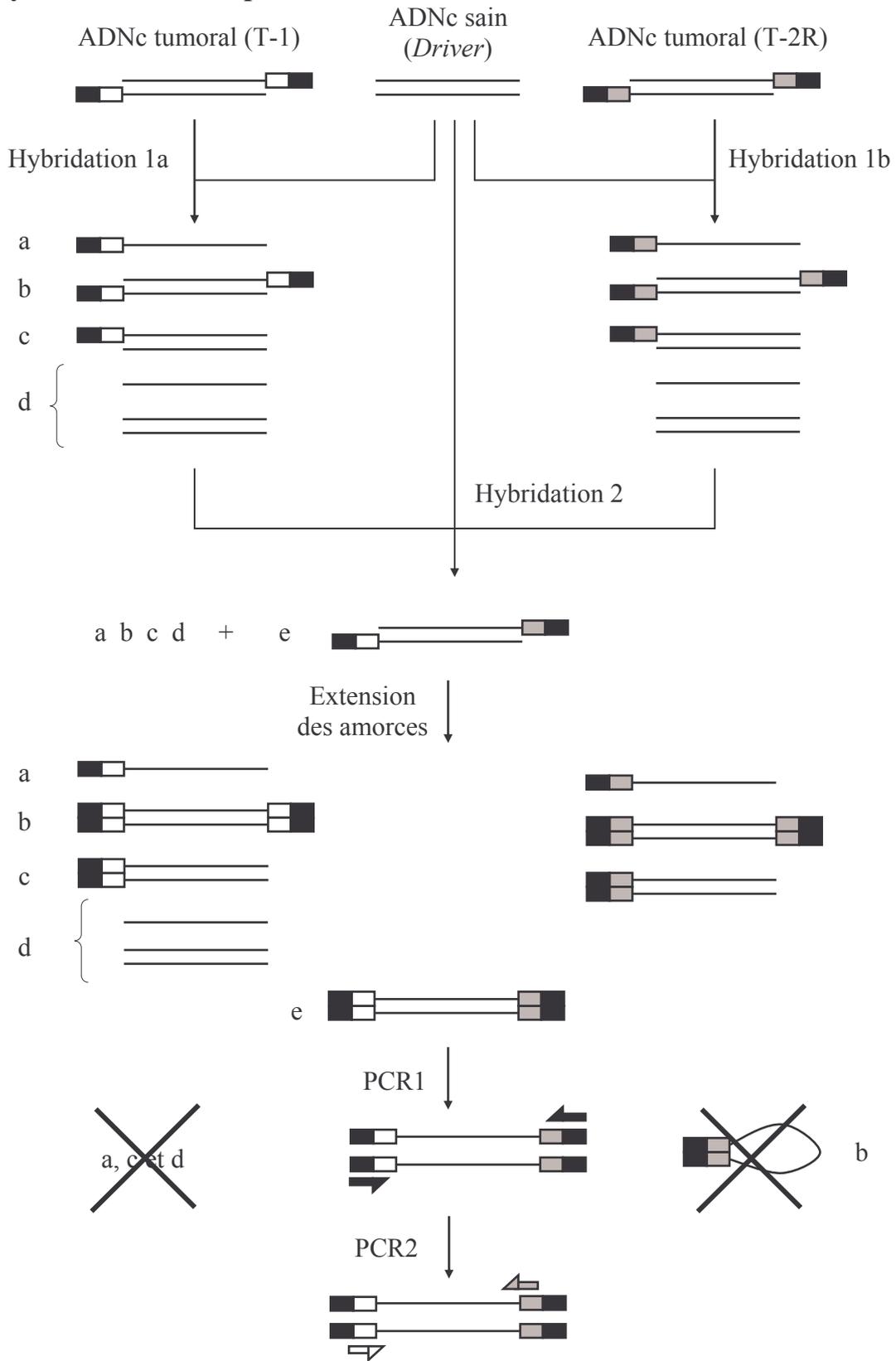


Figure 16 : Hybridation soustractive suppressive

3.7.1 Hybridation 1 et 2

Après dénaturation, deux premières hybridations (1a et 1b) sont réalisées en parallèle. Elles se font entre le *tester*-1 (ADNc tumoral lié à l'adaptateur 1) et un excès de *driver* (ADNc non tumoral), le *tester*-2R et un excès de *driver*.

Ces premières hybridations génèrent différents types de molécules.

- Les molécules de types a et b sont présentes uniquement dans la population tumorale, le type b est fortement représenté alors que le type a est en faible quantité. C'est à cette étape que la normalisation entre les ARN de différentes quantités a lieu. En effet les ADNc abondants dans la tumeur vont former plus facilement des molécules de types b que les ADNc faiblement représentés.
- Les molécules c sont formées d'ADNc présents dans les populations tumorales et non tumorales.
- Les molécules de type d correspondent à l'excès d'ADNc non tumoral.

La seconde hybridation regroupe les deux premières hybridations sans dénaturation préalable. Un excès d'ADNc non tumoral est également ajouté lors de cette hybridation. Cette hybridation permet la formation des molécules de types e. Elles correspondent aux ADNc présents uniquement dans la tumeur, donc aux molécules d'intérêts que nous recherchons.

3.7.2 PCR 1 et 2

Ces étapes permettent une amplification préférentielle des ADNc spécifiques de la tumeur. Deux PCR successives sont réalisées afin d'amplifier les ADNc présents dans la tumeur et absents dans la non-tumeur. Ces PCR sont également réalisées sur le produit de non-soustraction qui correspond à un mélange des *tester* 1 et 2R avant la ligation.

Lorsque nous regardons de plus près les différents types de molécules obtenues après la seconde hybridation, nous avons plusieurs cas de figure :

- Les molécules sans adaptateur (d) ne peuvent être amplifiées.
- Les molécules avec un seul des deux adaptateurs (a et c) sont amplifiées de manière linéaire.
- Les molécules ayant les mêmes adaptateurs aux deux extrémités (b) ne sont pas amplifiées. La cinétique de repliement intramoléculaire est favorisée par rapport à l'hybridation des amorces lors de la PCR. C'est à ce niveau que la suppression se fait.
- Seules les molécules portant à chaque extrémité un adaptateur différent (e) sont amplifiées de manière exponentielle.

Les deux PCR sont contrôlées par migration sur un gel d'agarose.

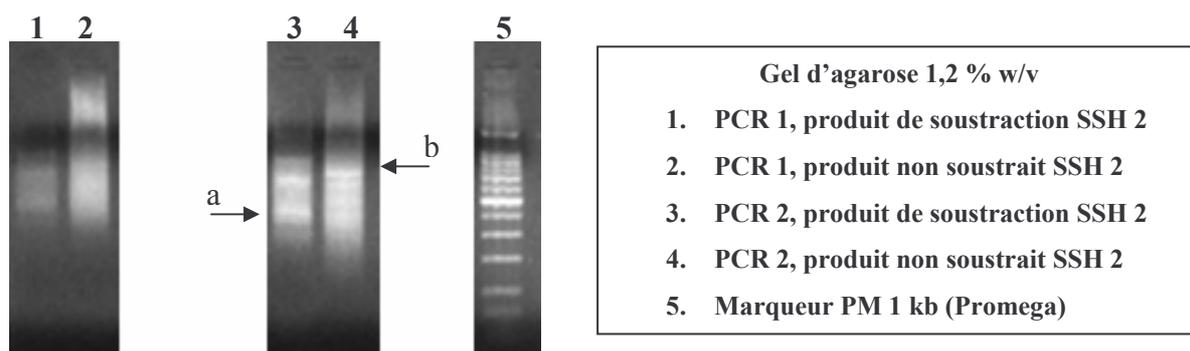


Figure 17 : Amplification des produits de soustraction

En regardant plus attentivement nous observons des bandes majoritaires différentes entre les pistes 3 et 4. Au niveau de la flèche a, on voit une bande majoritaire présente dans le produit soustrait (piste 3) et pas dans le produit non soustrait (piste 4) ; cette bande correspond à un ADNc amplifié par la SSH. A l'opposé, au niveau de la flèche b, on voit un ADNc éliminé par la SSH.

3.8 Efficacité de la soustraction

Afin de vérifier le bon fonctionnement de la soustraction, une PCR semi-quantitative est réalisée avec des amorces spécifiques d'un gène de ménage, la G3PDH. La PCR est réalisée sur le produit de soustraction et le produit non soustrait.

Une différence d'au moins 5 cycles doit être observée entre les deux échantillons. Lorsque ce n'est pas le cas l'expérience est abandonnée à cette étape.

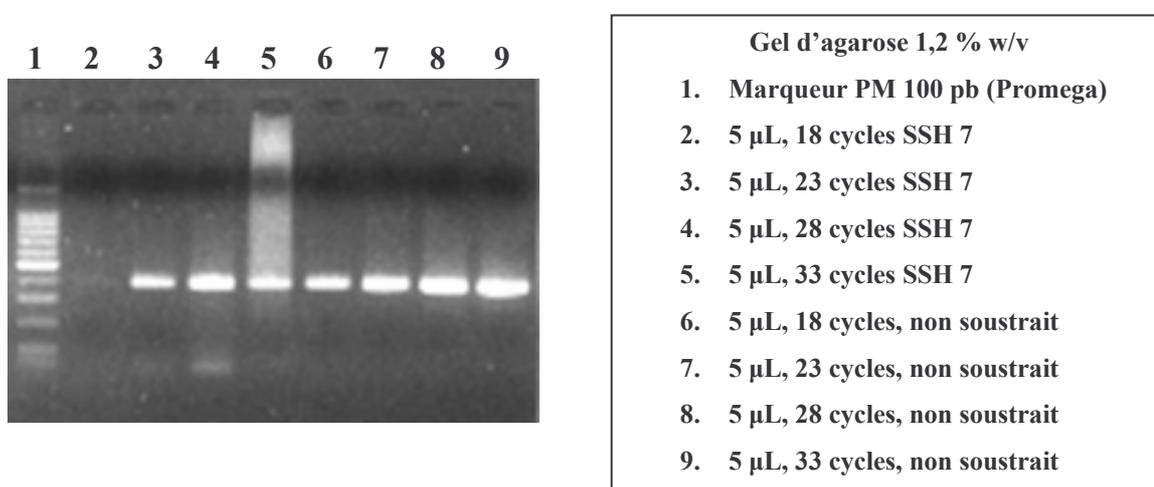


Figure 18 : Efficacité de soustraction - PCR semi-quantitative G3PDH

Bien que la SSH 1 ne présente pas de soustraction, nous avons poursuivi les expériences afin de mettre au point les protocoles de criblage des banques. La SSH 5 est abandonnée à ce niveau, la soustraction étant inexistante.

SSH 1	SSH 2	SSH 5	SSH 7	SSH 8
Aucune	Bonne (5-10 cycles)	Aucune	Bonne (5 cycles)	Bonne (5 cycles)

Tableau 7 : Efficacité de soustraction des différentes SSH

3.9 Clonage

Lorsque l'efficacité de soustraction est validée, le produit de soustraction est cloné dans le plasmide pGEM T Easy Vector. Cette étape permet d'isoler chaque molécule dans un clone bactérien. Le nombre de clones générés lors du clonage pour chaque SSH est donné dans le tableau suivant.

Nom	SSH 1	SSH 2	SSH 7	SSH 8
Nombre de clones	3000	600	1000	1000
Efficacité de transformation	3.10^4 cfu/ μ g	6.10^3 cfu/ μ g	10^4 cfu/ μ g	10^4 cfu/ μ g

Tableau 8 : Nombre de clones générés par clonage des différentes SSH

L'efficacité de transformation est calculée selon la formule suivante : Nombre de clones obtenus / Quantité d'ADN transformé.

Globalement l'efficacité de transformation est reproductible d'une SSH à l'autre.

3.10 Commentaire des résultats

On considère que dans une cellule, 10 à 20 % des gènes sont exprimés, soit 3000 à 6000 gènes. Parmi ces gènes seulement 10 % sont spécifiques d'un type cellulaire, soit 300 à 600 gènes ⁶⁸. Le nombre de clones obtenus par SSH, de l'ordre de 1000, est théoriquement suffisant pour étudier l'ensemble des gènes conférant à une cellule sa spécificité fonctionnelle et structurale.

La technique de SSH permet, théoriquement, l'étude des gènes fortement et faiblement exprimés grâce à l'étape de normalisation qui intervient lors de la première hybridation. C'est pourquoi les étapes de digestion et de ligation des adaptateurs sont critiques pour une bonne soustraction. Un article, récemment publié décrit des améliorations possibles pour cette technique. Les auteurs proposent de purifier les molécules d'ADNc *tester* qui sont liées aux adaptateurs. Ainsi l'efficacité de la SSH s'en trouve augmentée ⁷⁹.

Sur les huit soustractions réalisées pendant cette thèse, plusieurs ont été abandonnées :

- Les SSH 3, 4 et 6 en raison de la faible quantité d'ADNc après la digestion par *RsaI*.
- La SSH 5 parce que l'efficacité de soustraction n'était pas bonne. En effet, l'analyse par PCR semi-quantitative sur le gène G3PDH n'a pas montré de différence entre le produit soustrait et le produit non soustrait.

Les autres SSH vont maintenant être criblées afin de sélectionner les gènes à séquencer.

4 CRIBLAGE DES BANQUES ET SEQUENÇAGE

4.1 Introduction

Les banques de soustractions contiennent également des gènes non spécifiques de la tumeur. Afin d'éliminer ces faux positifs, un criblage est réalisé sur l'ensemble des clones de chaque banque.

Chaque clone est déposé sur une membrane et les membranes sont fabriquées en deux exemplaires. Sur chaque membrane, une sonde spécifique de l'ensemble des ADNc tumoraux ou non tumoraux est hybridée. Les signaux sont comparés et seuls les clones qui présentent un signal avec la sonde tumorale et pas de signal avec la sonde non tumorale sont sélectionnés.

4.2 Sonde radiomarquée

Deux techniques différentes de marquage ont été utilisées. La première est la transcription inverse des ARN en ADNc, en incorporant du dCTP α 32 P. La seconde est la technique d'amorçage multiple ou *Random Priming* par incorporation du dCTP α 32 P directement dans l'ADNc produit par la technique SMART.

Sondes par transcription inverse				Sondes par <i>Random Priming</i>			
SSH 1		SSH 2		SSH 7		SSH 8	
P3	LP7	P10	PHA	P3	L1	P11A	L1
18%	10%	13%	18%	43%	36%	60%	36%

Tableau 9 : Pourcentages d'incorporation du radio élément

La technique par amorçage multiple donne de meilleurs taux d'incorporation. De plus, nous avons plus de sonde pour une même quantité d'ARN car la technique SMART contient une étape d'amplification par PCR. Quelle que soit la technique employée pour le marquage, 1,5 millions de cpm par mL de solution sont hybridés pour une membrane.

4.3 Criblage à partir des clones bactériens

4.3.1 Réalisation des membranes

Deux cent vingt sept clones sont organisés selon une grille orientée, dans des boîtes de 14 cm de diamètre. Les boîtes sont réalisées en simple pour la SSH 1 et double pour la SSH 2. Après avoir fait pousser les bactéries, une membrane est déposée sur la boîte de culture et les bactéries adhèrent à la membrane. Dans le cas de la SSH 2, nous n'avons pas obtenu deux membranes identiques car l'étape de transfert des bactéries vers la membrane n'est pas reproductible. Cette technique a été utilisée au début de nos travaux pour les SSH 1 et 2. Le tableau ci-dessous regroupe les différentes membranes réalisées pour les SSH 1 et SSH 2.

SSH 1 (454 clones)		SSH 2 (432 clones)	
Membrane A	Membrane B	Membrane A1	Membrane B1
		Membrane A2	Membrane B2

Tableau 10 : Nom des membranes pour les SSH 1 et 2

4.3.2 Hybridation des sondes radioactives

Pour la SSH 1, une première hybridation est réalisée :

- Membrane A + sonde LP7
- Membrane B + sonde P3

Les sondes sont ensuite deshybridées et réhybridées de manière croisée :

- Membrane A + sonde P3
- Membrane B + sonde LP7

L'analyse des quatre films d'autoradiographie a permis de sélectionner 61 clones.

	Signal tumeur > Signal non-tumeur	Signal tumeur < ou = Signal non-tumeur
Membrane A	7 clones	1 clone
Membrane B	51 clones	2 clones

Tableau 11 : Nombre de clones sélectionnés - SSH 1

La figure suivante montre les films d'autoradiographie pour la membrane B de la SSH 1. Les flèches rouges pointent des clones plus exprimés dans la tumeur, la flèche bleue correspond à un des faux positifs que nous avons sélectionné.

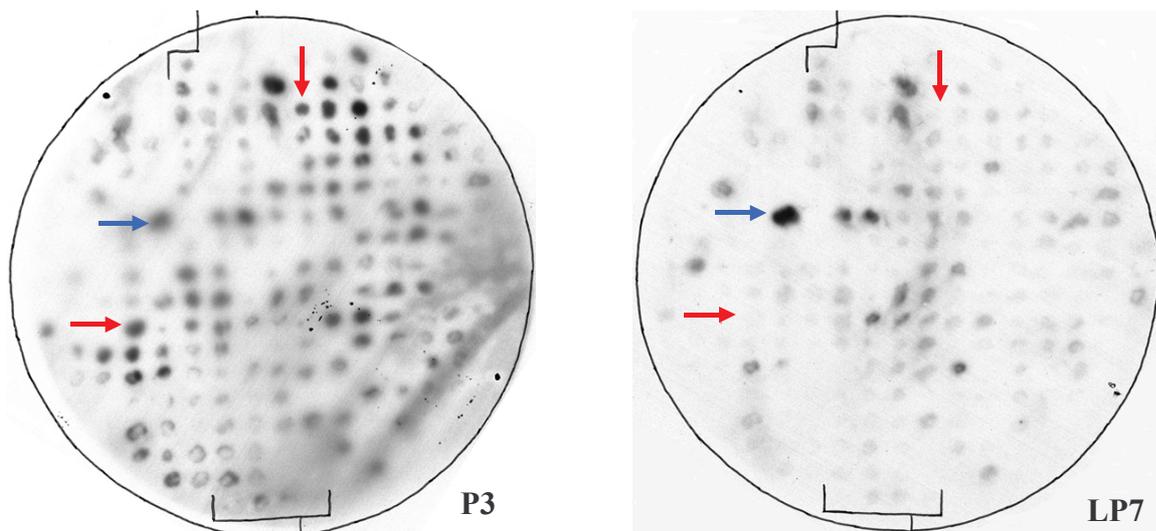


Figure 19 : Membrane B pour la SSH 1 - film d'autoradiographie

Pour la SSH 2, une première série d'hybridations est réalisée :

- Membranes A1 et B1 + sonde P10
- Membranes A2 et B2 + sonde PHA

Les sondes sont ensuite deshybridées des membranes et réhybridées de manière croisée :

- Membrane A1 et B1 + sonde PHA
- Membrane A2 et B2 + sonde P10

L'analyse des films d'autoradiographie a permis de sélectionner 36 clones issus de la membrane A et 60 clones de la membrane B.

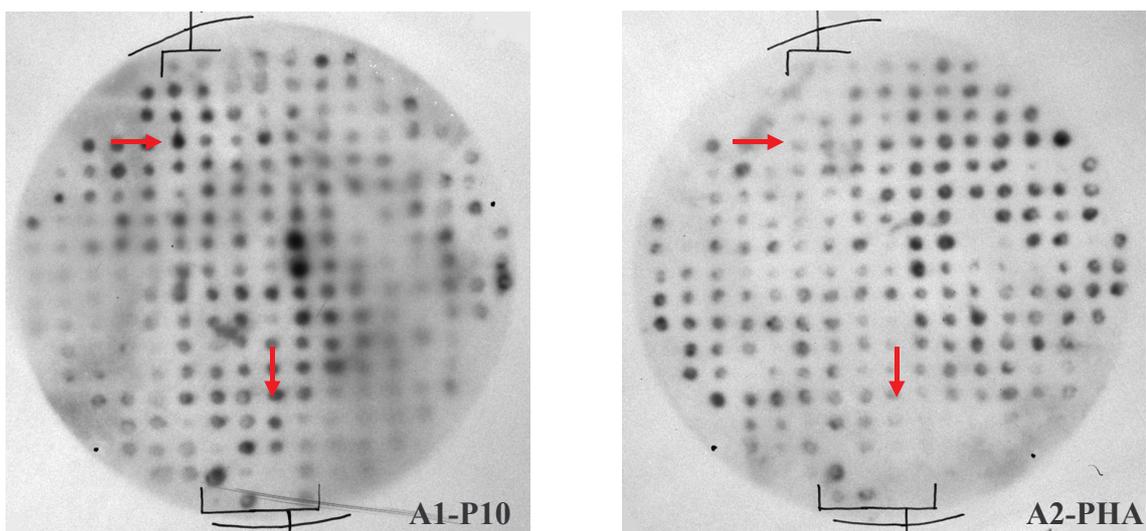


Figure 20 : Membrane A pour la SSH 2 - film d'autoradiographie

La technique utilisée pour ces membranes a induit environ 30 % de clones non interprétables à cause de l'hétérogénéité du transfert des clones bactériens sur la membrane.

4.4 Criblage à partir des ADNc soustraits

La technique à partir des clones bactériens n'a pas généré les résultats attendus. Nous nous sommes donc réorienté vers la technique de Dot Blot en format 96 puits qui sont réalisés à partir de produits de PCR correspondant aux gènes d'intérêts. Cette technique a été utilisée pour les SSH 7 et 8. Les membranes au format 96 dot sont réalisées en double (a et b) :

- Pour la SSH 7, huit membranes sont réalisées, soit 768 clones.
- Pour la SSH 8, six membranes sont réalisées, soit 576 clones.

Les membranes « a » sont hybridées avec la sonde tumorale utilisée pour la soustraction (P3 pour la SSH 7 et P11A pour la SSH 8) et les membranes « b » avec la sonde non tumorale (L1 pour les SSH 7 et 8). Chaque signal est quantifié par deux expérimentateurs indépendants sur une gamme de 1 à 5. La sélection d'un clone est réalisée par comparaison des valeurs obtenues pour les deux types de sondes : un clone qui présente une valeur forte avec la sonde tumorale et une valeur faible avec la sonde non tumorale sera donc sélectionné.

La comparaison des signaux a permis de sélectionner 49 clones pour la SSH 7 (P3 - L1) et 143 clones pour la SSH 8 (P11A - L1). Nous avons volontairement utilisé des conditions plus stringentes pour la SSH 7 (P3 - L1) car nous avons déjà séquencé 61 clones lors de la SSH 1 (P3 - LP7). La figure suivante montre un des films d'autoradiographie, les flèches rouges pointent des clones sélectionnés. Grâce à la technique des Dot Blot nous pouvons analyser l'ensemble des gènes déposés sur les membranes.

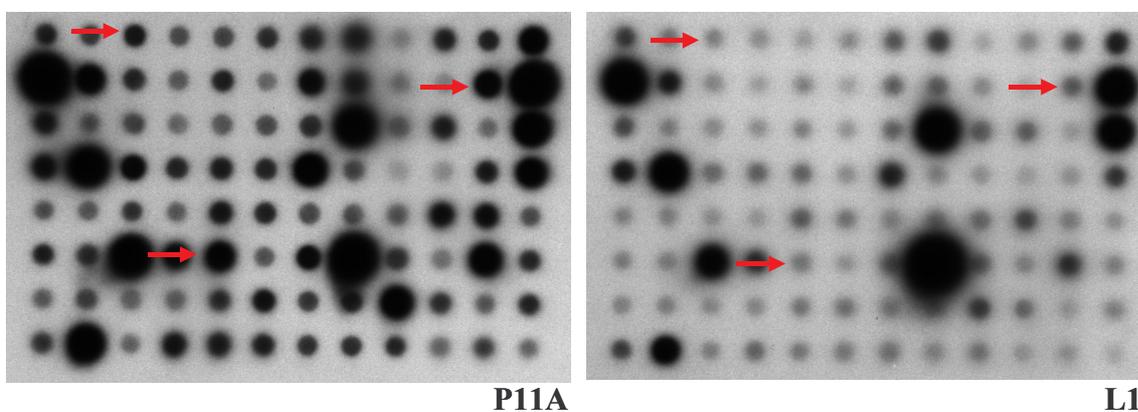


Figure 21 : Membranes H3 a et b pour la SSH 8 - film d'autoradiographie

4.5 Séquençage

A la suite du criblage des différentes banques, nous avons séquencé environ 20 % des clones pour chaque tumeur étudiée.

SSH 1	SSH 2	SSH 7	SSH 8
13,40%	22,20%	6,40%	24,80%

Tableau 12 : Pourcentages de clones sélectionnés pour les différentes SSH

Dans un premier temps, le séquençage des clones a été réalisé dans le laboratoire (SSH 1) à l'aide du kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems).

Dans un second temps, nous avons utilisé les services de la société Genome express qui possède les robots nécessaires au séquençage en format 96 puits.

Les séquences brutes sont corrigées à l'aide du logiciel Sequencing Analysis 3.3 (PE Applied Biosystems), les zones du vecteur sont éliminées et les séquences ainsi nettoyées sont alignées avec la banque nr (banque non redondante) par le logiciel en ligne BLAST, sur le site du NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/)⁸⁴.

Les résultats des alignements BLAST sont présentés dans les tableaux suivants.

SSH 1 - Résultat de Blast (nr)	Nombre / 61	%
Desmoglein 3 : <i>molécule d'adhésion</i>	1	1,6
BAC clone CTB-94H21 from 7q21-q22	1	1,6
Kallikrein 6 : serine protease	1	1,6
Musculin (activated B-cell factor-1)	1	1,6
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	1	1,6
Humanin (HN1) / mitochondrion	1	1,6
Prothymosin alpha	1	1,6
Guanylyltransferase and 5'-phosphatase (RNGTT) / capping enzyme (HCE)	1	1,6
p120 catenin isoform 1A (CTNND1)	1	1,6
Cornifin : small proline-rich protein 1B	3	4,9
Viral-cellular fusion mRNA with Human papillomavirus type 68 E6 and E7 genes, and Homo sapiens APM-1 gene	1	1,6
U2 snRNA (RNU2) gene	1	1,6
Chromosome 19 - cosmid f21246	1	1,6
Chromosome 11q clone:RP11-718B20	1	1,6
DNA for Ig gamma heavy-chain, membrane-bound-type and secrete-type	1	1,6
Mitochondrion	1	1,6
Chromosome 11q clone:RP11-718B20,	1	1,6
Chromosome 11p13 Contains the HIPK3 gene for homeodomain-interacting protein kinase 3	1	1,6
THW gene : transmembrane protein	1	1,6
NF-kappa-B p65 subunit : transcription factor	1	1,6
cDNA DKFZp762H106 (from clone DKFZp762H106)	1	1,6
Chromosome 14 clone RP11-58H3 map 14q31	1	1,6
ribosomal DNA complete repeating unit / 18S rRNA gene / non-functional folate binding protein	10	16,4
Kératine 6	20	32,8
Keratin 16 (KRT16A) gene	1	1,6
Mauvaise séquence	6	8,2
	61	100

Tableau 13 : Séquençage des clones de la SSH 1 - blast nr

SSH 2 - Résultat de Blast (nr)	Nombre / 96	%
Mauvaise séquence	8	8,3
SPARC / Osteonectin	3	3,1
Fibronectin	7	7,3
Actin Alpha	2	2,1
Proteoglycan	1	1,0
Filamin	1	1,0
Collagen 1	1	1,0
Collagen 3	1	1,0
Dermatopontin	1	1,0
hn-RNP E2	1	1,0
Discoidin / DDR2	1	1,0
Macroglobulin Alpha 2	2	2,1
CIN 85	1	1,0
Interferon Gamma inductible	3	3,1
Small Inductible Cytokine chemokine	1	1,0
GPNMB	1	1,0
Phospholipase A2	3	3,1
Ribonuclease	3	3,1
Mitochondrie / Cytochrome	8	8,3
"TGF bêta 3"	1	1,0
Folate R2	1	1,0
HLA class II/ CMH	5	5,2
Immunoglobulin	35	36,5
ARN 18 S	3	3,1
Clones non déterminés	2	2,1
	96	100,0

Tableau 14 : Séquençage des clones de la SSH 2 - blast nr

SSH 7 - Résultat de Blast (nr)	Nombre / 49	%
major histocompatibility complex, class II, DR beta 5 (HLA-DRB5)	1	2,0
CD74 antigen	2	4,1
BAC clone RP11-527F13 from 6	1	2,0
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	1	2,0
protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP) (PI3)	2	4,1
small proline-rich protein 1 (SPRR1A)	1	2,0
small proline-rich protein 2E (SPRR2E) proline rich protein (sprII) mRNA	1	2,0
S100 calcium-binding protein A7 (psoriasin 1)	4	8,2
H4 histone family, member G (H4FG)	1	2,0
DAZ associated protein 2 (DAZAP2)	1	2,0
Mauvaise séquence	4	8,2
keratin 6	15	30,6
non-functional folate binding protein / ribosomal DNA complete repeating unit / 18S ribosomal rRNA	15	30,6
	49	100,0

Tableau 15 : Séquençage des clones de la SSH 7 - blast nr

SSH 8 - Résultat de Blast (nr)	Nombre / 143	%
Hypothetical protein FLJ23277	1	0,7
CD2 antigen (p50)	1	0,7
heat shock 70kD protein 8	3	2,1
protein disulfide isomerase-related protein	1	0,7
clone 016b10 My016	1	0,7
Chaperonin 10	2	1,4
oncprotein 18 (Op18)	2	1,4
HSPC016	1	0,7
glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	4	2,8
ubiquitin A-52	1	0,7
NADH:ubiquinone oxidoreductase MLRQ subunit	1	0,7
beta 2-microglobulin	6	4,2
Cyclophilin A : peptidylprolyl isomerase A	4	2,8
enolase 1	1	0,7
BCL11B : B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)	1	0,7
chromosome 17, clone 84 E 24	1	0,7
pituitary tumor-transforming 1 (PTTG1)	1	0,7
CD3D antigen : 20 K T3 glycoprotein of T-cell receptor	2	1,4
L-plastin : lymphocyte cytosolic protein 1	1	0,7
Ribosomal protein L4	1	0,7
clone RP11-173B14 on chromosome 13	1	0,7
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced)	1	0,7
activated RNA polymerase II transcription cofactor 4 (PC4)	1	0,7
Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2, (PSMB2) / proteasome subunit HsC7-I	1	0,7
Era GTPase B protein (HERA-B)	1	0,7
ribosomal protein L30	1	0,7

Suite SSH 8 - Résultat de Blast (nr)	Nombre / 143	%
annexin A5 (ANXA5) / placenta anticoagulant protein PP4 / lipocortin-V	1	0,7
Ig divers	19	13,3
HLA-DR alpha	18	12,6
HLA-DR beta 1	2	1,4
MHC class II HLA-DR7-associated glycoprotein beta- chain	1	0,7
human DS glycoprotein alpha subunit from the HLA-D	3	2,1
CD74 antigen	1	0,7
HLA-SB(DP) alpha	1	0,7
HLA DM alpha	1	0,7
H2A histone family, member Z (H2AFZ)	11	7,7
H4 histone family, member G (H4FG)	3	2,1
Mauvaise séquence	17	11,9
peroxiredoxin 3 (PRDX3), nuclear gene encoding mitochondrial protein / mRNA for Apo1_Human (MER5(Aop1-Mouse)-like protein)	3	2,1
actin, gamma 1	1	0,7
arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP), mRNA / five-lipoxygenase activating protein (FLAP)	1	0,7
ribosomal protein S4, X-linked / ribosomal protein L41 mRNA	1	0,7
activator of S phase kinase (ASK) / DBF4-like protein (DBF4) mRNA	1	0,7
G protein-coupled receptor 64 (GPR64) / mRNA for HE6 Tm7 receptor	1	0,7
splicing factor, arginine/serine-rich 3 / pre-mRNA splicing factor (SFRS3)	1	0,7
mRNA similar to Fc epsilon receptor beta subunit / membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4 (MS4A4) / HDCME31P mRNA	1	0,7
genomic DNA, chromosome 21q21.2, LL56-APP region,	1	0,7
cofactor A protein mRNA / tubulin-specific chaperone a (TBCA)	1	0,7
Ribosomal protein L7a (RPL7A), mRNA / PLA-X mRNA	1	0,7
thioredoxin 1 (TRX1)	1	0,7
PTD011 mRNA, / TS58 mRNA	1	0,7
fatty acid binding protein 4, adipocyte (FABP4)	1	0,7
ribosomal protein S15a (RPS15A)	1	0,7
testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1) (TEGT)	1	0,7
Chromosome 16 BAC clone CIT987SK-A-355G7	1	0,7
single-stranded DNA-binding protein mRNA (SSBP1)	1	0,7
kinesin superfamily protein KIF1B (KIF1B)	1	0,7
cathepsin C (CTSC) / prepro dipeptidyl peptidase I (DPP-I) gene	1	0,7
calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)	1	0,7
	143	100,0

Tableau 16 : Séquençage des clones de la SSH 8 - blast nr

4.6 Commentaire des résultats

Nous nous sommes intéressés particulièrement aux gènes qui sont retrouvés avec un pourcentage élevé. Le fait d'avoir pour certains gènes un pourcentage aussi élevé montre que la normalisation de la SSH ne se fait pas correctement. Bien que pour une forte surexpression d'un gène donné, nous nous attendions à une certaine redondance. Les autres gènes seront discutés plus amplement dans le chapitre 5.

SSH 1	32,8 % Kératine 6 ; 16,4 % ARN 18S
SSH 7	30,6 % Kératine 6 ; 30,6 % ARN 18S
SSH 2	36,5 % Immunoglobulines
SSH 8	18,2 % HLA + 4,2 % bêta 2 microglobuline

Tableau 17 : Redondance des différentes SSH

4.6.1 SSH 1 et SSH 7

Ces deux SSH présentent une forte redondance pour deux ARN, la kératine 6 et l'ARN ribosomal 18 S. Pour les autres séquences, nous n'avons pas de redondance. Nous retrouvons des gènes structuraux et d'autres fonctionnels.

4.6.1.1 Kératine 6

Les kératines sont des protéines du cytosquelette appartenant à la famille des filaments intermédiaires. Elles regroupent plus de 35 membres et sont exprimées dans les épithéliums, au niveau des kératinocytes. La polymérisation des filaments de kératines débute obligatoirement par la formation d'un hétérodimère comprenant une protéine de type I (acide)

et une protéine de type II (basique)⁸⁵. La kératine 6 (type II) s'associe avec la kératine 16 (type I).

Dans des conditions normales, la kératine 6 a une expression faible et restreinte à des structures bien précises. Elle est absente de l'épiderme et présente dans les différentes annexes cutanées⁸⁶. Par contre son expression est très fortement augmentée et moins restreinte dans les épithéliums stratifiés subissant une différenciation anormale ou une hyperprolifération⁸⁷. Il en est de même dans les cellules jouxtant une plaie ou lors d'un processus de cicatrisation⁸⁸.

De récentes études ont montré que l'expression du gène de la kératine 6 est induite par différentes cytokines impliquées dans l'inflammation, le TNF alpha⁸⁹, l'EGF et le TGF alpha⁹⁰, l'IL-1⁹¹, Interféron gamma⁹². Dans cette dernière étude, les auteurs ont montré que l'expression de la kératine 6 par l'INF gamma nécessite l'intervention de l'IL-1 alpha et des facteurs de transcriptions NF Kappa B et STAT1.

Ces différentes observations laissent penser que la kératine 6 a non seulement un rôle structural, mais également un rôle dans le processus de différenciation de la peau.

Dans le cas d'un LCP CD30+, des lymphocytes localisés dans le derme prolifèrent de manière anarchique. Les kératinocytes de l'épiderme se trouvent alors dans un environnement prolifératif qui peut induire, par effet paracrine, l'expression anormale de la kératine 6 dans les cellules épidermiques.

La présence de plus de 30 % de kératine 6 dans les SSH 1 et 7 peut s'expliquer par plusieurs hypothèses. Lors de la préparation des échantillons, nous avons éliminé l'épiderme à l'aide d'un scalpel mais nous n'avons pas éliminé les annexes cutanées présentes dans le derme, en particulier les annexes sudoripares ou pilo-sébacées puisque nous n'avons pas observé d'annexe sébacée sur les coupes de tissu. De plus, la macrodissection au scalpel n'a peut être pas permis d'éliminer totalement l'épiderme.

Le fait que nous ne retrouvions pas la kératine 6 dans les SSH 2 et 8 étaye ces hypothèses. Le prélèvement P10 (SSH 2) ne contient pas d'épiderme, la tumeur était localisée dans le derme profond. Le prélèvement P11A (SSH 8) correspond quant à lui à une extension extracutanée, au niveau d'un ganglion, d'un LCP CD30+. L'expression de la kératine 6 au niveau des cellules épidermiques sera vérifiée ultérieurement par les expériences de microdissection et de PCR quantitative.

Nous pouvons nous interroger sur la signification biologique de ces résultats. La surexpression de la kératine 6 dans les cellules épidermiques en regard d'un LCP CD30+ est-elle uniquement une conséquence du lymphome ou influence-t-elle également le développement de ce dernier ?

Dans tous les cas, ce résultat permet de valider les expériences de SSH car la kératine 6 est absente des lymphocytes sanguins utilisés comme *driver*.

4.6.1.2 ARN ribosomal 18 S

La présence de 16 % pour la SSH 1 et de 30 % pour la SSH 7 d'ARN ribosomal 18 S est lié à la séquence même de cet ARN. Il contient en différents endroits des répétitions de A, régions où l'oligonucléotide CDS peut s'hybrider partiellement et initier la transcription inverse. Notre résultat s'explique également du fait que l'expression des gènes des ARNr est régulée par des hormones tel que les glucocorticoïdes ⁹³ et par des facteurs de croissance tels que le FGF ⁹⁴. Ces processus apparaissent fortement modifiés dans les cellules transformées qui possèdent des nucléoles (lieux de fabrication des ribosomes) de morphologies différentes, aussi bien au niveau de leur taille, de leur nombre, de leur forme que de leur structure ⁹⁵.

```

CCGTCCGTCCGTCCGTCCCTCGCTTGCGGGGCGCCGGGCCCGTCCGAGCCCCNNNNNCCGTCCGGC
CGCGTCGGGGCCTCGCCGCGCTCTACCTACCTACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGCATATGCTTGTCTCAA
AGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTACGCACGGCCGGTACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGT
TATGGTTCCCTTTGGTCGCTCGCTCCTCTCCTACTTGATAACTGTGGTAATCTAGAGCTAATACATGCC
GACGGGCGCTGACCCCCCTTCGCGGGGGGGATGCGTGCATTTATCAGATCAAAAACCAAACCCGGTCAGCCCC
TCTCCGGCCCCGGGGGGGGCGGGCCGGCGGCTTTGGTGAAGTCTAGATAACCTCGGGCCGATCGCAC
GCCCCCGTGGCGGCGACGACCCATTTCGAACGTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGTCGCCGTGCCTA
CCATGGTGACCACGGGTGACGGGGAATCAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCAC
ATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCACTCCCAGCCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAA
TACAGGACTCTTTTCGAGGCCCTGTAATTTGGAATGAGTCCACTTTAAATCCTTTAACGAGGATCCATTGGA
GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGCTGCAGTTAA
AAAGCTCGTAGTTGGATCTTGGGAGCGGGCGGGCGGTCCGCCGAGGCGAGCCACCGCCCGTCCCCGCC
CCTTGCCCTCTCGGCGCCCCCTCGATGCTCTTAGCTGAGTGTCCCGGGGGCCGAAGCGTTTACTTTGAA
AAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCCGAGCCGCTTGATAACCGCAGCTAGGAATAATGGAATAGGACCGC
GGTTCTATTTTGGTTGGTTTTTCGGAAGTGGAGCCATGATTAAGAGGGACGGCCGGGGCATTTCGTATTGCG
CCGCTAGAGGTGAAATTCCTTGGACCGGCGCAAGACGGACCAGAGCGAAAGCATTTCGCAAGAATGTTTTT
ATTAAATCAAGAACGAAAAGTTCGGAGGTTTCGAAGACGATCAGATACCGTTCGTAGTTCCGACCATAAACGATG
CCGACCGGCGATGCGGCGGGCTTATTTCCCATGACCCGCGGGCAGCTTCCGGGAAACCAAAGTCTTTGGG
TTCCGGGGGGAGTATGGTTGCAAAAGCTGAAACTTAAAGGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAG
CCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCACCCGGCCGGACACGGACAGGATTGACAGATTGA
TAGCTCTTTCTCGATTCCGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGTTA
ATTCGGATAACGAACGAGACTCTGGCATGCTAACTAGTTACGCGACCCCCGAGCGGTTCGGCGTCCCCCAA
CTTCTTAGAGGGACAAGTGGCGTTCAGCCACCCGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGAT
GTCCGGGGCTGCACGCGCTACACTGACTGGCTCAGCGTGTGCTACCCACGCGGAGGCGGGGTA
ACCCGTTGAACCCATTTCGTGATGGGGATCGGGGATTGCAATTATTTCCCATGAACGAGGAATTTCCAGT
AAGTGCGGGTCATAAGCTTGCCTTGGATTAAAGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTTCGCTACTACCGA
TTGGATGGTTTAGTGAGGCCCTCGGATCGGCCCGCGGGGTCGGCCACGGCCTGGCGGAGCGCTGAGA
AGACGGTTCGAACTTGACTATCTAGAGGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAA
GGATCATTA

```

Figure 22 : Séquence du gène de l'ARN 18S humain (M10098)

4.6.2 SSH 2

Cette SSH met en évidence des gènes codant pour des composants de la matrice extracellulaire. Le grand nombre de gènes de la matrice extracellulaire peut s'expliquer par la localisation dans le derme profond de ce prélèvement. En effet nous devons également avoir, en plus des cellules tumorales, des fibroblastes qui expriment les gènes de la matrice extracellulaire.

Nous retrouvons également un fort pourcentage (36 %) de gènes des immunoglobulines (IgG et IgM). Nous retrouvons des gènes codant pour les chaînes lourdes et pour les chaînes légères (Kappa et Lambda), autant dans les régions variables que les régions constantes.

La présence d'immunoglobulines nous pose un problème car nous sommes en présence d'un LCP CD30+ donc d'une prolifération de lymphocytes de phénotypes T. Puisque les immunoglobulines sont produites uniquement par les lymphocytes B, nous avons recherché la présence de lymphocytes B dans le prélèvement.

Comme le diagnostic de la tumeur était bien celui d'un lymphome T CD30+, nous avons ensuite pensé à une contamination de nos expériences par d'autres expériences réalisées dans le laboratoire sur des lymphomes de phénotype B. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la clonalité B dans les échantillons utilisés pour les banques. Cette dernière est analysée par des expériences de PCR avec des amorces spécifiques de la chaîne lourde des immunoglobulines⁹⁶. Habituellement elle est étudiée au niveau de l'ADN génomique. Dans le cas des lymphocytes sanguins sains ou d'un LCP CD30+, le profil obtenu est une traînée car il n'y a pas de population cellulaire majoritaire. Dans le cas d'un lymphome B, une seule bande est observée ce qui correspond à une population cellulaire unique.

La clonalité B a été étudiée sur différents échantillons issus de la SSH 2.

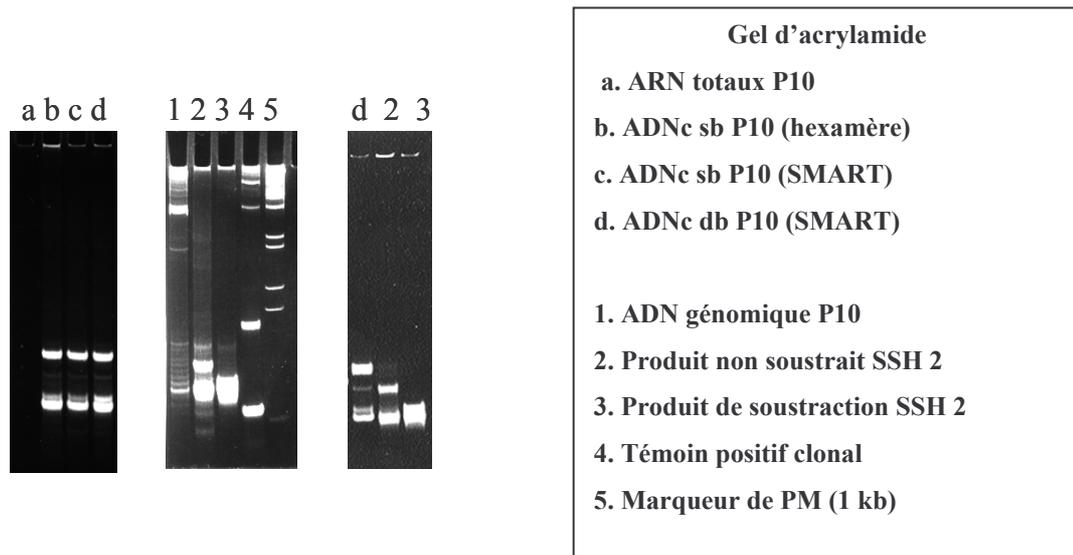


Figure 23 : Etude de la clonalité B - Echantillons de la SSH 2

L'analyse de la clonalité au niveau de l'ADN génomique (piste 1) présente un profil polyclonal, avec une bande un peu plus intense. L'ARN ne donne aucune bande (piste a), nous n'avons donc pas de contamination d'ADN génomique dans la préparation d'ARN. Au niveau de l'ADNc, deux bandes majoritaires sont retrouvées dès la synthèse du premier brin d'ADNc indépendamment de la technique utilisée (piste b, c et d). La bande du bas est au même poids moléculaire que la bande plus intense dans l'ADN génomique.

Au niveau du produit non soustrait, les deux bandes majoritaires sont observées (piste 2). Dans le produit soustrait (piste 3), seule la bande du bas est retrouvée. Il serait intéressant de cloner et de séquencer les bandes majoritaires pour déterminer si elles correspondent aux séquences que nous retrouvons dans les banques soustraites.

L'étude des coupes histologiques avec un marquage immunohistochimique spécifique des lymphocytes B a montré des lymphocytes B réactionnels et quelques plasmocytes dans la zone tumorale. De plus, les plasmocytes sont des cellules productrices d'immunoglobulines dont 20 % de leurs ARN codent pour des Ig.

Nous avons pu éliminer l'hypothèse d'une contamination entre différentes expériences. Ces immunoglobulines viennent bien du prélèvement. Il est possible qu'au niveau de la tumeur, des plasmocytes soient sélectionnés et produisent un type unique d'immunoglobuline. Ceci expliquerait la bande un peu plus intense dans la piste de l'ADN génomique (piste 1) et les deux bandes majoritaires au niveau de l'ADNc (piste b, c et d) et des produits de soustraction (piste 2 et 3).

4.6.3 SSH 8

Dans cette SSH, nous retrouvons 18,2 % de gènes codant pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) et 4,2 % de gènes codant pour la bêta 2 microglobuline. Cette dernière est associée aux molécules du CMH-II.

Les gènes du CMH-II sont normalement exprimés par les cellules impliquées dans les phénomènes de présentations d'antigènes tels que les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes B et les lymphocytes T activés.

La soustraction est réalisée entre des lymphocytes T activés, ceux contenus dans la tumeur, auxquels nous avons soustrait des lymphocytes sanguins non activés, ce qui peut expliquer la surexpression des gènes du système majeur d'histocompatibilité, HLA II.

5 ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES CANDIDATS

5.1 Introduction

Afin de valider nos résultats, la variation d'expression des gènes isolés par SSH et criblage des banques, doit être vérifiée par une autre technique. C'est pourquoi nous avons utilisé la technique de RT-PCR quantitative ou RQ-PCR relative. L'appareillage utilisé est le Light Cycler de la société Roche avec son logiciel d'analyse, version 3.5 (Roche Molecular Biochemicals).

L'étape critique dans cette approche est la normalisation des échantillons : l'extraction des ARN, la transcription inverse, les dilutions et le manipulateur peuvent induire des biais dans les résultats. Pour s'affranchir de toutes ces variations, nous avons utilisé un gène de ménage.

Le choix des gènes à étudier par RQ-PCR a été réalisé par deux approches :

- Par dot blot avec quatre sondes issues de tumeurs différentes, sans a priori bibliographique.
- Par intérêt bibliographique sur l'ensemble des gènes non sélectionnés par la première approche.

5.2 Sélection et étude des gènes candidats potentiellement surexprimés

5.2.1 Par dot blot

L'ensemble des gènes séquencés lors des différentes SSH est mis sur une même membrane au format 96 dots. Cette membrane est fabriquée en 4 exemplaires. Chaque membrane est hybridée avec une sonde radiomarquée d'ADNc obtenus par la technique SMART, de 4 tumeurs différentes : P1, P3, P10 et P11. Nous savons par les résultats du criblage des banques que la totalité des gènes sont peu ou pas exprimés dans les lymphocytes sains, à l'exception du clone N° 2, l'humaine.

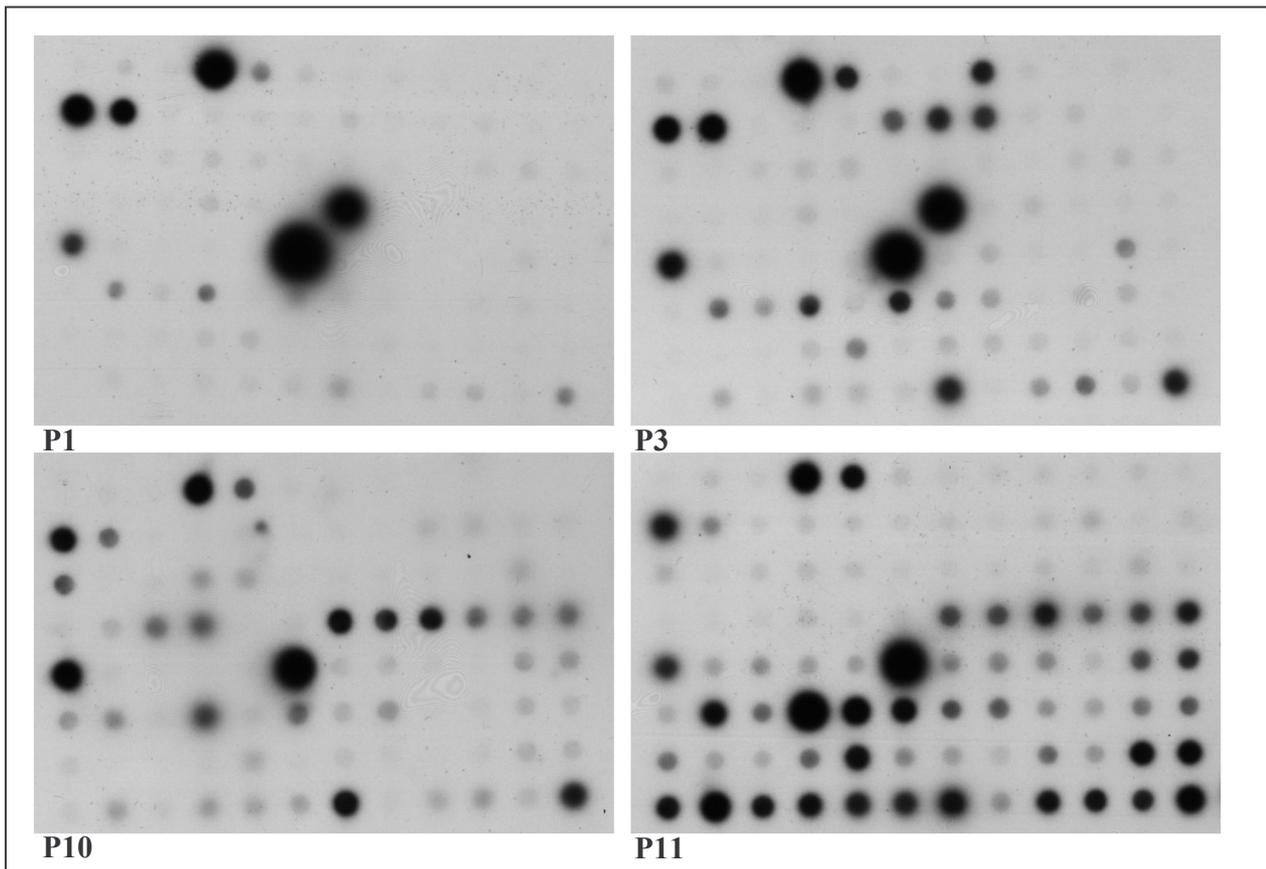


Figure 24 : Membranes bilan - film d'autoradiographie

Dans un premier temps, seuls les gènes qui présentent au moins trois signaux sur les quatre sondes sont sélectionnés. Ensuite, l'intensité des signaux est estimée en double aveugle sur une gamme de 1 à 5. Les gènes sont alors classés de 1 à 22 en fonction de la somme de l'intensité des signaux pour les quatre sondes, le tableau ci-dessous regroupe ces résultats.

N°	Nom	Intensité du signal				
		P11B	P1	P3	P10	Total
1	clone 016b10 My016 / oligo SMART II	5	5	5	5	20
2	Humanine	4	5	5	1	15
3	clone RP1-8L15 (11p13)	2	4	3	3	12
4	18 S ribosomal RNA	2	3	5	2	12
5	beta 2-microglobulin	5	1	1	3	10
6	hypothetical protein FLJ23277	1	2	3	3	9
7	THW	1	3	3	1	8
8	CD74 antigen	2	1	2	3	8
9	Prothymosin alpha	3	1	2	1	7
10	cyclophilin A	2	1	2	1	6
11	H4 histone	3	0	1	2	6
12	HLA-DR alpha	4	0	1	1	6
13	Ig divers	2	0	1	2	5
14	ubiquitin A-52	1	1	1	1	4
15	H2A histone	2	0	1	1	4
15b	H2A histone	2	0	1	1	4
17	HSPC016	1	0	1	1	3
10b	cyclophilin A	1	0	1	1	3
19	enolase 1	1	0	1	1	3
20	RIG 1	1	0	1	1	3
21	HLA-DR bêta 1	1	0	1	1	3
21b	MHC class II HLA-DR7	1	0	1	1	3

Tableau 18 : Gènes N° 1 à 22 - Sélection par Dot Blot

5.2.2 Par intérêt bibliographique

Parmi les gènes non sélectionnés, d'autres sont choisis au regard de la littérature. Nous avons également étudié des gènes non retrouvés dans les SSH, p53 et la famille du CD30.

N°	Nom	N°	Nom
23	Psoriasin	32	PTTG1
24	p120 catenin	33	Thioredoxin
25	NF-Kappa B	34	TETG
26	SPARC	35	p53
27	Filamin	36	Kératine 6
28	CIN 85	37	CD30
29	Phospholipase A2	38	CD30 variant
30	Oncoprotein 18	39	CD30 L
31	Bcl 11B		

Tableau 19: Gènes N° 23 à 40 - Sélection par intérêt bibliographique

5.3 Analyse de l'expression des gènes candidats

5.3.1 PCR en temps réel

Le principe de la PCR en temps réel est présenté dans l'introduction. Nous allons détailler ici les expériences réalisées sur le Light Cycler de Roche Applied Science.

Le programme de la PCR a été défini comme pour une PCR classique, en fonction de la Taq polymérase, des amorces et de la cible. Nous avons choisi un programme unique pour les différentes cibles, seule la température d'hybridation varie. Le schéma ci dessous représente le programme de la PCR. La première phase correspond à l'activation de la Taq polymérase, la seconde phase est la PCR proprement dite, la troisième phase correspond à la courbe de fusion. La mesure de la fluorescence est réalisée en fin d'élongation lors de la seconde phase et en continu lors de la troisième (points roses). Cette dernière permet de contrôler la spécificité de la PCR.

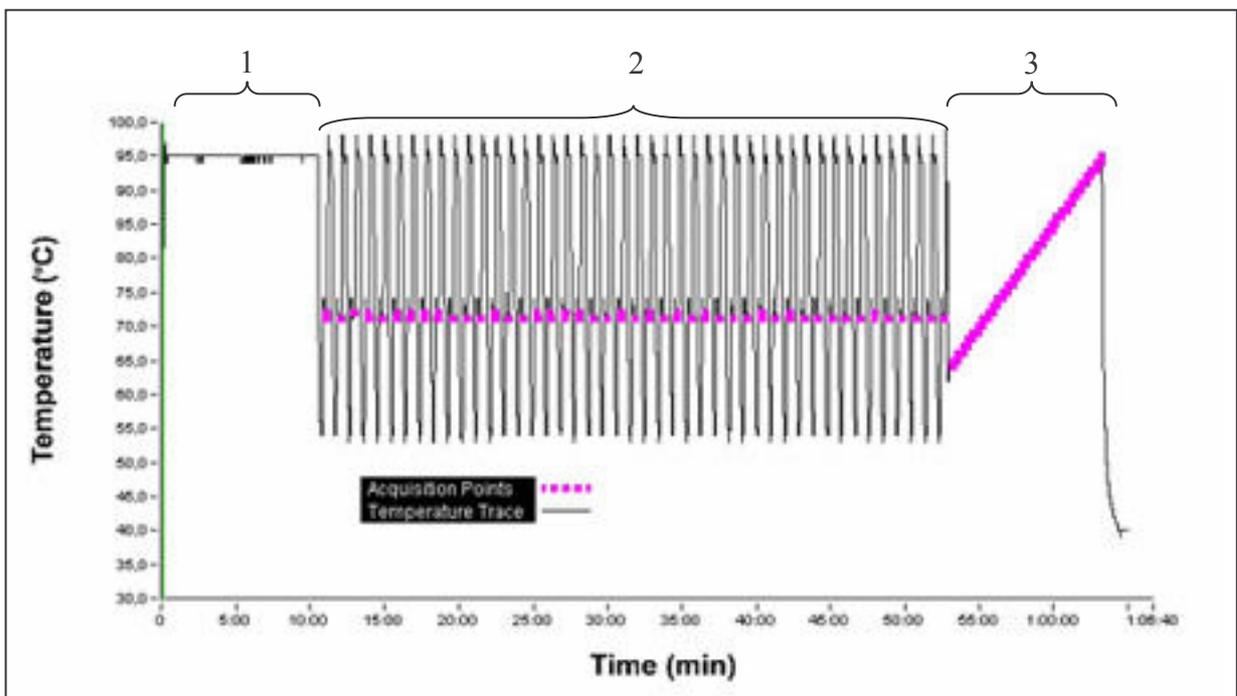


Figure 25 : Représentation du programme de RQ-PCR

Pour chaque cible, la PCR est réalisée sur une gamme de dilution et sur les échantillons à quantifier. Pour valider la reproductibilité des expériences, chaque point est réalisé en double, on parle de « duplicates ». De même, un point permet de vérifier l'absence d'ADNg dans l'échantillon, nous utilisons comme matrice l'ARN utilisé pour la transcription inverse.

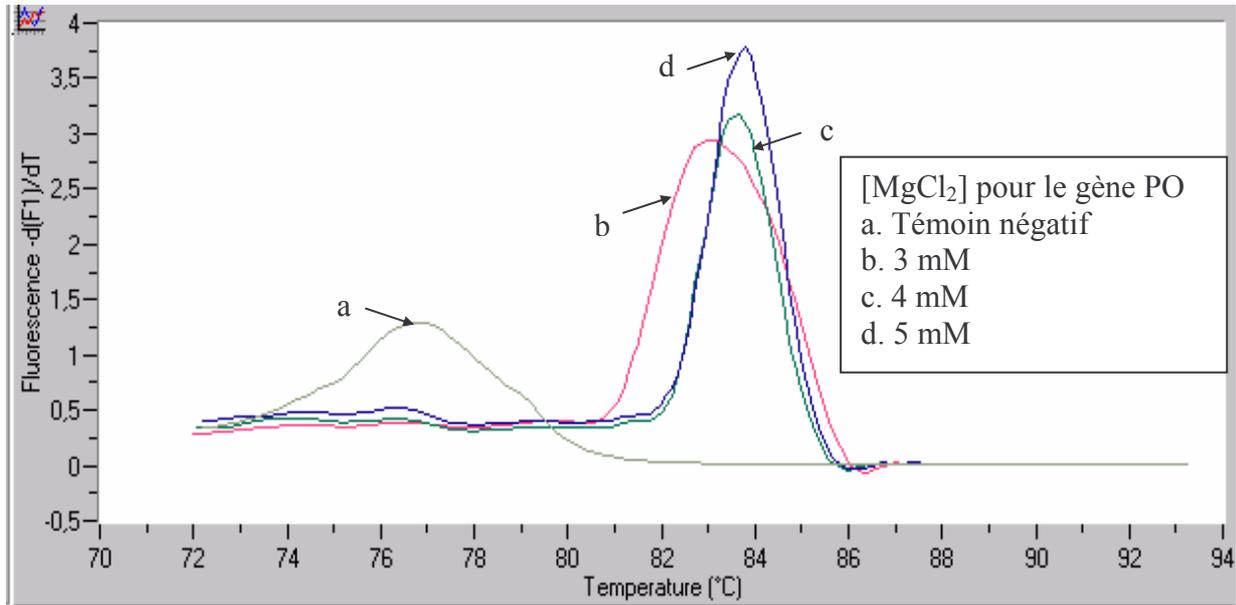


Figure 26 : Courbe de fusion - RQ-PCR

Dans un premier temps, les résultats de la courbe de fusion sont analysés. Dans cet exemple, seul le témoin négatif (a) présente des dimères de primers, caractérisés généralement par un T_m plus petit. Pour permettre la quantification, nous ne devons pas avoir de dimère de primer dans nos échantillons ou dans un des points de la gamme. Il y aurait dans ce cas compétition entre la formation de notre cible et des dimères de primers. Ces derniers peuvent être éliminés en augmentant la stringence de la PCR ($MgCl_2$, température d'hybridation).

Dans un deuxième temps, la cinétique de la PCR est analysée pour chaque point par le logiciel du Light Cycler (version 3.5). La méthode employée pour définir les C_t est celle de la dérivée seconde maximum. Le C_t correspond au nombre de cycle où l'amplification par PCR est la plus efficace, il est donc calculé sur le début de la réaction. Les valeurs de C_t des « duplicates » sont comparées pour l'ensemble des échantillons. Si la variation de C_t pour un

échantillon est supérieure à 0,3, le point est jugé non reproductible et l'expérience est recommencée pour ce point. La moyenne des Ct est ensuite réalisée pour chaque point.

La figure suivante montre l'influence de la concentration en $MgCl_2$ sur la cinétique de la RQ-PCR. Chaque courbe correspond à un échantillon. Nous pouvons suivre la PCR au cours du temps.

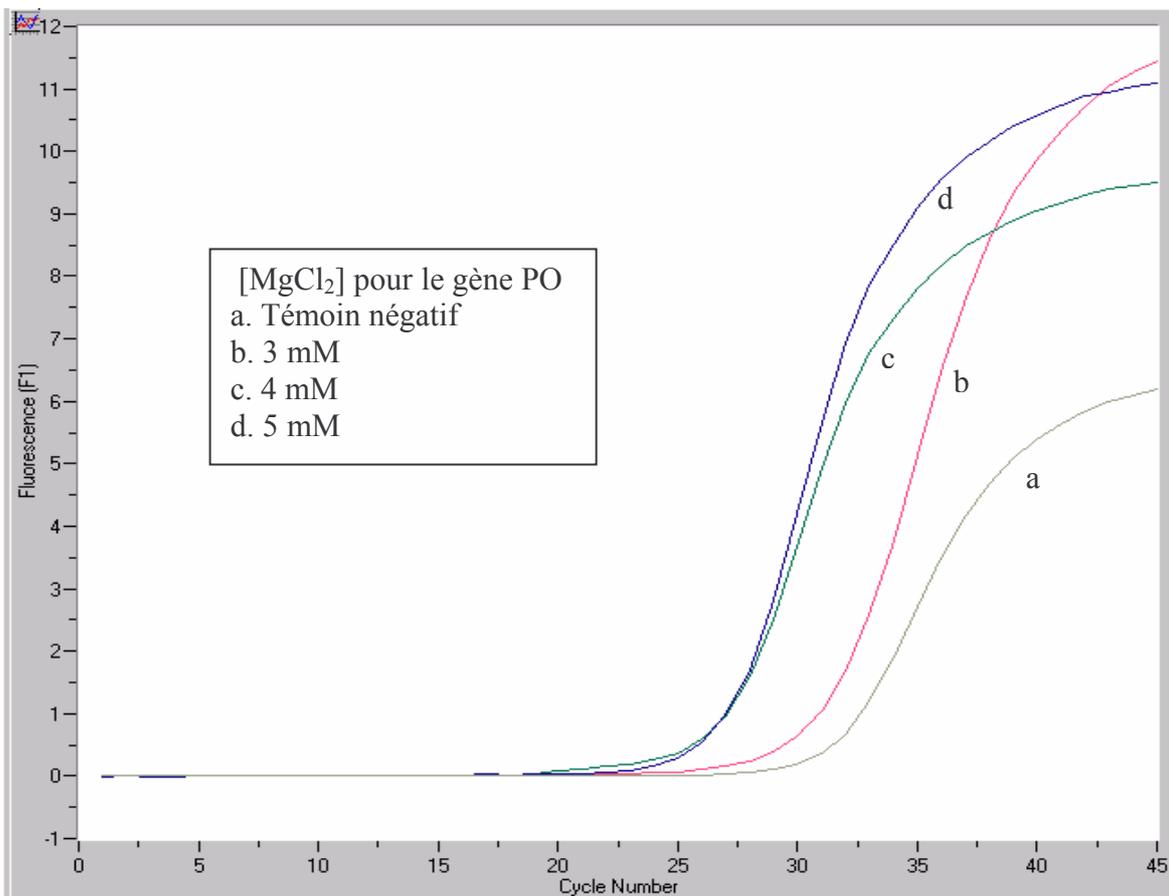


Figure 27 : Cinétique - RQ-PCR

On note qu'à 3 mM de $MgCl_2$, la PCR est retardée. Pour notre étude nous avons travaillé à 4 mM de $MgCl_2$ pour le gène de ménage PO.

Pour pouvoir comparer différents gènes entre eux (gènes cible et gène de ménage), nous ne pouvons raisonner en Ct car ils dépendent de l'efficacité de la PCR donc du couple d'amorces utilisé. Nous avons donc choisi de raisonner en concentration arbitraire. Ceci est possible en utilisant une gamme de dilution. Cette dernière est réalisée par une dilution en série d'un échantillon d'ADNc contenant la cible étudiée. Le logiciel du Light Cycler permet de tracer une droite (concentration arbitraire en fonction de Ct). Les échantillons sont ainsi quantifiés.

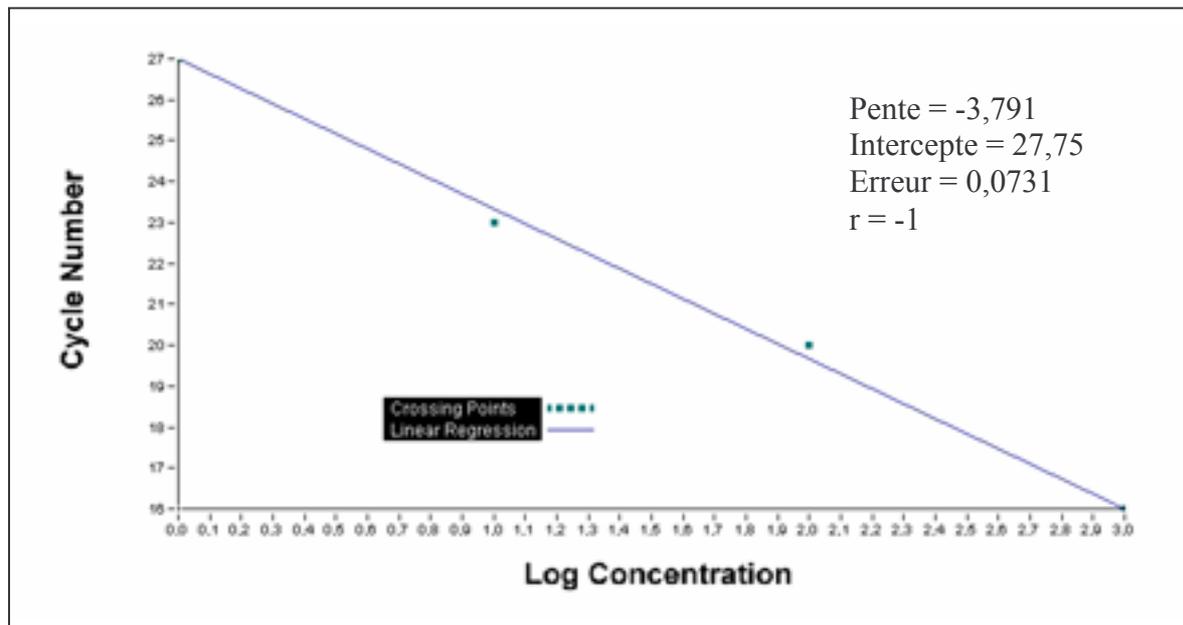


Figure 28 : Gamme de dilution - RQ-PCR

L'étape suivante consiste à normaliser les résultats, le rapport des concentrations suivant est réalisé.

$$\frac{[\text{Echantillon}]}{[\text{Gène de ménage}]}$$

Les valeurs ainsi obtenues peuvent enfin être comparées.

5.3.2 Choix d'un gène de ménage

Le choix du gène de ménage approprié à notre système a fait l'objet d'une étude approfondie et d'un manuscrit prochainement soumis (cf. annexe 1). Nous avons regardé l'expression, dans un grand nombre d'échantillons, de quatre gènes décrits dans la littérature comme des gènes de ménage : bêta actine, GAPDH, G6PD et PO (une protéine ribosomale). Pour cette étude, nous avons raisonné uniquement avec les valeurs de Ct. Ceci est possible car nous ne cherchons pas à comparer leur taux d'expression mais à identifier au moins deux gènes dont les profils d'expression sur un large panel d'échantillons sont superposables.

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
GAPDH	CTCCTCTGACTTCAACA	GTAGCCAAATTCGTTGTCA
G6PD	CCGGATCGACCACTACCTGGGCAAG	GTTCCCCACGTA CTGGCCCAGGACC
bêta actine	ACTGGCATCGTGATGGACTC	AGTTTCGTGGATGCCACAGG
PO	TGCAGATTGGCTACCCAAC	TTCAGCAAGTGGGAAGGT

Tableau 20 : Séquences des amorces de RQ-PCR pour les gènes de ménages

Les résultats, sur quatorze prélèvements, pour les quatre gènes de ménage testés, sont présentés ci-dessous. Les valeurs correspondent à la moyenne des Ct, les expériences étant toujours réalisées en double pour chaque point.

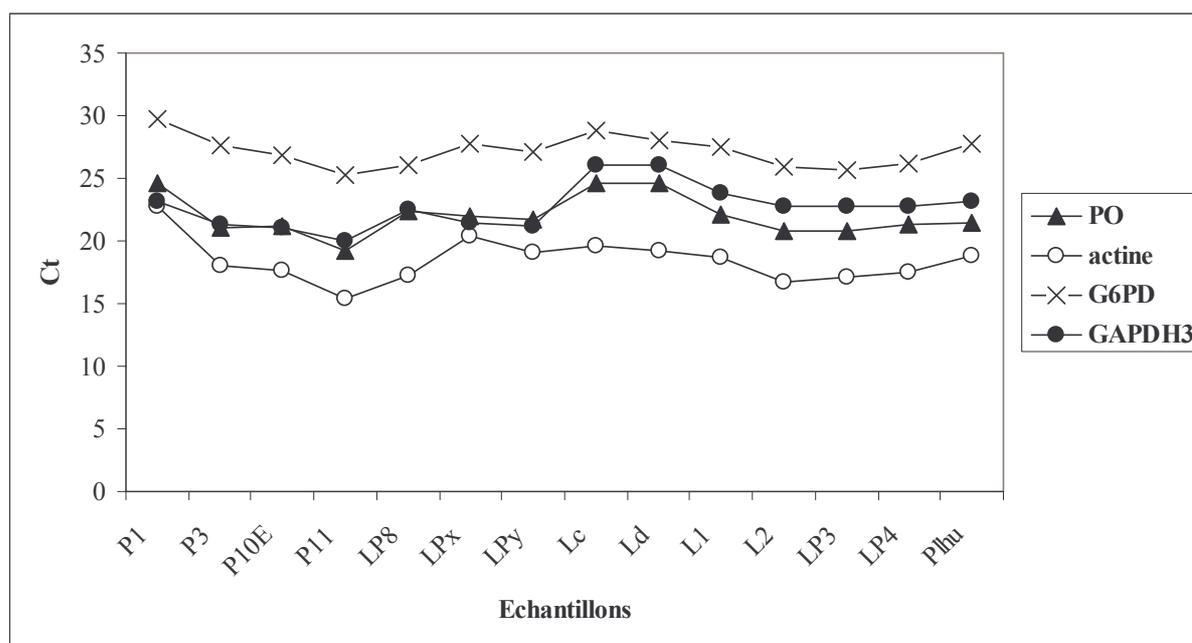


Figure 29 : Choix d'un gène de ménage - Ct des quatre gènes

Cette représentation est difficilement interprétable. Pour mieux analyser nos résultats, nous avons choisi de les représenter de la manière suivante : nous avons considéré un des gènes comme la référence et nous avons regardé la variation des trois autres, en effectuant les rapports gène étudié sur gène de référence. Avec ces représentations, si deux gènes possèdent le même profil, le rapport de leur Ct doit être une constante.

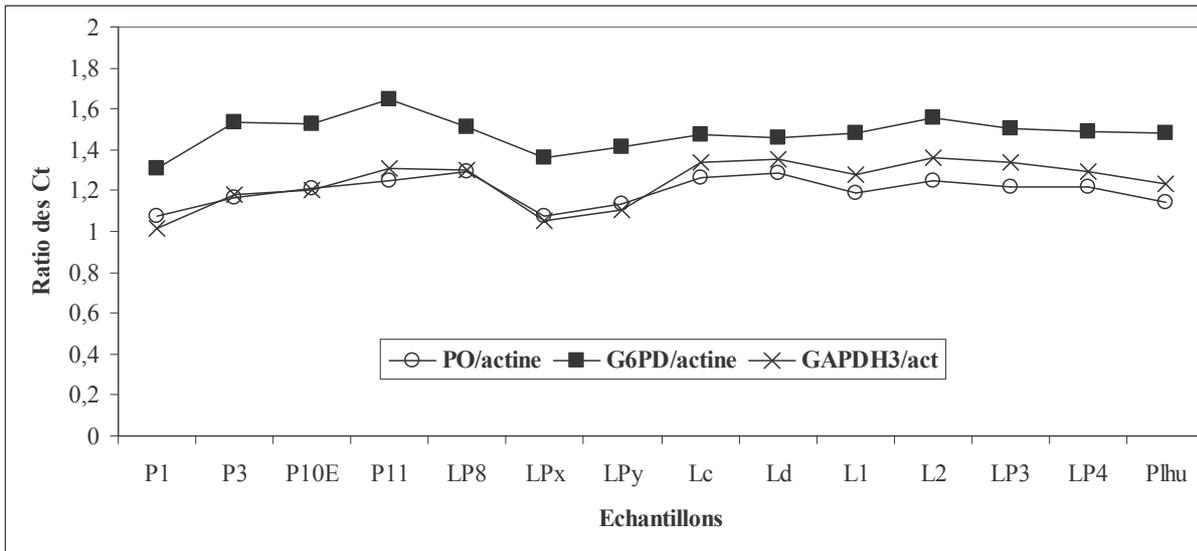


Figure 30 : Analyse des résultats avec la bêta actine comme référence

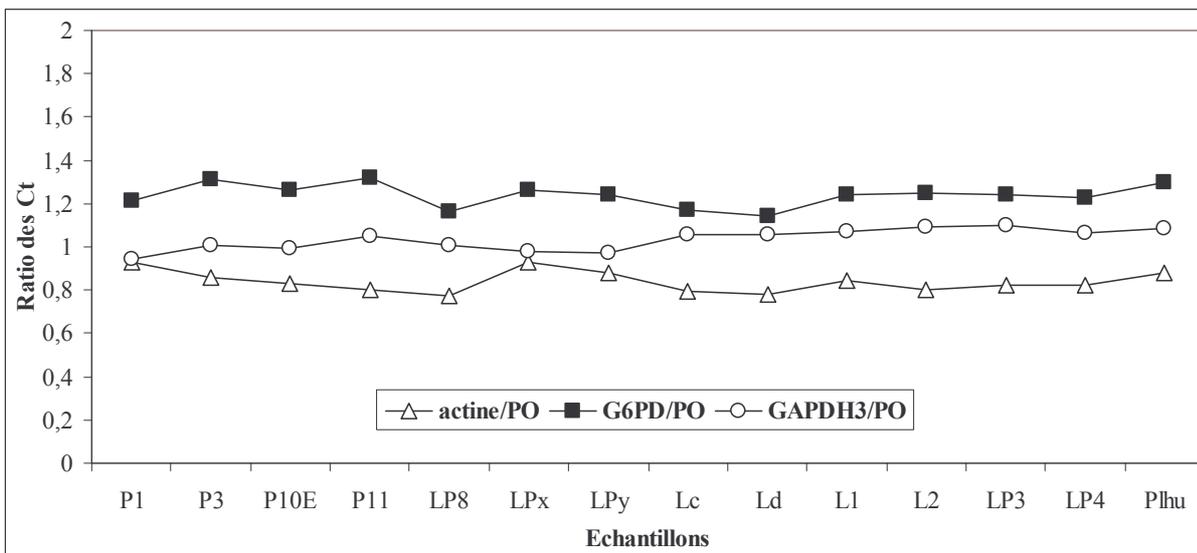


Figure 31 : Analyse des résultats avec PO comme référence

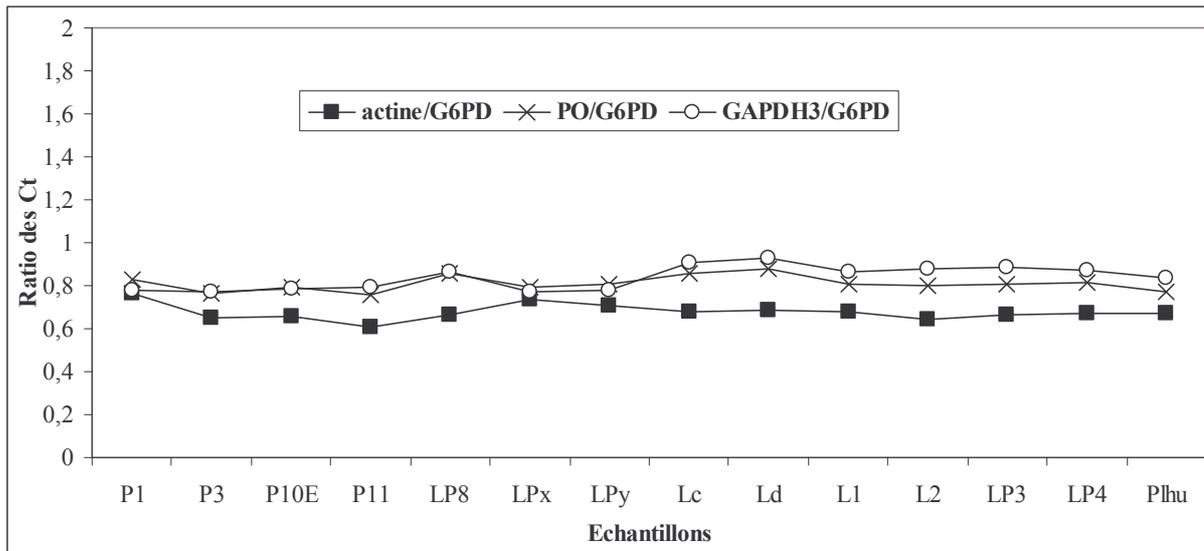


Figure 32 : Analyse des résultats avec la GAPDH comme référence

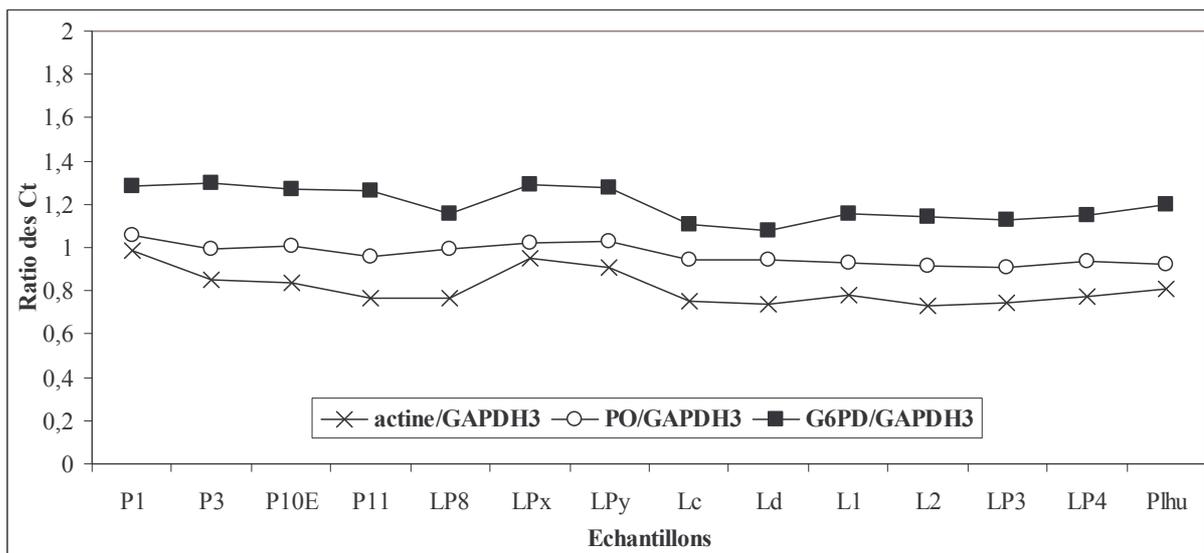


Figure 33 : Analyse des résultats avec la G6PD comme référence

Les gènes G6PD et PO présentent un profil d'expression identique dans les différents échantillons. Le gène GAPDH présente un profil proche, par contre la bêta actine n'est pas un bon gène de ménage pour notre système. Pour la suite des expériences, nous avons choisi comme gène de ménage PO car la G6PD est plus faiblement exprimée.

5.3.3 Résultats des gènes sélectionnés par Dot Blot

Pour chacun des gènes, des amorces sont dessinées. Le clone N° 1 est abandonné, il correspond en fait à l'oligo SMART II répété quatorze fois. Le N° 3 est mis de côté, il correspond à une région du chromosome 11p13 et nous n'avons pas localisé de gène dans la zone où le clone séquencé s'aligne. Le N°13 n'est pas étudié en RQ-PCR, nous l'avons mis sur ces membranes pour vérifier la présence des ADNc de la chaîne lourde des immunoglobulines dans nos sondes ; nous avons ainsi vérifié la présence de transcrit d'immunoglobuline dans les échantillons tumoraux P11, P10 et plus faiblement dans le prélèvement P3. Ceci est corrélé par les résultats du séquençage des clones des SSH respectives.

Après avoir optimisé la RQ-PCR pour chaque couple d'amorces, nous avons regardé l'expression de ces gènes sur les quatre échantillons de LCP CD30+ utilisés précédemment et trois prélèvements de lymphocytes sanguins sains. Seul le couple d'amorces pour le clone N° 5 n'a pas fonctionné.

Les conditions de RQ-PCR sont regroupés dans le tableau suivant.

N°	Nom	[MgCl ₂]	T hybridation (°C)
2	Humanine	4 mM	55
4	18 S ribosomal RNA	3 mM	55
6	Hypothetical protein FLJ23277	4 mM	60
7	THW	3 mM	60
8	CD74 antigen	3 mM	60
9	Prothymosin alpha	4 mM	60
10	Cyclophilin A	4 mM	60
11	H4 histone family	3 mM	64
12	HLA-DR alpha	3 mM	60
14	Ubiquitin A-52	5 mM	55
15	H2A histone family	5 mM	60
17	HSPC016	5 mM	60
19	Enolase 1	4 mM	60
20	RIG 1	4 mM	60
21	HLA-DR bêta 1	4 mM	55
PO	Gène de ménage	4 mM	64

Tableau 21 : Conditions de RQ-PCR

La quantification de la variation d'expression, avec un facteur cinq au minimum, est effectuée pour chaque échantillon tumoral par rapport à la moyenne des trois échantillons de lymphocytes sanguins sains. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant. Deux gènes semblent intéressants : l'humanine et THW. Une seconde série d'expériences permet de les étudier sur un plus grand nombre d'échantillons.

N°	Nom	Nombre de surexpression	Nombre de sous-expression	Nombre de stable
2	Humanine	0	3	1
4	18 S ribosomal RNA	0	0	4
6	Hypothetical protein FLJ23277	0	2	2
7	THW	4	0	0
8	CD74 antigen	0	0	4
9	Prothymosin alpha	0	0	4
10	Cyclophilin A	0	0	4
11	H4 histone family	0	0	4
12	HLA-DR alpha	0	0	4
13	Ig divers	0	2	2
14	Ubiquitin A-52	0	1	3
15	H2A histone family	2	0	2
17	HSPC016	0	0	4
19	Enolase 1	0	0	4
20	RIG 1	0	1	3
21	HLA-DR bêta 1	1	2	1

Tableau 22 : Résultats de RQ-PCR - gènes sélectionnés par dot blot (N° 1 à 22)

5.3.4 Résultats des gènes sélectionnés par intérêt bibliographique

Dans cette seconde série d'expériences, nous avons repris deux gènes de la première série, l'humanine et THW. Le nombre d'échantillons testés a également augmenté :

- Onze échantillons de LCP CD30+ dont 7 tumeurs initiales, 3 récidives et 1 ganglion.
- Deux échantillons de lymphome systémique CD30+ (ALK +).
- Sept échantillons de lymphocytes sanguins sains.

Après une étape d'optimisation, nous avons choisi les conditions de RQ-PCR suivante :

N°	Nom	[MgCl ₂]	T hybridation (°C)
23	Psoriasis	4 mM	64
24	p120 catenin	4 mM	55
25	NF-Kappa B	4 mM	64
26	SPARC	3 mM	64
27	Filamin	4 mM	64
28	CIN 85	4 mM	64
29	Phospholipase A2	4 mM	55
30	Oncoprotéine 18	4 mM	55
31	Bcl 11B	4 mM	64
32	PTTG1	3 mM	64
33	Thioredoxin	4 mM	64
34	TETG <i>Bax inhibitor</i>	4 mM	64
35	p53	3 mM	55
36	CD30	3 mM	64
37	CD30 variant	3 mM	55
38	CD30 L	3 mM	55
39	Kératine 6	3 mM	55

Tableau 23 : Conditions de RQ-PCR

Dans le tableau suivant, les résultats des gènes sélectionnés sont regroupés sans tenir compte de l'origine des prélèvements analysés. La valeur seuil correspond au rapport des expressions entre l'échantillon tumoral et l'échantillon sain.

N°	Nom	Seuil	Nombre de surexpression	Nombre de sous-expression	Nombre de stable
2	Humanine	> 5	0	4	9
2	Humanine	> 3	0	10	3
7	THW	> 5	11	0	2
23	Psoriasis	> 5	0	0	13
24	P120 catenin	> 4	7	0	6
25	NF-Kappa B	> 5	0	2	11
26	SPARC	> 4	5	1	7
27	Filamin	> 5	0	0	13
28	CIN 85	> 5	0	8	5
29	Phospholipase A2	> 5	0	0	13
30	Op 18	> 5	0	1	12
31	Bcl 11B	> 4	0	7	6
32	PTTG1	> 4	9	0	4
33	Thioredoxin	> 5	3	0	10
34	TETG	> 5	0	2	11
35	p53	> 5	0	1	12
36	CD30	> 5	10	0	3
37	CD30 variant	> 5	0	12	1
38	CD30 L	> 5	0	13	0

Tableau 24 : Résultats de RQ-PCR - seconde série

Pour les dix gènes qui présentent des variations d'expression, les résultats sont détaillés en fonction du type de prélèvement dans le tableau suivant. Les valeurs correspondent aux rapports des expressions entre l'échantillon tumoral et l'échantillon sain pour le gène cible étudié.

Pour la kératine 6 nous n'avons pas trouvé d'expression dans les lymphocytes sanguins sains, les valeurs correspondent aux expressions normalisées par rapport au gène de ménage PO.

Surexpressions

Pathologie	Prélèvement analysé	THW	p120 caténine	SPARC	PTTG1	Kératine 6	CD30	
P3	LCP CD30+	tumeur initiale (peau)	46,66	0,44	0,31	4,09	1,16	184,20
P5	LCP CD30+	tumeur initiale (peau)	116,83	8,30	3,47	4,79	114	0,45
P11C	LCP CD30+/GGL	tumeur initiale (peau)	26,73	4,19	4,42	8,98	1,39	49,08
P16	LCP CD30+	tumeur initiale (peau)	125,32	12,84	2,55	14,01	52,6	3,06
P17	LCP CD30+	tumeur initiale (peau)	13,94	2,79	4,19	17,27	2,9	171,21
P1	LCP CD30+/GGL	tumeur initiale (peau)	17,20	0,97	0,06	2,63	0,29	110,68
P18	LCP CD30+	tumeur initiale (peau)	8,88	1,87	0,87	22,98	2	17,78
P10	LCP CD30+	tumeur récidive 1 (peau)	2,68	0,46	2,12	3,45	0	115,68
P4	LCP CD30+	tumeur récidive 2 (peau)	135,69	7,88	8,87	2,47	53,1	0,46
P9	LCP CD30+	tumeur récidive 2 (peau)	58,57	9,70	15,18	3,86	1,97	10,01
P11	LCP CD30+/GGL	Ganglion	5,06	0,52	0,54	7,47	0	112,77
GP24	L systémique	Ganglion	3,28	4,48	2,80	27,88	0	83,60
GP26	L systémique	Ganglion	7,03	4,74	12,69	17,86	0	69,56

Sousexpressions

Pathologie	Prélèvement analysé	humaine	CIN 85	Bcl11B	CD30 variant	CD30 ligand
P3	LCP CD30+	tumeur initiale (peau)	3,36	8,51	3,88	1000,00
P5	LCP CD30+	tumeur initiale (peau)	3,95	6,94	4,71	58,82
P11C	LCP CD30+/GGL	tumeur initiale (peau)	4,53	0,77	0,63	19,61
P16	LCP CD30+	tumeur initiale (peau)	5,36	17,68	3,10	18,87
P17	LCP CD30+	tumeur initiale (peau)	5,95	6,21	8,23	13,16
P1	LCP CD30+/GGL	tumeur initiale (peau)	0,62	22,07	7,87	pas d'expression
P18	LCP CD30+	tumeur initiale (peau)	6,18	2,84	7,84	20,83
P10	LCP CD30+	tumeur récidive 1 (peau)	4,92	7,93	46,82	20,00
P4	LCP CD30+	tumeur récidive 2 (peau)	4,55	5,70	6,10	14,49
P9	LCP CD30+	tumeur récidive 2 (peau)	2,86	2,21	2,36	1,63
P11	LCP CD30+/GGL	Ganglion	13,01	1,58	1,47	21,28
GP24	L systémique	Ganglion	4,52	3,43	2,10	18,87
GP26	L systémique	Ganglion	1,64	2,75	4,76	21,28

Tableau 25 : Résultats de RQ-PCR - valeurs d'expression

5.3.5 Microdissection et RT-PCR en temps réel

Les résultats de THW avec comme contrôle les lymphocytes sanguins sains nous ont permis de supposer que ce gène était exprimé par les cellules de l'épiderme et non par les cellules tumorales. Les plus fortes surexpressions sont observées dans les prélèvements contenant beaucoup de kératine 6.

Afin d'affiner ces résultats, nous avons réalisé des expériences de RT-PCR en temps réel sur des échantillons microdisséqués. Ces expériences ont été réalisées sur des cellules de la zone tumorale et sur des cellules de l'épiderme en regard de la tumeur. Les valeurs ci-dessous sont des concentrations arbitraires normalisées par le gène de ménage PO.

	LCP CD30+	Cellules	Kératine 6	THW	Ratio THW Epiderme / Tumeur
P5	tumeur initiale	Epiderme	114,18	0,83657	98,77
P5	tumeur initiale	Tumeur	0	0,00847	
P16	tumeur initiale	Epiderme	54,6	0,55461	18,86
P16	tumeur initiale	Tumeur	0	0,02941	
P17	tumeur initiale	Epiderme	3,48	0,29526	10,76
P17	tumeur initiale	Tumeur	0	0,027435	
P18	tumeur initiale	Epiderme	3,51	2,99915	432,47
P18	tumeur initiale	Tumeur	0	0,006935	
P4	tumeur récurrence 2	Epiderme	26,4	0,31787	17,28
P4	tumeur récurrence 2	Tumeur	0	0,018395	
P9	tumeur récurrence 2	Epiderme	2,22	0,73682	25,74
P9	tumeur récurrence 2	Tumeur	0	0,028625	

Tableau 26 : Taux d'expression de THW et de la kératine 6 - microdissection

Ces expériences montrent que THW est exprimé par les cellules épidermiques. Il est également exprimé par les cellules tumorales à un niveau beaucoup plus faible.

5.4 Commentaires des résultats

5.4.1 Kératine 6 (NM_005554)

Nous retrouvons en grande quantité la kératine 6 dans les clones sélectionnés à partir des SSH 1 et SSH 7. Les résultats de criblage de ces banques mettent en évidence l'expression de la kératine 6 dans le prélèvement tumoral P3 mais pas dans les prélèvements non tumoraux LP7 et L1.

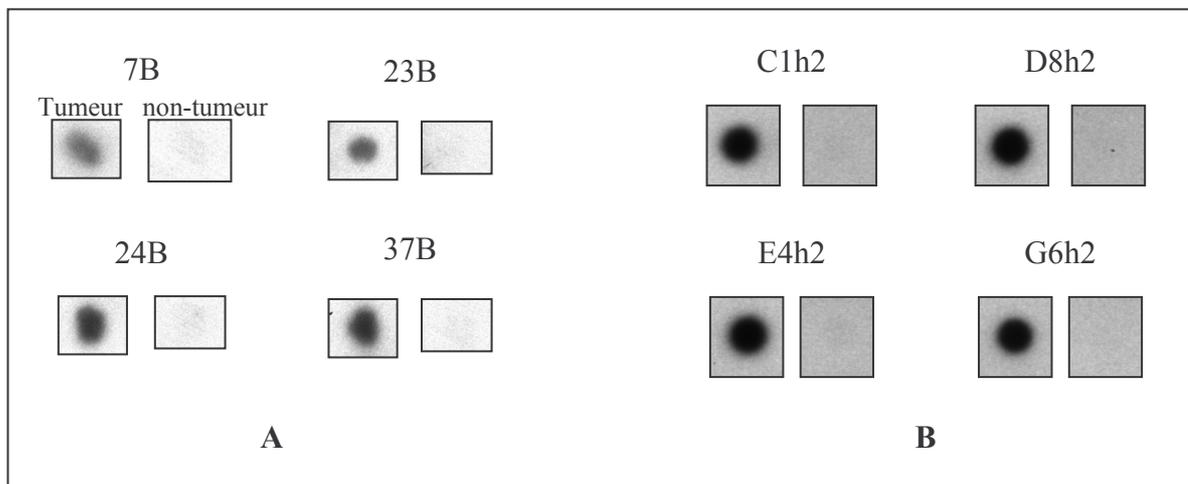


Figure 34 : Dot Blot Kératine 6 - Criblage de la SSH 1 (A) - Criblage SSH 7 (B)

Ces résultats sont validés par des techniques de RQ-PCR relative ou comparative. La kératine 6 est retrouvée dans l'ensemble des échantillons contenant une fraction d'épiderme. Elle est fortement exprimée dans trois prélèvements et plus faiblement dans six autres prélèvements. Dans la tumeur P10 nous ne trouvons pas d'expression de la kératine 6. Cette absence est due à la localisation de la biopsie dans le derme profond. Bien que la kératine 6 soit faiblement exprimée dans la tumeur P3 (celle utilisée pour les SSH 1 et SSH 7), nous retrouvons de nombreux clones de kératine 6 issus de ces SSH. Ce gène n'étant pas exprimé dans les lymphocytes sanguins sains utilisés comme *driver*, lors de la soustraction par SSH les kératines 6 présentes dans l'échantillon tumoral P3 sont amplifiées par PCR.

Ainsi, les résultats de microdissection montrent bien l'expression de la kératine 6 par les cellules de l'épiderme et non par les cellules tumorales.

5.4.2 THW (AJ251830)

THW est issu de la banque soustraite SSH 1. Les résultats du criblage de la banque montrent une surexpression de ce gène dans le prélèvement tumoral par rapport à l'échantillon non tumoral. De plus l'étude par Dot Blot sur quatre LCP CD30+ montre que THW est exprimé dans l'ensemble des prélèvements.

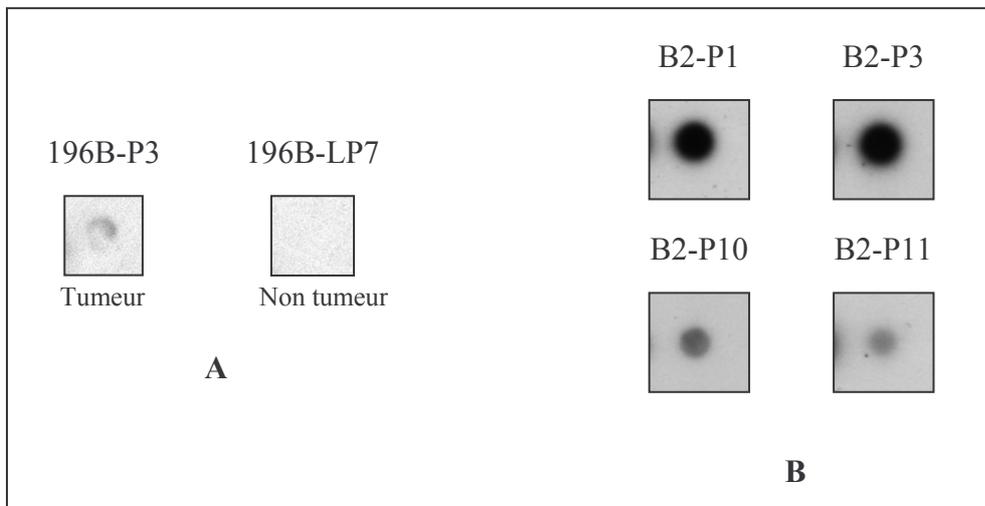


Figure 35 : Dot Blot THW - Criblage de la SSH 1 (A) - Sélection des gènes (B)

Les résultats de RQ-PCR relative, sur les prélèvements totaux, montrent une très forte surexpression de THW par rapport aux lymphocytes sanguins sains dans certains prélèvements. L'étude des échantillons microdisséqués montre que THW est préférentiellement exprimé dans les cellules de l'épiderme, mais on le retrouve aussi dans les cellules tumorales. Ce gène est également exprimé dans des prélèvements de peaux saines avec un taux moyen d'expression à 0,665. Ceci montre que THW n'est potentiellement pas surexprimé dans les épidermes de LCP CD30+. Toutefois ces résultats doivent être vérifiés sur des cellules d'épiderme sain microdisséquées.

Nous trouvons également une surexpression de THW dans les prélèvements ganglionnaires d'un LCP CD30+ et d'un L. systémique CD30+.

Ce gène a été récemment isolé par la technique de « differential display » par le groupe de recherche en pharmacie de Roche diagnostics ⁹⁷. Dans cette étude, il a comparé des lignées cellulaires issues de mélanomes malins humains métastatiques et non métastatiques. Le gène THW est retrouvé sous-exprimé dans la lignée cellulaire métastatique par rapport à la lignée non métastatique. Dans cette publication, l'expression de THW est analysée par Northern Blot sur de nombreux tissus, à l'aide d'une membrane commerciale. Il ressort de cette étude que THW est exprimé dans la plupart des tissus sains : cerveau, tube digestif, poumon, foie, rein, prostate, utérus, cette liste n'est pas exhaustive. De plus l'expression de THW est plus faible dans des carcinomes mammaires et dans des cellules pancréatiques dérivant de métastase, par rapport aux tissus sains équivalents.

L'ORF (Open Reading Frame) de ce gène contient 1890 nucléotides qui codent pour une protéine à 193 résidus. L'étude de la séquence protéique *in silico*, montre qu'elle contient quatre domaines transmembranaires et que cette protéine n'a aucune similitude avec les protéines déjà décrites.

Le gène THW est localisé sur le chromosome 6 en 6q. Cette région présente une perte d'hétérozygotie dans les mélanomes, les carcinomes mammaires, de la prostate et de l'utérus. Dans une seconde publication ⁹⁸, cette même équipe a mis en évidence la perte d'hétérozygotie de THW dans des lignées cellulaires de mélanomes, de cancers du sein, du pancréas, du colon et de la prostate. Au niveau des mélanomes, la prévalence passe de 10-20 % à 50 % lors de la présence de métastases. C'est pourquoi le gène THW est considéré par ces auteurs comme un gène potentiellement suppresseur de tumeur.

Dans notre étude, nous retrouvons l'expression de ce gène dans différents prélèvements. Toutefois, nous n'avons pas pu conclure sur son expression dans les cellules cancéreuses. La forte expression de THW dans l'épiderme a biaisé l'ensemble de nos résultats. Un moyen de connaître l'expression de THW serait de travailler uniquement à partir d'échantillons microdisséqués.

Quant à la surexpression de THW mise en évidence dans les deux prélèvements ganglionnaires par rapport aux lymphocytes sanguins sains, il serait intéressant de la vérifier par rapport à des ganglions réactionnels. En effet, dans le premier article publié sur le gène THW, l'expression du gène THW est plus importante dans les ganglions que dans les lymphocytes sanguins⁹⁷.

5.4.3 p120 caténine (AF062343)

Le gène codant pour la protéine p120 caténine a été isolé à partir de la première banque de soustraction (SSH 1). Les résultats de criblage de la banque montrent que ce gène est faiblement exprimé dans la tumeur et qu'il n'est pas exprimé dans la non-tumeur.

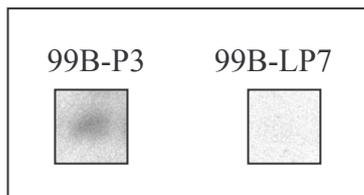


Figure 36 : Dot Blot p120 - Criblage de la SSH 1

Les résultats de RQ-PCR relative montrent une surexpression de la p120 caténine dans trois cas sur sept pour les tumeurs initiales de LCP CD30+ et dans deux cas sur trois pour les récurrences. Quant aux L. systémiques CD30+, les deux cas présentent une surexpression d'un facteur 4,5 par rapport à des lymphocytes sanguins sains.

La protéine p120 caténine a été isolée en 1989 comme substrat de l'oncoprotéine Src⁹⁹. Son gène est localisé sur le chromosome 11 en 11q11¹⁰⁰. La p120 caténine interagit directement avec les cadhérines et à ce titre elle est impliquée dans l'adhésion cellulaire¹⁰¹. Elle s'associe aux E-cadhérines, au niveau de leur domaine juxtamembranaire. À la différence de la bêta caténine, la p120 caténine n'interagit pas directement avec l'alpha caténine. Dans le modèle proposé par Anastasiadis et Reynolds¹⁰², la p120 caténine jouerait un rôle dans la « clusterisation » des E-cadhérines avant que ces dernières n'interagissent avec le réseau d'actine cytoplasmique.

Au même titre que les autres caténines, elle jouerait également un rôle dans la signalisation cellulaire. La p120 caténine interagit avec le facteur de transcription Kasko¹⁰³. Une étude réalisée par le groupe de Mc Crea montre que le facteur de transcription Kasko réprime la transcription d'un gène rapporteur¹⁰⁴. Les gènes cibles du complexe Kasko - p120 ne sont

actuellement pas identifiées. D'autres auteurs montrent la localisation nucléaire de la p120 caténine dans des lignées cellulaires n'exprimant pas l'E-cadhérine, issues de carcinome ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Cette localisation nucléaire de la p120 caténine semble être liée au phénotype cancéreux.

De plus, de nombreuses publications décrivent l'expression de la p120 caténine dans certains cancers. L'ensemble de ces études a été réalisé par marquage immunohistochimique. La protéine p120 caténine est retrouvée sous-exprimée dans les cancers du sein ¹⁰⁸, dans les cancers du colon ^{109,110}, dans les cancers de la vessie ^{111,112}. Par contre, une autre étude décrit une surexpression de p120 caténine dans les carcinomes gastriques ¹⁰⁷. De plus, ces auteurs décrivent une augmentation du marquage cytoplasmique qui dans certains cas s'accompagne d'une diminution de la coloration à la membrane.

Pour conclure, notre étude met en évidence une surexpression de la p120 caténine au niveau des ARNm. Notre résultat n'est pas en contradiction totale avec la littérature, en effet l'équipe de Jawhari a mis en évidence une surexpression de la protéine p120 caténine dans des cancers gastriques ¹⁰⁷. Pour pouvoir confronter nos résultats à ceux de la littérature, il serait intéressant de vérifier par immunohistochimie l'expression de cette protéine dans les cellules CD30+ et également d'y regarder la localisation nucléaire ou cytoplasmique de la p120 caténine.

5.4.4 SPARC (J03040)

Ce gène est issu de la banque de soustraction SSH 2. Après le criblage de cette banque, nous avons séquencé trois clones différents qui s'alignent avec la séquence de SPARC. Deux des clones s'alignent au niveau de la région centrale de l'ADNc de SPARC, le troisième correspond à sa région 3'. Les résultats de Dot Blot montrent bien une surexpression de ce gène dans les échantillons tumoraux par rapport à l'échantillon non tumoral.

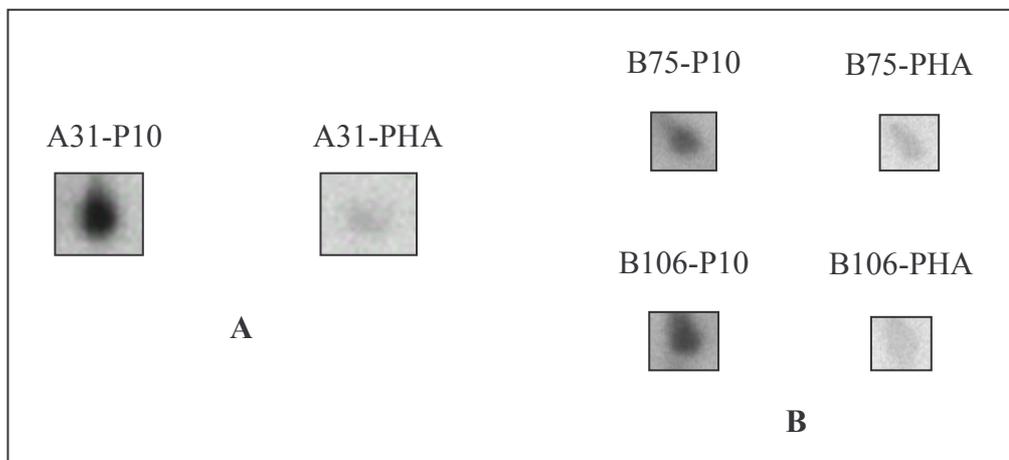


Figure 37 : Dot Blot SPARC - Criblage de la SSH 2 (A) - Sélection des gènes (B)

Nous retrouvons par RQ-PCR relative une surexpression dans cinq prélèvements, deux tumeurs initiales de LCP CD30+, deux récidives de LCP CD30+ et dans un des deux cas de L. systémique CD30+. De plus, le taux de surexpression est au moins deux fois plus élevé dans les récidives que dans les tumeurs initiales de LCP CD30+. Dans un cas de LCP CD30+ nous retrouvons une sous-expression (échantillon P1). Ce résultat est à modérer car les ARN de cet échantillon sont de mauvaise qualité. En effet l'analyse sur gel d'agarose a montré une dégradation partielle de ces ARN.

SPARC « Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine », également appelée ostéonectine ou encore BM-40¹¹³, est une glycoprotéine associée à la matrice extracellulaire. Elle a été isolée en 1981 par l'équipe de Termine¹¹⁴ comme un constituant majeur n'appartenant pas à la famille des collagènes dans la moelle bovine.

Cette protéine est codée par un gène localisé sur le chromosome 5 en 5q31-q33¹¹⁵. Ce gène ne contient pas de boîte TATA et il est transcrit en un ARNm majoritaire de 2,2 kb, il existe également en plus faible quantité la transcription d'un ARNm de 3 kb¹¹⁶. La protéine SPARC est composée de 298 à 304 résidus, elle est maturée par des glycosylations. Cette protéine est organisée en trois domaines distincts : un domaine acide en N-terminal qui contient le peptide signal, un domaine central riche en cystéine et un domaine C-terminal qui permet à SPARC de se lier aux cellules et à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des collagènes¹¹⁷.

SPARC est impliqué dans de nombreux processus biologiques, adhésion cellulaire, prolifération, différenciation, synthèse de la matrice extracellulaire, angiogénèse et progression des cellules tumorales¹¹⁷⁻¹²¹.

Dans de nombreux types de cancers on retrouve une surexpression de SPARC : dans les carcinomes métastatiques, dans les mélanomes^{122,123}, dans les cancers colo-rectaux¹²⁴, dans les carcinomes de l'œsophage¹²⁵, dans les cancers de la prostate¹²⁶.

L'équipe de Ledda a montré qu'une suppression de l'expression de SPARC, à l'aide d'ARN anti-sens dans des cellules de mélanome, restaurait le phénotype non tumoral¹²⁷. Une autre étude intéressante est celle du groupe de Bos, réalisée sur une lignée cellulaire de cancers du sein¹²¹. Cette équipe a montré que le promoteur du gène SPARC contient une séquence AP-1 reconnue par le complexe c-jun / Fra-1. De plus, la fixation du complexe c-jun / Fra-1 sur le promoteur du gène SPARC induit la transcription de ce dernier.

Ainsi, ces différentes études montrent l'importance du gène SPARC dans la progression des cancers humains. De plus, les études de Ledda et Brigg laissent penser que l'expression du gène SPARC est liée au degré de prolifération cellulaire.

Le fait que nous retrouvions une surexpression du gène SPARC dans cinq prélèvements tumoraux est en accord avec la littérature. En se basant sur l'idée que l'expression du gène SPARC est en relation avec l'état de prolifération des cellules tumorales, nous pouvons en déduire que les échantillons tumoraux ne présentant pas de surexpression sont peut-être en

phase de régression. Dans les récurrences de LCP CD30+, nous retrouvons un plus fort taux d'expression, signe d'une prolifération cellulaire accrue. Cette comparaison entre le taux d'expression du gène SPARC et le niveau de prolifération des cellules tumorales pourra être étudié sur de nouveaux prélèvements dont on aura noté lors de la biopsie s'ils sont en phase de croissance ou en phase de régression. Une autre approche possible pour connaître l'état d'une biopsie serait d'étudier par immunohistochimie la présence de marqueurs du cycle cellulaire. On peut par exemple étudier la présence de l'antigène nucléaire Ki-67 dont l'expression est corrélée à une forte prolifération cellulaire³⁴.

5.4.5 PTTG1 (NM_004219)

Ce gène a été isolé dans la SSH 8. Les résultats de criblage de cette banque montrent une forte expression du gène PTTG1 dans l'échantillon tumoral et une faible expression dans l'échantillon non-tumoral.

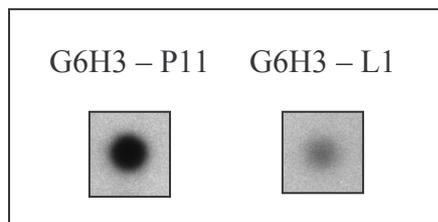


Figure 38 : Dot Blot PTTG1 - Criblage de la SSH 8

Par RQ-PCR relative, nous avons mis en évidence une surexpression (avec un facteur 4 au minimum) de ce gène dans six des sept cas de tumeurs initiales de LCP CD30+. Nous n'avons pas retrouvé de surexpression dans les récidives ; ces résultats sont à modérer car les valeurs entre les deux groupes tumeur initiale et récidive sont relativement proches. Au niveau des ganglions, PTTG1 est retrouvé surexprimé dans l'extension ganglionnaire du LCP CD30+ (avec un taux similaire à la localisation cutanée chez le patient P11) ; dans les L. systémiques CD30+, on note une forte surexpression pour les deux cas étudiés.

PTTG1 est un oncogène isolé en 1997 par l'équipe de Pei L et Melmed S¹²⁸. La famille des gènes PTTG comprend au moins trois membres. PTTG1 contient cinq exons et quatre introns et est localisé sur le chromosome 5q35.1¹²⁹. PTTG2 et PTTG3 ne contiennent pas d'intron et sont respectivement localisés sur les chromosomes 4p15.1 et 8q13.1^{130,131}.

Des expériences de Northern Blot et de RT-PCR montrent que PTTG1 est faiblement exprimé dans la plupart des tissus et dans les leucocytes sanguins sains mais que son expression est élevée dans les lignées cellulaires tumorales et dans les cancers de la glande pituitaire^{130,132,133}. Il est également surexprimé dans la lignée cellulaire Jurkat, issue d'un lymphome T

¹³⁴. Un taux élevé d'ARNm de PTTG1 a également été mis en évidence dans différentes tumeurs humaines comme des cancers hématopoïétiques ¹³⁴, des testicules, des ovaires et du sein ¹³⁵, ou encore dans des tumeurs colo-rectales ¹³⁶. La surexpression de cet ARN, dans le cas des cancers des ovaires, ne semble pas être due à une modification de la séquence du gène PTTG1 ¹³⁵.

Une étude récemment publiée par l'équipe de Japon met en évidence la présence de la protéine PTTG1 par immunohistochimie dans 70 % des lymphoproliférations de phénotype T et dans près de 39 % pour le phénotype B. Ils en concluent que le proto-oncogène PTTG1 est probablement impliqué dans les processus de lymphomagenèse ¹³⁷.

La fonction de ce gène est partiellement connue. Il a été montré que PTTG1 induit la formation de tumeur *in vivo* et régule la sécrétion du facteur de croissance bFGF ^{128,132}. Des expériences sur le rat montrent que l'expression de PTTG1 est régulée par les oestrogènes et également par le facteur de croissance bFGF ¹³⁸. PTTG1 joue aussi un rôle négatif dans la ségrégation des chromatides ¹³⁹.

Au regard de la littérature, on peut considérer le gène PTTG1 comme un oncogène. Sa surexpression dans une majorité des prélèvements de notre étude paraît constituer une piste intéressante pour des études d'immunohistochimie. Le fait que nous ne retrouvions pas de surexpression dans les trois cas de récives de LCP CD30+ est intéressant. Bien sûr, il faut augmenter le nombre des échantillons étudiés pour vérifier cette différence entre les tumeurs initiales et les récives de LCP CD30+.

5.4.6 Humanine (AY029066)

L'humanine correspond à un clone de la SSH1 qui présente lors du criblage sur clones bactériens une expression plus faible dans l'échantillon tumoral que dans l'échantillon sain. Lors de la sélection des gènes par Dot Blot, l'humanine a été sélectionnée car elle était retrouvée avec un fort signal dans les quatre sondes tumorales.

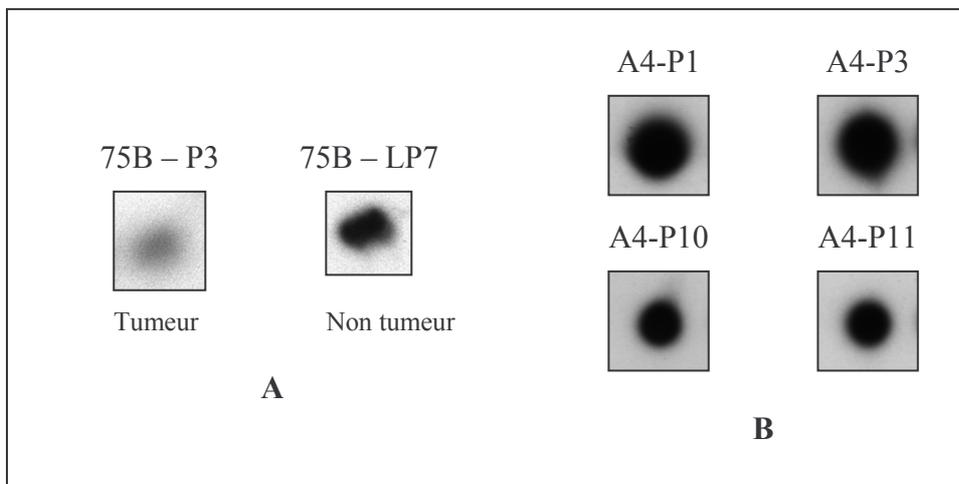


Figure 39 : Dot Blot Humanine - Criblage de la SSH 1 (A) - Sélection des gènes (B)

Par la techniques de RT-PCR relative, nous obtenons des résultats similaires. Nous retrouvons l'humanine dans les lymphocytes sanguins sains et dans ceux issus de LCP CD30+ et de L systémiques CD30+. L'humanine est sous exprimée avec un facteur trois au minimum, dans neuf des onze LCP CD30+ étudiés et dans un des deux L systémiques CD30+.

En examinant l'expression de ce gène, nous ne pouvons pas distinguer les LCP CD30+ des L systémiques CD30+ puisque sur les deux échantillons de L systémiques CD30+, un présente également une sous expression. De même, nous n'observons pas de différences entre les sous groupes de LCP CD30+ : tumeur initiale, récurrence ou avec extension extracutanée. Néanmoins, l'expression de ce gène est décrite pour la première fois dans des lymphocytes et il serait intéressant d'augmenter le nombre d'échantillons pour faire une étude statistique sur son expression dans le spectre des lymphoproliférations CD30+.

En effet, l'expression de l'humanine n'est pas décrite dans les lymphocytes sanguins. Seule l'équipe d'Hashimoto a étudié par Northern Blot la présence de l'humanine dans les leucocytes, le résultat a été négatif¹⁴⁰. Cette différence de résultats peut être imputée à la différence de sensibilité entre le Northern Blot et la RQ-PCR que nous avons employée.

L'humanine a été clonée en 2001 lors d'expériences de « death trap screening »¹⁴⁰. Cette équipe travaille sur la maladie d'Alzheimer et elle montre que l'humanine protège de l'apoptose induite par les gènes FAD et par la bêta amyloïde. L'humanine est un peptide de 24 résidus qui a donc un rôle anti-apoptotique^{140,141}. Une particularité de ce peptide est de contenir un signal peptide de sécrétion qui est confondu avec le peptide lui-même : 23 des 24 ou les 24 résidus confèrent à l'humanine ses capacités sécrétrices¹⁴⁰.

L'ARNm majoritaire de l'humanine est de 1,6 kb, néanmoins deux autres formes sont retrouvées, respectivement de 2 et 1 kb environ. L'analyse par Northern Blot de l'humanine montre que ce gène est exprimé dans le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, les reins et le foie¹⁴⁰. La séquence de l'humanine est très proche de celle de l'ARN 16S qui est mitochondrial, mais les dernières recherches de l'équipe de Hashimoto ont mis en évidence le peptide *in vivo*^{141,142}. Bien que l'existence du peptide humanine soit admise par les différentes équipes, la localisation de son gène est encore discutée et nous retrouvons deux hypothèses dans la littérature. La première est plus particulièrement soutenue par les découvreurs de l'humanine qui démontrent que le gène de l'humanine est probablement chromosomique. En effet par alignement de la séquence nucléotidique de l'humanine ils ont trouvé des régions homologues dans les chromosomes 5, 11 et X. Le pourcentage d'homologie de l'humanine avec ces régions chromosomiques varie entre 92 et 95 %^{141,142} tandis qu'on arrive à 99 % avec la séquence de l'ARN 16S au niveau du génome mitochondrial. La seconde hypothèse soutenue par l'équipe de Tarantul¹⁴³ considère que le gène de l'humanine est mitochondrial. En effet, dès 1985 il est décrit que l'ARN 16S peut de manière transitoire posséder une queue poly-A¹⁴⁴. De plus l'ARN 16S est retrouvé surexprimé dans différents cancers¹⁴⁵. Ces données laissent penser que l'ARN 16S peut être traduit en protéine.

Un homologue de ce peptide a été également identifié chez le rat, nommé la Rattine. Ce dernier comporte 38 résidus et est également secrété. L'ARNm de la Rattine, de 1,6 kb, est retrouvé, comme l'humanine, dans les cellules neurales, dans le cœur et les muscles squelettiques. La Rattine a également une fonction de neuroprotection ¹⁴⁶.

La fonction anti-apoptotique de l'humanine décrite dans la littérature peut s'expliquer par la capacité qu'ont les LCP CD30+ à régresser de manière spontanée. En effet, la sous-expression de l'humanine, facteur anti-apoptotique, dans les LCP CD30+ pourrait favoriser la régression de la tumeur par apoptose.

La séquence de l'humanine est très proche de celle de l'ARN 16S, avec seulement quatre bases qui diffèrent. Cette forte identité séquentielle peut induire un biais dans notre étude par RQ-PCR relative. En effet, l'alignement des séquences de l'humanine et de l'ARN 16S ne nous permet pas de choisir des amorces spécifiques de l'humanine. Seul le séquençage permettrait de vérifier la séquence précisément et de savoir si l'on a cloné l'humanine ou l'ARN 16S. Néanmoins, le fait que l'humanine puisse être traduite à partir de l'ARN 16S éliminerait ce biais.

Pour valider notre étude, nous devons vérifier la présence du peptide humanine dans les LCP CD30+ et dans les lymphocytes sanguins. Cette étude pourra être réalisée par immunohistochimie puisqu'un anticorps anti-humanine existe ¹⁴¹.

5.4.7 CIN 85 (AF230904)

CIN 85 a été isolé à partir de la banque de soustraction SSH 2. Les résultats de criblage de cette banque montrent une expression un peu plus élevée dans la tumeur, par rapport à la non-tumeur. Cette dernière correspond à des lymphocytes sains activés à la PHA. Nous n'avons pas pu utiliser ces mêmes ARN pour les études en RQ-PCR relatives du fait des faibles quantités que nous avons extrait.

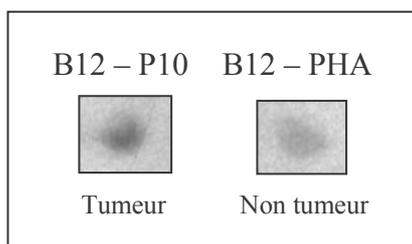


Figure 40 : Dot Blot CIN 85 - Criblage de la SSH 2

Les résultats de RQ-PCR relative montrent une sous-expression du gène CIN 85 dans sept prélèvements dont cinq tumeurs initiales et deux récidives de LCP CD30+. Nous n'avons pas retrouvé de variation d'expression de ce gène dans les L. systémiques CD30+.

La différence de résultats entre les techniques de Dot Blot et de RQ-PCR peut s'expliquer par la différence entre les ARN non tumoraux utilisés, des lymphocytes activés ou non à la PHA. Pour vérifier notre hypothèse, il faudrait valider par RQ-PCR relative l'expression de CIN 85 dans des lymphocytes activés à la PHA.

CIN 85 est une protéine adaptatrice identifiée indépendamment par des équipes travaillant sur différentes espèces. Chez l'homme, elle a été isolée comme interagissant avec la protéine Cbl¹⁴⁷. Chez le rat, elle est décrite sous les noms de Ruk pour « Regulator of Ubiquitous Kinase »¹⁴⁸ et SETA pour « SH3 domain-containing gene Expressed in Tumorigenic Astrocytes »¹⁴⁹. Et enfin, chez la souris, nous la retrouvons sous le nom de SH3KBP1 pour « SH3 domain Kinase Binding Protein 1 »¹⁵⁰. On note une homologie de 92 à 97 % entre ces différentes séquences nucléotidiques¹⁵¹.

Le gène de CIN 85 est localisé sur le chromosome X en Xp21.1-p21.3 chez la souris ¹⁵⁰. L'ARN de ce gène est de 3,2 kb et code pour une protéine de 85 kDa ^{147,148,152}.

Les ARNm de CIN 85 ou de ses homologues sont exprimés dans de nombreux types cellulaires humains. CIN 85 a été mis en évidence, par des techniques de Northern blot dans différents tissus humains : le cœur, le cerveau, le placenta, les poumons, le foie, les muscles squelettiques, les reins et le pancréas ¹⁴⁷. Toujours par Northern Blot, l'ARNm de CIN 85 est retrouvé dans des lignées cellulaires dérivées de cancers humains : K-562, Raji, HL-60, HeLaS3, MOLT-4, SW480, A549, G361 ¹⁴⁷. Des études par Western Blot, réalisées par le groupe de Bouchman, ont mis en évidence l'expression de la protéine Ruk (homologue de CIN 85 chez le rat) dans différentes lignées cellulaires humaines : Raji, HFB1, Jurkat (lymphocyte T humain), K562, U937 (lignée cellulaire de leucémie myéloïde humaine) ¹⁴⁸.

CIN 85 forme avec la protéine CMS (pour « Cas ligand with Multiple SH3 domains ») ¹⁵³ une nouvelle famille de protéines adaptatrices. L'organisation de leurs domaines protéiques est similaire, on note 39 % d'identité et 59 % de similitude dans la séquence en acides aminés ¹⁵¹.

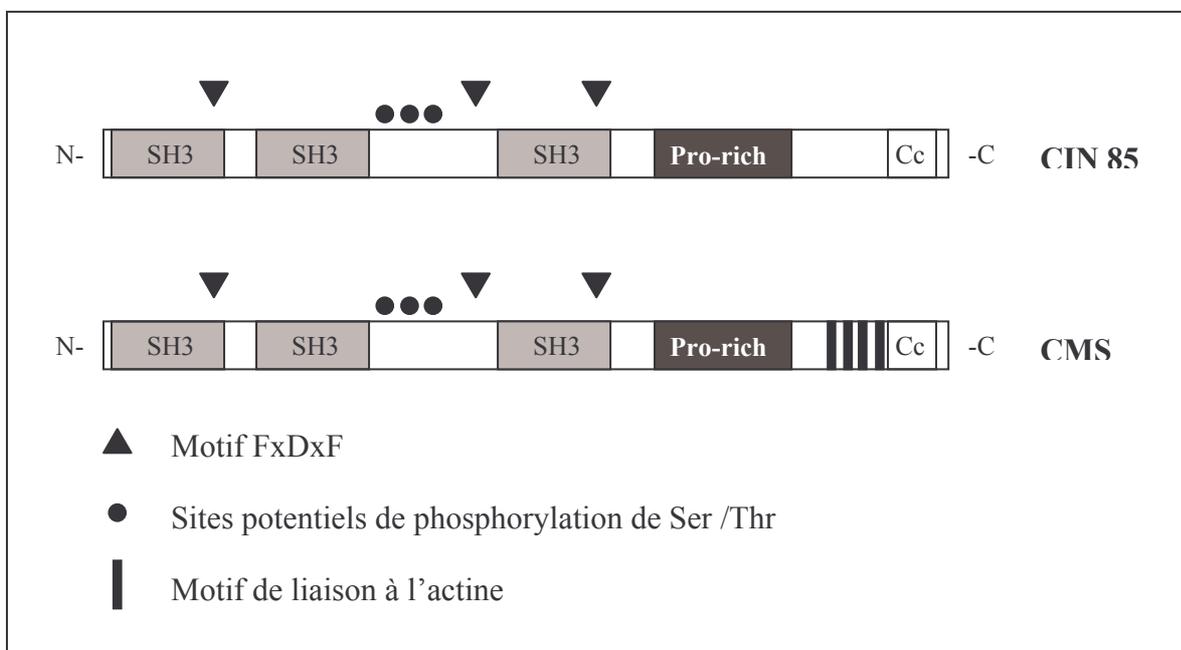


Figure 41 : Structures des protéines CIN 85 et CMS ¹⁵¹

Les domaines SH3 sont impliqués dans des interactions protéine / protéine. Entre les deuxième et troisième domaines SH3 se trouvent des résidus sérine et thréonine, potentiellement phosphorylables. Les séquences FxDxF peuvent servir de sites de liaison aux protéines adaptatrices clathrine AP2 ¹⁵⁴. La région riche en proline peut être reconnue par d'autres protéines contenant des domaines SH3. On retrouve en C-terminal une structure appelée « coiled coil » impliquée dans les interactions protéiques homo ou hétérotypiques. La protéine CMS diffère de la protéine CIN 85 par la présence de cinq domaines de liaison à l'actine dans la protéine CMS.

Par des études en double hybride, de nombreuses protéines interagissant avec CIN 85 ont été isolées. Elles sont regroupées dans le tableau suivant.

Protéine	Région impliquée	Fonctions	Références
c-Cbl	Domaines SH3	Régulation négative de RTKs	147,153,155
Cbl-b	Domaines SH3	Régulation négative de RTKs	156
BLNK	Domaines SH3	Signalisation du BcR	157
SB1	Domaines SH3	Non défini	149
CD2	Domaine SH3 N° 2	Polarisation, clustering TcR	149
AIP1/Alix	Domaine SH3 N° 2	Apoptose cellules gliales	152
p85 PI-3K	"Prolin-rich"	Régulation négative de PI-3 Kinase. Induction apoptose dans cellules neurales	148
Grb2	"Prolin-rich"	Régulation signalisation RTK	149,153,157
p130Cas	"Prolin-rich"	Régulation cytosquelette actine	153,157
Endophilines	"Prolin-rich"	Régulation internalisation RTK	155,158
CIN 85/CMS	"Coiled coil"	Homodimérisation CIN 85/CMS	149,153,157
AP2	Séquence FxDxF	Régulation endocytose via clathrine	154

Tableau 27 : Protéines interagissant avec CIN 85 ¹⁵¹

Parmi ces études, deux d'entre-elles montrent que CIN 85 est impliquée dans l'apoptose. Dans l'étude menée par l'équipe de Bogler ¹⁵², les auteurs ont introduit dans des astrocytes de rats, différentes constructions du gène SETA (homologue de CIN 85 chez le rat). Ils ont ensuite soumis ces cellules à des radiations UV. Ils ont ainsi mis en évidence que la surexpression de la protéine SETA native, ou contenant au moins le second domaine SH3,

induisait l'apoptose des cellules en réponse à des dommages de l'ADN. Cette voie de signalisation passe par l'interaction de SETA avec la protéine AIP1 au niveau du domaine SH3 N°2.

Une autre étude intéressante est celle de l'équipe de Buchman ¹⁴⁸. Les auteurs ont mis en évidence une interaction entre les protéines Ruk (homologue de CIN 85 chez le rat) et PI-3 Kinase. Cette étude a été réalisée dans une lignée cellulaire de leucémie myéloïde humaine (U937). Cette interaction implique la région riche en proline de Ruk et le domaine SH3 de la sous-unité p85 de la protéine PI-3 Kinase. Ils ont également montré que la surexpression de Ruk dans des lignées cellulaires de neurones de souris induit l'apoptose de ces derniers. Cet effet peut être éliminé par la coexpression de la sous-unité catalytique de la PI-3 kinase, forme constitutivement activée, dans ces lignées cellulaires. Ruk est donc un inhibiteur de l'activité anti-apoptotique de la PI-3 Kinase.

Nous avons trouvé une sous-expression de CIN 85 dans les LCP CD30+ qui peut s'expliquer par l'importance pour un cancer d'éteindre les gènes pro-apoptotiques. Néanmoins, d'autres études montrent que CIN 85 est également impliquée dans des processus de prolifération cellulaire. Le travail réalisé par l'équipe de Bogler met en évidence l'importance des partenaires de SETA pour le devenir de la cellule : apoptose ou prolifération ¹⁴⁹.

Il serait intéressant de rechercher par des techniques d'immunoprécipitation quel est ou quels sont les partenaires de CIN 85 dans les LCP CD30+. Cette étude permettrait de savoir si la sous-expression de CIN 85 est liée à une diminution de la capacité d'entrer en apoptose des cellules tumorales CD30+.

5.4.8 Bcl11B (NM_022898)

Ce gène a été isolé à partir de la SSH 8. Lors du criblage de la banque SSH 8, nous avons obtenu un signal fort avec la sonde tumorale et un signal moyen avec la sonde non tumorale.

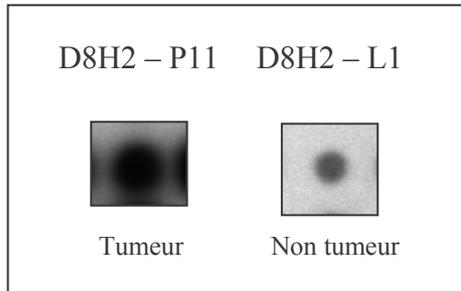


Figure 42 : Dot Blot Bcl11B - Criblage de la SSH 8

Les résultats de RQ-PCR relative montrent une sous-expression de Bcl11B dans sept prélèvements dont quatre tumeurs initiales, deux récives de LCP CD30+ et un cas de L. systémique CD30+.

Nous n'avons pas mis en évidence de variation d'expression de l'échantillon tumoral P11, échantillon utilisé pour la banque de soustraction. Ce résultat n'est pas en adéquation avec les résultats de Dot Blot qui montrent une surexpression de Bcl11B mais peut s'expliquer par l'utilisation de nombreux prélèvements de lymphocytes sanguins sains dans les expériences de RQ-PCR relative. En effet, la valeur d'expression de Bcl11B dans le tissu sain correspond à la moyenne des expressions obtenues dans sept échantillons différents de lymphocytes sanguins sains.

On trouve dans la littérature différents noms pour les gènes de la famille Bcl11. Ainsi, Bcl11A¹⁵⁹ est aussi appelé CTIP1¹⁶⁰ ou encore Evi9^{161,162}. Quant à Bcl11B¹⁵⁹, on le retrouve sous le nom de CTIP2¹⁶⁰ et chez la souris sous le nom de Rit1¹⁶³.

Le gène de Bcl11A est localisé sur le chromosome 2 en 2p13 ¹⁶², celui de Bcl11B est localisé sur le chromosome 14 en 14q32.1 ¹⁵⁹. Rit1 (homologue de Bcl11B chez la souris) est localisé sur le chromosome 12 ¹⁶³. Ces régions chromosomiques sont le siège d'anomalies cytogénétiques dans de nombreuses pathologies lymphoprolifératives humaines ^{8,159}, comme dans des leucémies lymphoblastiques aiguës de phénotypes T, avec la t(15 ; 14)(q35 ; q32) ¹⁶⁴.

Bcl11B présente 67 % d'identité nucléotidique et 61 % d'identité protéique avec Bcl11A. Bcl11B présente également 86 % d'identité avec la protéine murine CTIP2 ¹⁵⁹ et 93 % d'homologie avec la protéine de souris Rit1 ¹⁶³. Les gènes de la famille Bcl11 codent pour des protéines contenant six doigts de zinc et une région acide. Au niveau des doigts de zinc, on observe 95 % d'identité protéique entre Bcl11A et Bcl11B. En 5' de ces gènes, on trouve un îlot CpG ¹⁵⁹. Ces protéines sont strictement localisées dans le noyau ^{161,162}. La structure des protéines Bcl11 A et B est détaillée dans la figure suivante.

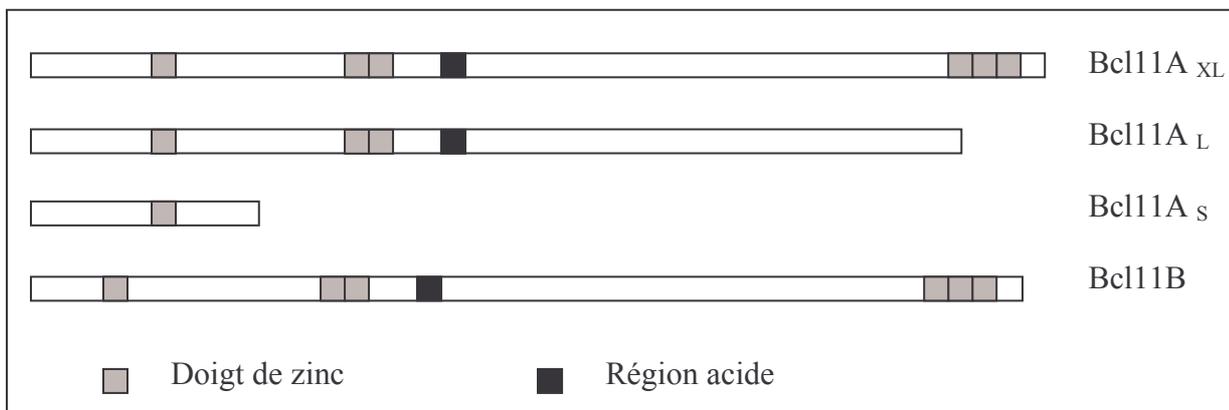


Figure 43 : Schéma des protéines Bcl11A et Bcl11B ¹⁵⁹

Les gènes de la famille Bcl11 sont principalement exprimés dans deux types cellulaires distincts, dans les cellules du système immunitaire et dans les cellules du cerveau. Par des expériences de Northern Blot, l'équipe de Satterwhite a mis en évidence une forte expression de Bcl11A dans les ganglions lymphatiques sains, dans le thymus et dans la moelle osseuse. Elle n'a pas trouvé d'expression dans les autres tissus humains ¹⁵⁹. Elle retrouve également une forte expression de l'ARNm de Bcl11A dans le cerveau fœtal et dans les leucémies B portant la translocation t(2;14)(p13;q32.3). Par des expériences d'hybridation *in situ*, elle a

montré que Bcl11A était exprimée uniquement dans les cellules B du centre germinatif et pas dans les cellules du manteau des ganglions lymphatiques. Ceci suggère un rôle de cette protéine dans le développement des cellules B. Quant à l'ARNm de Bcl11B, il est exprimé dans des lignées cellulaires malignes issues de lymphomes ou de leucémies de l'adulte de phénotype T ¹⁵⁹. Dans des lignées cellulaires malignes de phénotypes B étudiées par cette équipe, aucune expression de Bcl11B n'a été détectée par des techniques de Northern Blot. Une forte expression de Bcl11A et de Bcl11B dans le cerveau est également décrite par l'équipe de Leid ¹⁶⁰.

Chez la souris, Bcl11A (Evi9) est retrouvée par des expériences de Northern Blot dans le cerveau et dans la rate, et avec un taux d'expression plus faible dans les poumons et les testicules ¹⁶¹. Evi9 (Bcl11A) est également retrouvée dans des lignées cellulaires issues de leucémies myéloïdes de souris. Le gène Evi9 humain a été cloné et son expression a été étudiée par RT-PCR sur des cellules purifiées à partir de prélèvements humains. On retrouve une expression de Evi9 dans les cellules CD34, précurseurs de la lignée hématopoïétique, dans les cellules B, les monocytes et les mégacaryocytes. Aucune expression de l'ARNm Evi9 n'est trouvée par cette technique dans les cellules T ¹⁶².

Les études menées chez la souris par l'équipe de Kominami montrent l'expression de la protéine Rit1 (homologue de Bcl11B) dans le cerveau et le thymus mais pas dans les autres tissus testés : cœur, foie, rate et rein ¹⁶³.

CTIP 1 (Bcl11A) et CTIP 2 (Bcl11B) interagissent spécifiquement avec les membres de la famille des facteurs de transcription COUP-TF. Les protéines COUP-TF ont un rôle négatif sur la transcription de certains gènes cibles dont la transcription est médiée par d'autres récepteurs nucléaires tels que les récepteurs à l'acide rétinoïque, aux hormones thyroïdiennes, aux œstrogènes et à la vitamine D ¹⁶⁰. L'interaction de CTIP 1 avec ARP1 (COUP-TF II) potentialise l'action de régulateur négatif de la transcription de ARP1 ¹⁶⁰, de plus cette régulation négative de la transcription ne passe pas par la voie des histones deacétylases. Dans une étude plus récente, cette équipe a mis en évidence le rôle négatif de la famille CTIP dans la transcription d'un gène rapporteur ¹⁶⁵. Elle a isolé une séquence CTIP-RE, les protéines CTIP s'y lient de manière autonome et induisent une répression de la transcription sans

recruter les histones deacétylases et ceci dans des cellules n'exprimant pas les gènes de la famille COUP-TF, cellules du système immunitaire et de la lignée hématopoïétique ¹⁶⁵. Ce résultat suggère que l'expression atypique de CTIPs dans les cellules de la lignée hématopoïétique aboutit à une transformation des cellules et contribue au phénotype malin ¹⁶⁵.

L'équipe de Saiki montre que l'expression des isoformes de Evi9 dans des cellules HL-60 (lignée cellulaire de leucémie aiguë promyélocytaire) est régulée lors de la différenciation de ces cellules ¹⁶². De plus, une expression constitutive de Evi9 (Bcl11A) empêche la différenciation de la lignée cellulaire myéloïde dans les cellules HL60 ¹⁶². Cette étude met en évidence une fonction des gènes de la famille Bcl11 dans la lignée myéloïde. Une interaction a été décrite entre Evi9 et Bcl6 dans des lignées cellulaires de phénotype B, mais pas dans celle de phénotype T. Ces deux protéines colocalisent dans le noyau ¹⁶¹. Bcl6 est aussi une protéine à doigts de zinc qui agit comme répresseur de la transcription via une séquence spécifique ^{166,167}. La fonction de ce complexe n'est pas élucidée, néanmoins, on peut penser à un modèle équivalent à celui de CTIP1 et ARP1 dans le cerveau ¹⁶⁰. Ainsi, la fixation de Evi9 sur Bcl6 favoriserait l'action répresseur de la transcription de Bcl6. Evi9 est capable d'induire la transformation de cellules NIH 3T3 (fibroblaste). Ces résultats suggèrent un rôle d'oncogène pour la protéine Evi9 ¹⁶¹.

L'étude publiée récemment par l'équipe de Kominami met en évidence des délétions homozygotes qui induisent la perte d'expression de la protéine Rit1 (homologue de Bcl11B) dans des lymphomes du thymus. Ces lymphomes sont induits par irradiation de souris aux rayons gamma ¹⁶³. Cette étude démontre également le rôle de suppresseur de tumeur de la protéine Rit1. Un autre point intéressant de cette étude est l'analyse de la protéine p53 chez les souris atteintes de lymphomes du thymus : les auteurs montrent que les souris de phénotype p53_{WT} présentent plus fréquemment des altérations du gène Rit1 que celles qui ont des mutations du gène p53.

Au regard de la littérature, on retrouve généralement une surexpression des gènes de la famille de Bcl11 dans différentes pathologies lymphoprolifératives humaines. Toutefois, la dernière publication en date montre une perte de l'expression de la protéine Rit1 (homologue de Bcl11B chez la souris) dans des lymphomes de phénotypes T ¹⁶³. Comme nous retrouvons

une sous-expression de Bcl11B dans les LCP CD30+ et dans les L. systémiques CD30+ étudiés, nous supposons que la voie de signalisation qui induit la prolifération cellulaire via la protéine Bcl11B peut être impliquée dans ces pathologies. Cette hypothèse doit bien évidemment être étayée, d'une part en augmentant le nombre d'échantillons et d'autre part en étudiant le niveau d'expression de la protéine Bcl11B ainsi que la présence de délétions dans son gène, dans les lymphoproliférations CD30+.

5.4.9 CD30, CD30 variant (M83554) et CD30 L

Bien que nous n'ayons pas retrouvé le CD30 dans les différentes banques soustraites, nous avons étudié par RQ-PCR relative l'expression du CD30. Nous avons mis en évidence une surexpression du CD30 dans l'ensemble des prélèvements analysés sauf dans trois cas : P5, P16 et P4. Ces derniers prélèvements sont les trois qui présentent une surexpression de la kératine 6. La faible expression du CD30 peut s'expliquer par le plus petit taux de cellules tumorales dans ces échantillons. Les principales données bibliographiques sur le CD30 sont présentées dans l'introduction, au chapitre 1.2.3.1. En résumé, nous savons que l'expression du marqueur de surface CD30 est élevée dans les LCP CD30+, d'où l'origine de leur nom. Les résultats que nous retrouvons en RQ-PCR relative sont bien en adéquation avec la littérature.

Nous avons également étudié le niveau d'expression du CD30L. Nous avons mis en évidence une sous-expression, voire une absence d'expression dans les prélèvements analysés. L'analyse fine des résultats permet de distinguer trois groupes :

- Sous-expression inférieure à 15 : Un prélèvement de LCP CD30+ tumeur initiale, une récurrence de LCP CD30+ et un L. systémique.
- Sous-expression comprise entre 30 et 60 : Deux cas de tumeur initiale et une récurrence de LCP CD30+, un cas de L. systémique.
- Sous-expression supérieure à 120 : Quatre cas de tumeur initiale et une récurrence de LCP CD30+ et un cas de L. systémique.

Au regard de ces résultats, nous ne pouvons pas distinguer les LCP CD30+ des L. systémiques CD30+. L'expression du CD30L est associée à une régression du lymphome, par activation des voies pro-apoptotiques³⁸. Le fait de pouvoir distinguer trois groupes dans les échantillons analysés pourrait s'expliquer par des prélèvements en phase de prolifération plus ou moins importante, voire en phase de régression. Cette hypothèse ne pourra être vérifiée que sur de nouveaux prélèvements où on aura noté lors de la biopsie la présence de nécrose, signe de régression du lymphome.

Nous avons mis en évidence par RQ-PCR relative une sous-expression du CD30v dans l'ensemble des lymphoproliférations étudiées, seul le prélèvement P9 ne présente aucune variation de l'expression du CD30v. Nous ne pouvons pas distinguer les LCP CD30+ des L. systémiques CD30+. L'ARNm du CD30v est retrouvé dans 70 % des lymphoproliférations de phénotypes B mais seulement dans 25 % des lymphoproliférations de phénotypes T. Dans cette étude, la présence de LCP CD30+ n'est pas clairement établie. Les auteurs parlent d'un seul cas de lymphoprolifération de phénotype T de bas grade, définition qui peut potentiellement correspondre à un LCP CD30+. Pour ce prélèvement, la transcription inverse spécifique du CD30v est négative ³³. Nos résultats sont en corrélation avec les données bibliographiques qui montrent une expression du CD30v dans seulement 25 % des lymphoproliférations T. Dans les différents échantillons que nous avons analysé, seul un sur treize présente une expression du CD30v au même niveau que dans les lymphocytes sains.

6 CONCLUSION GENERALE

L'étude présentée dans ce document consistait en l'identification de gènes impliqués dans le développement des lymphomes cutanés primitifs (LCP) CD30+. Les LCP CD30+ sont des proliférations malignes de lymphocytes T, localisées dans le derme. Ils se caractérisent, par rapport aux lymphomes systémiques CD30+, par un bon pronostic et par des phénomènes de régression spontanée et de récurrence.

Dans 60 % à 85 % des lymphomes systémiques CD30+, la translocation t(2,5) est présente²². Mais plusieurs études ont montré l'absence de cette translocation dans les LCP CD30+⁸¹. Leur oncogenèse reste donc à ce jour inconnue.

Le but de cette thèse a été d'identifier des gènes impliqués dans les LCP CD30+ afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans le développement de ce cancer. Ces gènes pourront également être utilisés comme marqueur des LCP CD30+ et ainsi aider au diagnostic ou encore servir de cibles thérapeutiques.

La démarche scientifique adoptée pour répondre à cette question est la suivante : dans un premier temps des banques soustraites sont réalisées par la technique de SSH. La seconde étape consiste à cribler ces banques de manière à réduire le nombre de faux positifs. La dernière étape permet de valider la variation d'expression des gènes sélectionnés par RQ-PCR relative.

Dans l'introduction de ce document, nous avons présenté la littérature afférente à notre étude. Nous avons ainsi pu dresser l'état des connaissances sur la biologie moléculaire des LCP CD30+. On ne retrouve que peu de données sur des gènes impliqués dans cette pathologie. En effet, les principales recherches portent sur la clonalité de ce cancer^{168,169}.

Nous avons réservé le premier chapitre à la réalisation des banques soustraites. Elles sont réalisées par la technique de SSH (Hybridation Soustractive Suppressive) qui permet de

comparer le profil d'expression de deux populations cellulaires et de mettre en évidence des gènes surexprimés dans une des deux populations. Les échantillons utilisés sont des LCP CD30+ et des lymphocytes sanguins de patients sains (ne présentant aucune maladie lymphoproliférative). La qualité de la soustraction est importante : plus la soustraction est efficace, moins la banque comporte de faux positifs. Sur les huit banques réalisées, nous en avons obtenues trois de bonne qualité. Pour la mise au point des expériences, nous avons également conservé la première SSH. La validation des banques soustraites pourra à l'avenir être réalisée par RQ-PCR relative. En effet, l'analyse de différents gènes pourrait être envisagée : le gène de ménage PO, la GAPDH (actuellement utilisée) et encore le CD30 qui n'a pas été retrouvé dans nos banques. Nous pourrions ainsi savoir s'il a été perdu dès la réalisation des banques où s'il n'a pas été cloné. Nous pourrions ainsi mieux vérifier la représentativité de nos banques soustraites. De même, nous pourrions tester des gènes dits « contaminants » afin de vérifier la pureté de nos préparations d'ARN et également la normalisation de la SSH, par exemple avec la kératine 6 ou encore avec les immunoglobulines.

Le deuxième chapitre est consacré au criblage des banques soustraites et au séquençage des clones d'intérêts. Nous avons dans un premier temps utilisé des membranes sur lesquelles nous avons transféré les clones bactériens. Cette technique a induit environ 30 % de clones non informatifs. Nous avons donc ensuite réalisé des membranes par dot blot, en transférant directement le produit de PCR correspondant aux différents clones de la banque. Nous avons ainsi sélectionné près de 350 clones sur les 2200 criblés. Le séquençage de ces clones a permis d'identifier 118 gènes d'intérêts. Nous avons également retrouvé des gènes spécifiques d'autres types cellulaires tel que la kératine 6 ou encore les immunoglobulines. Le choix des échantillons est important pour la réalisation de banques soustraites, en effet la présence de cellules épidermiques ou de lymphocytes réactionnels augmente le nombre de clones non spécifiques séquencés. Nous pensons à l'avenir réaliser des banques sur des échantillons microdisséqués afin de contourner ces problèmes. Une autre approche serait de trier les cellules à l'aide de billes magnétiques couplées avec un anticorps anti-CD30.

Le troisième chapitre de ce document est dévolu à la validation des variations d'expression des gènes d'intérêts par la technique de RQ-PCR relative. Nous avons utilisé le gène de ménage PO pour normaliser nos résultats. Nous avons étudié 32 gènes différents et nous

avons trouvé dix gènes qui présentent des variations d'expression entre les échantillons tumoraux et non tumoraux. Cinq sont surexprimés : THW, la p120 caténine, SPARC, PTTG1 et le CD30. Cinq autres sont sous-exprimés : l'humanine, CIN 85, Bcl11B, le CD30 variant et le CD30L. Les gènes suivants ne sont pas issus des banques soustraites : le CD30, le CD30s et le CD30L.

- THW est retrouvé fortement surexprimé dans onze prélèvements sur treize, malheureusement ce gène semble exprimé par les cellules épidermiques et non par les cellules tumorales. Il s'agit de la première mise en évidence de l'expression de THW dans l'épiderme humain.
- La p120 caténine est également surexprimée dans sept échantillons sur treize. Nous ne pouvons pas distinguer les LCP CD30+ des L. systémiques. La littérature décrit principalement des sous-expressions de ce gène dans divers cancers, néanmoins le groupe de Jawhari décrit une surexpression de la p120 caténine dans les cancers gastriques ¹⁰⁷. Pour pouvoir confronter nos résultats à ceux de la littérature, il serait intéressant de vérifier par immunohistochimie le taux de la protéine p120 caténine dans nos prélèvements. En effet, les différentes études référencées portent sur la protéine et non sur l'ARNm de la p120 caténine.
- SPARC est surexprimé dans cinq prélèvements sur les treize étudiés. SPARC est impliqué dans de nombreux processus biologiques, adhésion cellulaire, prolifération, différenciation et progression des cellules tumorales. La littérature met en corrélation le niveau d'expression de SPARC et le degré de prolifération des cancers. Il serait intéressant d'augmenter le nombre d'échantillons analysés pour vérifier si on peut distinguer les différentes lymphoproliférations CD30+ et ainsi corréler l'expression de SPARC à d'autres critères cliniques ou histologiques sur une plus grande série.
- PTTG1 est retrouvé surexprimé dans neuf cas sur treize. On ne note pas de surexpression dans les récidives de LCP CD30+, aussi il faudrait augmenter le nombre d'échantillons pour confirmer cette différence. Par contre, le niveau d'expression du

gène PTTG1 ne semble pas permettre la distinction entre les LCP CD30+ et les L. systémiques. Au regard de la littérature, on peut considérer le gène PTTG1 comme un proto-oncogène. Sa surexpression dans les échantillons tumoraux analysés dans cette thèse montre qu'il peut s'agir d'un gène impliqué dans les lymphoproliférations étudiées dans cette thèse.

- L'humanine est retrouvée sous-exprimée dans neuf des treize prélèvements analysés. La fonction anti-apoptotique de l'humanine décrite dans la littérature peut s'expliquer par la capacité qu'ont les LCP CD30+ à régresser de manière spontanée. En effet, la sous-expression de l'humanine, facteur anti-apoptotique, dans les LCP CD30+ pourrait favoriser la régression de la tumeur par apoptose. Pour valider notre étude, nous devrions vérifier la présence du peptide humanine dans les LCP CD30+ et dans les lymphocytes sanguins. Cette étude pourrait être réalisée par immunohistochimie puisqu'un anticorps anti-humanine est disponible ¹⁴¹.
- CIN 85 est sous-exprimée dans sept des treize cas étudiés. Par contre, nous ne retrouvons pas de variation de son expression dans les L. systémiques. CIN 85 est une protéine adaptatrice qui joue, en fonction de ses partenaires, un rôle pro-apoptotique ou prolifératif. Il serait intéressant de rechercher par des techniques d'immunoprécipitations quel est ou quels sont les partenaires de CIN 85 dans les LCP CD30+. Cette étude permettrait de savoir si la sous-expression de CIN 85 est liée à une diminution de la capacité d'entrer en apoptose des cellules tumorales CD30+. De plus, ce gène pourrait être un candidat pour la discrimination des lymphoproliférations CD30+, d'où l'importance d'étudier un plus grand nombre de biopsies.
- Bcl11B est retrouvé sous-exprimé dans sept échantillons sur treize. Ce gène ne permet pas d'individualiser les lymphoproliférations CD30+. Au regard de la littérature, nous supposons que la voie de signalisation qui induit la prolifération cellulaire via la protéine Bcl11B peut être impliquée dans ces pathologies. En effet une publication décrit la perte d'expression de la protéine Rit1 (homologue de Bcl11B chez la souris) dans des lymphomes du thymus de souris ¹⁶³. Cette hypothèse doit bien évidemment être étayée, d'une part en augmentant le nombre d'échantillons et d'autre part en

étudiant le niveau d'expression de la protéine Bcl11B ainsi que la présence de délétions dans son gène, dans les lymphoproliférations CD30+.

Notre travail a ainsi permis d'isoler sept gènes capables de jouer un rôle dans les lymphoproliférations CD30+ et plus particulièrement dans les LCP CD30+. Les voies de signalisations médiées par ces gènes sont probablement impliquées dans le développement des LCP CD30+. Néanmoins, nous ne pouvons savoir si ces modifications d'expressions sont impliquées dans le développement du cancer ou si elles correspondent uniquement à un phénotype des LCP CD30+, au même titre que le CD30. Nous avons également trouvé deux gènes qui pourraient aider à la discrimination entre les différentes pathologies étudiées dans ce manuscrit. PTTG1 pourrait servir de marqueur pour distinguer les récidives des tumeurs initiales d'un LCP CD30+. Quant à CIN 85, il permettrait de distinguer les L. systémiques des LCP CD30+. Ces hypothèses doivent bien sûr être vérifiées par l'étude d'un plus grand nombre d'échantillons. Bien que le recrutement des échantillons durant cette thèse ait été difficile, la présentation des travaux menés durant ces trois ans permet actuellement de recruter de nouveaux prélèvements de LCP CD30+ au niveau national.

7 ANNEXE : PROTOCOLES

7.1 Coupe au Cryostat et coloration

Plusieurs coupes de 8 μm sont réalisées au Cryostat pour chaque échantillon tumoral afin de localiser la zone tumorale et de vérifier le diagnostic.

Les coupes sont colorées à l'hématoxyline de Harris. Les lames sont fixées par un traitement de 5 à 10 mn dans un bain d'acétone pur, elles sont ensuite séchées à l'air. Les lames sont alors réhydratées dans un bain d'eau distillée pendant 1 à 2 mn puis colorées 1 mn dans un bain d'hématoxyline de Harris et rincées 2 mn sous l'eau courante. Afin de monter les lames avec une colle hydrophobe (Acrytol, Surgipath, Canada) celles-ci sont déshydratées par un passage dans les différents bains suivant : alcool à 95 % ; alcool à 100 % ; alcool à 100 % ; toluène ; toluène.

Les coupes sont enfin observées au microscope optique. Si l'épiderme est présent dans le fragment congelé, il est éliminé au scalpel avant l'extraction des ARN.

7.2 Préparation des lymphocytes activés à la PHA

Dans un premier temps, les lymphocytes sont récupérés par un lymphoprep à partir de sang d'un donneur sain. Dix millilitres de sang total sont centrifugés 10 mn à 1200 rpm et à 10°C. La phase supérieure qui correspond au plasma est éliminée. L'anneau intermédiaire, qui correspond aux globules blancs, est récupéré (1 à 2 mL) et mélangée à 1 volume de sérum physiologique. Ce mélange est déposé sur 3 mL de LymphoprepTM (Nycomed) et centrifugé 30 mn à 1200 rpm et à 10°C. La phase supérieure est éliminée et l'anneau de lymphocyte est récupéré et lavé dans 5 mL de milieu RPMI (Invitrogen Life Technologies). Deux millions de lymphocytes sont ainsi mis en culture 72 h à 37°C dans 4 mL de milieu RPMI contenant 10 %

v/v de SVF (Invitrogen Life Technologies), 1 % v/v HEPES (Invitrogen Life Technologies), en présence de 1 mg/mL de PHA.M (Sigma Aldrich Chimie).

Les lymphocytes activés sont enfin récupérés par centrifugation (10 mn, 1200 rpm, 10°C) et les ARN totaux en sont extrait selon la technique décrite sous le nom de « solution D ».

7.3 Microdissection des échantillons

7.3.1 Microdissection

Des sections de 7 à 8 µm sont réalisées à partir des tissus congelés. Les sections sont montées sur des lames en plastique. Les sections sont fixées à l'éthanol et colorées à l'hémalum. Environ cent cellules sont microdisséquées à l'aide du microdissecteur laser Leica DM LMV system (Leica). Les cellules sont récupérées dans le bouchon d'un tube de 0,2 mL. Trente microlitre de solution Trizol (Invitrogen Life Technologies) sont ajoutés dans le bouchon. Le tube est ensuite fermé et centrifugé brièvement. Nous ajoutons ensuite 220 µL de solution Trizol par tube.

7.3.2 Extraction des ARN

La lyse des cellules est réalisée par une incubation de 10 mn à TA. Les traces résiduelles de phénol sont éliminées par l'addition de 50 µL de chloroforme. Après agitation et incubation de 3 mn à TA les tubes sont centrifugés (15 mn à 12000 rpm à 4°C). L'ARN contenu dans la phase aqueuse supérieure est précipité 10 mn à TA dans 125 µL d'isopropanol. Les culots obtenus après centrifugation (10 mn à 12000 rpm à TA) sont lavés par 250 µL d'éthanol 70 % et solubilisés dans 9 µL d'eau traitée au DEPC.

Afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique, la solution d'ARN est traitée 15 mn à 37°C en présence de 20 unités de RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega) et de 10 unités de DNase I, RNase free (Roche Applied Science). La digestion est arrêtée par traitement à la chaleur (10 mn à 65°C). La transcription inverse est réalisée à la suite.

7.3.3 Transcription inverse

La transcription inverse de l'ARN en ADNc simple brin est réalisée à partir de la totalité des ARN de 500 pmol d'hexamères. Le tube de réaction est traité 10 mn à 65°C afin de dénaturer les structures secondaires et tertiaire des acides nucléiques. Les réactifs sensibles à la chaleur sont ensuite ajoutés sur glace, le tampon (50 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 75 mmol/L KCl ; 3 mmol/L MgCl₂ ; 10 mM DTT) (Invitrogen Life Technologies), 1 mM de chaque dNTP (Invitrogen Life Technologies), 200 unités de SuperScript II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies) et 20 unités de RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega). La réaction est réalisée dans un volume final de 20 µL pendant 1 h à 37°C. Les enzymes sont inactivés par traitement à la chaleur (10 mn à 65°C).

Les ADNc ainsi obtenus sont dilués au 1/10 et 1 µL servira de matrice pour la RQ-PCR relative.

7.4 Extraction des ARN

7.4.1 Solution D

Le protocole de Chomczynski et Sacchi ⁸² a été modifié dans le laboratoire pour permettre l'extraction d'ARN totaux à partir d'une petite quantité de tissus.

Pour éviter toute dégradation des ARN, les opérations suivantes sont réalisées sur glace et les centrifugations à 4°C.

L'extraction des ARN totaux est réalisée à partir d'un fragment de tissus frais congelé (1 à 2 mm³). Celui-ci est broyé et homogénéisé à l'aide d'un piston stérile dans 1 mL de solution D (4 M guanidine thiocyanate ; 0,5 % (w/v) N-lauryl sarcosine sodium salt ; 25 mM Tri-sodium citrate ; 0,1 M β-mercaptoéthanol). La lyse des cellules a lieu sur glace, pendant 30 mn.

La purification des ARN est réalisée par une extraction des protéines et des débris cellulaires : ajout d'un volume d'une solution de phénol pH 4,5 / chloroforme / alcool isoamylique (25/24/1), en présence d'acétate de sodium 2 M pH 4 (1/10 vol). Après agitation, les tubes sont centrifugés 15 mn à 12000 rpm. L'extraction est renouvelée sur la phase aqueuse.

Les traces résiduelles de phénol sont éliminées par l'addition d'un demi-volume d'une solution de chloroforme / alcool isoamylique (24/1). Après agitation et centrifugation (5 mn à 12000 rpm), l'ARN contenu dans la phase aqueuse est précipité 2 h à -20°C dans 1 volume d'isopropanol. Les culots obtenus par centrifugation (30 mn à 12000 rpm) sont lavés à l'éthanol 70 % et solubilisés dans 20 µL d'eau traitée au DEPC.

Afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique la solution d'ARN est traitée 1 h à 37°C en présence de 20 unités de RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega) et de 10 unités de DNase I, RNase free (Roche Applied Science). La digestion est arrêtée par traitement à la chaleur (10 mn à 70°C).

L'ARN et les éventuelles traces de protéines sont quantifiés par spectrophotométrie à 260 nm (acide nucléique) et 280 nm (protéine). La densité optique à 260 nm doit être comprise entre 0,1 et 1 afin de convertir cette DO en concentration d'ARN : 1 DO = 40 ng/mL. La teneur en protéine de l'échantillon est évalué par le rapport (DO 260 / DO 280) qui doit être compris entre 1,5 et 2.

La qualité des ARN est vérifiée par migration sur un gel d'agarose 1,2 % w/v. Une bonne qualité d'ARN totaux se caractérise par un signal deux fois plus intense pour la bande spécifique des ARNr 28S que pour celle des ARNr 18S.

Les ARN ainsi obtenus sont stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

7.4.2 Trizol (Invitrogen Life Technologies)

L'extraction des ARN est réalisée à partir d'un fragment de tissus frais congelé (20 coupes non colorées de 15 µm réalisées au cryostat). Un millilitre d'une solution de trizol (TRIZOL Reagents, Invitrogen Life Technologies) est ajouté sur les coupes, la lyse des cellules est réalisée par une incubation de 10 mn à TA. Les traces résiduelles de phénol sont éliminées par l'addition de 200 µL de chloroforme. Après agitation et incubation de 3 mn à TA les tubes sont centrifugés (15 mn à 12000 rpm à 4°C). L'ARN contenu dans la phase aqueuse supérieure est précipité 10 mn à TA dans 500 µL d'isopropanol. Les culots obtenus par centrifugation (10 mn à 12000 rpm à TA) sont lavés par 1 mL d'éthanol 70 % et solubilisés dans 20 µL d'eau traitée au DEPC.

Le traitement des ARN à la DNase I RNase free, la quantification des ARN ainsi que l'estimation de leur qualité sont réalisés comme décrit lors du chapitre 8 Solution D.

7.4.3 PCR Raf

Cette PCR est réalisée après la synthèse du premier brin d'ADNc par la technique SMART ou par la technique des hexamères. Elle permet de vérifier l'absence d'ADNg dans la préparation d'ARN.

La réaction de PCR est réalisée dans un volume final de 50 μ L contenant 2 μ L d'ADNc simple brin ; 1 μ M de chaque amorce Raf ; 140 μ M de chaque dNTP ; 2 mM $MgCl_2$; 1,5 unité de Taq polymérase (Promega) ; 1 X tampon de réaction (50 mM KCl ; 10 mM Tris-HCl pH 9 ; 0,1 % Triton X-100).

Le programme de la PCR est le suivant :

5 mn	94 °C	1 cycle
1 mn	94°C	35 cycles
1 mn	60°C	
1 mn	72°C	
5 mn	72°C	1 cycle

Tableau 28 : Programme de la PCR Raf

La taille des amplicons est estimée par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % w/v, 5 μ L de chaque produit de PCR sont déposés avec 500 ng de marqueur de poids moléculaire 100 pb DNA ladder (Promega).

7.5 Réalisation d'une banque de soustraction

La banque de soustraction est réalisée à partir de deux populations d'ARN.

- Le *tester* qui correspond à la tumeur
- Le *driver* qui correspond à la non-tumeur

Afin de mettre en évidence des gènes surexprimés dans la tumeur, la soustraction est réalisée dans ce sens : *Tester - Driver*

7.5.1 Synthèse de l'ADNc : technique SMART

Cette technique de transcription inverse permet d'obtenir une grande quantité d'ADNc double brin à partir de peu d'ARN totaux grâce à une étape d'amplification par PCR lors de la synthèse du second brin d'ADNc. Cette technique est utilisée pour réaliser la banque de soustraction de manière à économiser le matériel humain.

Le protocole utilisé est celui préconisé dans le kit (SMART PCR cDNA Synthesis Kit, BD Biosciences Clontech) avec quelques modifications. Les différents réactifs sont fournis dans le kit à l'exception de l'enzyme SuperScript II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies). Les principales étapes sont décrites ci-dessous.

Les ADNc *tester*, *driver* et contrôle (à partir d'ARN totaux de placenta humain) sont synthétisés dans les mêmes conditions.

7.5.1.1 Synthèse du premier brin d'ADNc (transcription inverse)

La transcription inverse de l'ARN en ADNc simple brin est réalisée à partir de 1 µg d'ARN totaux, 1 µM d'amorce CDS, 1 µM d'amorce SMART II Oligonucleotide, le tube de réaction est traité 2 mn à 70°C afin d'éviter les structures secondaires et tertiaire des acides nucléiques. Les réactifs suivant sont ajoutés à TA : le tampon (50 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 75 mM KCl ; 6 mM MgCl₂ ; 2 mM DTT), 1 mM de chaque dNTP, 200 unités de SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies). La réaction est réalisée dans un volume final de 10 µL pendant 1 h à 42°C. Le produit de réaction est dilué par l'addition de 40 µL d'une solution de TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6 ; 1 mM EDTA). L'enzyme est inactivé par un traitement à la chaleur (7 mn à 72°C).

Les ADNc simple brin sont conservés quelques mois à -20°C.

7.5.1.2 Synthèse du second brin d'ADNc (LD-PCR)

La synthèse du second brin d'ADNc est réalisée par PCR. Pour chaque échantillon, trois tubes sont préparés. Un seul de ces tubes permettra de choisir le nombre de cycle optimal de la PCR.

Le mélange réactionnel final de 100 µL se compose de 1 µL d'ADNc simple brin, de 200 µM de chaque dNTP, de 0,2 µM d'amorce PCR, de 1 X Advantage 2 Polymerase et du tampon (40 mM Tris KOH, pH 8,7 ; 15 mM KOAc ; 3,5 mM Mg(OAc)₂ ; 3,75 µg/mL BSA ; 0,005 % Tween-20 ; 0,005 % Nonidet-P40).

Le programme de la PCR est le suivant :

1 mn	95 °C	1 cycle
15 s	95°C	15 puis 3 cycles
30 s	65°C	
6 mn	68°C	

Tableau 29 : Synthèse du second brin d'ADNc - Programme de la PCR

A cette étape, deux des tubes sont mis de côté à 4°C, le troisième permet de choisir le nombre de cycle optimal pour la PCR. Quinze microlitres de produit de PCR sont prélevés après 15 cycles et après une dénaturation initiale (1 mn à 95°C), la PCR est relancée pour 3 cycles de plus, et ceci jusqu'au 24^{ème} cycle. La cinétique de la PCR est observée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % w/v, 5 µL pour chaque étape sont déposés avec 500 ng de marqueur de poids moléculaire 1 kb DNA ladder (Promega).

Une fois le nombre de cycles choisi, les tubes conservés à 4°C sont repris pour terminer la PCR qui est contrôlée par électrophorèse (même conditions que ci-dessus).

La réaction est arrêtée par l'ajout de 10 mM final d'EDTA.

7.5.1.3 Purification des ADNc en vue de la SSH

Afin d'éliminer les oligonucléotides non incorporés, le produit de PCR est passé sur des colonnes CHROMA SPIN-1000.

Dans un premier temps, les enzymes sont éliminés par l'addition d'un volume d'une solution de phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25/24/1). Après centrifugation (10 mn à 14000 rpm) la phase aqueuse est récupérée puis précipitée par l'ajout de 700 µL de n-butanol jusqu'à obtenir un volume de phase aqueuse compris entre 40 et 70 µL.

Le produit de PCR ainsi concentré est passé sur une colonne CHROMA SPIN-1000. Les colonnes sont tamponnées par le passage de 1,5 mL de solution TNE 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8 ; 10 mM NaCl ; 0,1 mM EDTA).

L'échantillon est déposé, 25 µL, 150 µL puis 50 µL de solution TNE 1X sont ajoutés. La récupération de l'échantillon purifié se fait en deux fois : 320 µL de solution TNE 1X sont

ajoutés, l'éluat est récupéré dans le premier tube ; 100 µL de TNE 1X sont ajoutés et les deux premières gouttes sont récupérées dans le premier tube, le reste est récupéré dans le second tube.

Le rendement de la purification est observé par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % w/v, 3 µL de produit non purifié, 10 µL des produits d'élution 1 et 2 sont déposés avec 500 ng de marqueur de poids moléculaire 1 kb DNA ladder (Promega).

7.5.2 Digestion des ADNc par *RsaI*

Cette étape génère des petites molécules d'ADNc à extrémités franches. Le site de l'enzyme de restriction *RsaI* (5' GTAC 3') est statistiquement présent sur le génome humain toutes les 500 pb.

L'ensemble des ADNc purifiés (*tester*, *driver* et contrôle) est digéré par 20 unités de *RsaI* (New England BioLabs) dans un tampon de réaction contenant 10 mM Bis Tris Propane-HCl ; 10 mM MgCl₂ ; 1 mM DTT. La digestion est réalisée à 37°C pendant 3 à 10 h puis arrêtée par addition d'EDTA 10 mM.

L'efficacité de la digestion est estimée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % w/v, 10 µL de produit non digéré et 10 µL de produit digéré sont déposés avec 500 ng de marqueur de poids moléculaire 1 kb DNA ladder (Promega).

La purification des produits digérés est réalisée par l'addition d'un volume d'une solution de phénol pH 8 / chloroforme / alcool isoamylique (25/24/1). Après agitation, les tubes sont centrifugés 10 mn à 14000 rpm à TA. La phase aqueuse supérieure est récupérée et les traces résiduelles de phénol sont éliminées par l'addition d'un volume d'une solution de chloroforme / alcool isoamylique (24/1). Après agitation et centrifugation (10 mn à 14000 rpm), l'ADNc

contenu dans la phase aqueuse est précipité à TA dans 3 volume d'éthanol, en présence d'AcONa 3 M pH 5,5 (1/10 vol). Les culots obtenus par centrifugation (20 mn à 14000 rpm à TA) sont lavés à l'éthanol 70 % et solubilisés dans 5,5 μ L d'eau stérile.

A cette étape le *driver* est prêt pour l'hybridation. Les produits sont conservés à -20°C jusqu'à la suite des expériences.

7.5.3 Ligation des adaptateurs

Cette étape est réalisée uniquement sur les échantillons *tester*. Les réactifs nécessaires sont contenus dans le kit (CLONTECH PCR-Select cDNA subtraction kit, BD Biosciences Clontech).

7.5.3.1 Préparation des ADNc *tester* avant la ligation

L'ADNc *tester* est dilué au 1/6 avec de l'eau stérile.

Le *tester* contrôle correspond à l'ADNc de placenta humain obtenu par la technique SMART et digéré par *RsaI*. Il est également dilué au 1/6 en présence de 125 pg/mL final d'ADN de phage X 174 digéré par *HaeIII*.

7.5.3.2 Ligation

L'ADNc *tester* (2 μ L dilué) est lié avec un adaptateur (2 μ M) par 400 unités de T4 DNA ligase dans un volume réactionnel de 10 μ L contenant 3 mM ATP ; 50 mM Tris-HCl pH 7,8 ; 10 mM MgCl₂ ; 2 mM DTT ; 50 μ g/mL BSA.

Pour chaque ADNc *tester* (x) nous avons deux tubes de ligation, un pour l'adaptateur 1 appelé T x-1 et un autre pour l'adaptateur 2R appelé T x-2R. Un troisième tube appelé T x-NS est préparé en mélangeant 2 μ L de chacun des tubes précédents, il correspond au produit non soustrait ou NS.

La ligation est réalisée à 16°C pendant 24 h. La réaction est arrêtée par 20 mM d'EDTA et 0,1 mg/mL de glycogène suivis d'un traitement à la chaleur (5 mn à 72°C).

Un microlitre des tubes T x-NS est dilué dans 1 mL d'eau stérile. L'ensemble des tubes est conservé à -20°C.

7.5.3.3 Vérification de l'efficacité de la ligation

Un microlitre des produits de ligation T x-1 et T x-2R est dilué dans 200 µL d'eau stérile. Ces dilutions servent de matrice à la PCR. Les tubes A à D suivants sont préparés pour chaque testeur :

	A	B	C	D
T x-1 dilué	1	1	-	-
T x-2R dilué	-	-	1	1
Amorce 3' GAPDH (10 µM)	1	1	1	1
Amorce 5' GAPDH (10 µM)	-	1	-	1
Amorce PCR 1 (10 µM)	1	-	1	-
Total	3	3	3	3

Tableau 30 : Test de l'efficacité de ligation - préparation des tubes - volume en µL

La réaction de PCR est réalisée dans un volume final de 25 µL contenant 0,4 µM de chaque amorce ; 0,2 mM de chaque dNTP ; 1 X du mix Advantage 2 polymerase ; 1 X tampon de réaction (40 mM Tris-KOH pH 8,7 ; 15 mM KOAc ; 3,5 mM Mg(OAc)₂ ; 3,75 µg/mL BSA ; 0,005 % Tween-20 ; 0,005 % Nonidet-P40).

Le programme de la PCR est le suivant :

5 mn	75 °C	1 cycle
30 s	94°C	
30 s	65°C	
2,5 mn	68°C	
		20 à 25 cycles

Tableau 31 : Test de l'efficacité de ligation - Programme de la PCR

Les résultats sont observés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % w/v, 5 µL de chaque produit de PCR sont déposés avec 500 ng de marqueur de poids moléculaire 100 pb DNA ladder (Promega). L'efficacité de ligation est estimée en comparant l'intensité des signaux entre les pistes A et B ou C et D.

7.5.4 Hybridations

Les hybridations sont réalisées selon les recommandations du kit (CLONTECH PCR-Select cDNA subtraction kit, BD Biosciences Clontech)

7.5.4.1 Première hybridation

Les tubes suivants sont préparés :

	Hybridation 1	Hybridation 2R
<i>Driver</i>	1,5	1,5
<i>Tester x-1</i>	1,5	-
<i>Tester x-2R</i>	-	1,5
Tampon d'hybridation 4 X	1	1
Volume réactionnel	4	4

Tableau 32 : Première hybridation - Préparation des tubes - Volume en µL

Une dénaturation est réalisée (1,5 mn à 98°C) puis l'hybridation est effectuée pendant 10 h à 68°C.

7.5.4.2 Préparation d'ADNc driver dénaturé

<i>Driver</i>	1
Tampon d'hybridation 4 X	1
H ₂ O stérile	2

Tableau 33 : Préparation d'ADNc driver dénaturé - Préparation du tube - Volume en μ L

Un microlitre du mélange ci-dessus est dénaturé (1,5 mn à 98°C).

7.5.4.3 Seconde h'hybridation

Tout en restant à 68°C, les produits des deux premières hybridations sont mélangés en même temps que l'ADNc *driver* dénaturé. La seconde hybridation est réalisée à 68°C pendant 22 h.

Le produit d'hybridation est dilué par 200 μ L de tampon de dilution (20 mM HEPES-HCl pH 8,3 ; 50 mM NaCl ; 0,2 mM EDTA) et incubé 7 mn à 68°C.

Le produit d'hybridation est conservé à -20°C.

7.5.5 Amplifications par PCR

Les réactifs nécessaires sont contenus dans le kit CLONTECH PCR-Select cDNA subtraction kit de BD Biosciences Clontech.

7.5.5.1 Première amplification

Les matrices utilisées pour cette PCR sont : le produit de seconde hybridation ou produit soustrait, le produit non soustrait T x-NS et un contrôle fourni dans le kit (ADNc soustrait).

La réaction de PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 25 μ L contenant 1 μ L de matrice ; 0,2 mM de chaque dNTP ; 0,4 μ M d'amorce PCR 1 ; 1 X d'enzyme advantage 2 polymerase mix ; 1 X de tampon de réaction (40 mM Tris-KOH pH 8,7 ; 15 mM KOAc ; 3,5 mM Mg(OAc)₂ ; 3,75 μ g/mL BSA ; 0,005 % Tween-20 ; 0,005 % Nonidet-P40).

Le programme de la PCR est le suivant :

5 mn	75 °C	1 cycle
30 s	94°C	27 cycles
30 s	66°C	
1,5 mn	72°C	

Tableau 34 : Première amplification - Programme de la PCR

7.5.5.2 Seconde amplification

Les matrices pour cette PCR sont les produits des premières amplifications dilués au 1/10 dans de l'eau stérile.

La réaction de PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 25 μL contenant 1 μL de matrice ; 0,2 mM de chaque dNTP ; 0,4 μM d'amorce Nested PCR 1 ; 0,4 μM d'amorce Nested PCR 2R ; 1 X d'enzyme advantage 2 polymerase mix ; 1 X de tampon de réaction (40 mM Tris-KOH pH 8,7 ; 15 mM KOAc ; 3,5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; 3,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA ; 0,005 % Tween-20 ; 0,005 % Nonidet-P40).

Le programme de la PCR est le suivant :

30 s	94°C	10 cycles
30 s	66°C	
1,5 mn	72°C	

Tableau 35 : Seconde amplification - Programme de la PCR

Le produit de soustraction est ainsi obtenu et conservé à -20°C.

7.5.5.3 Contrôle des amplifications

La qualité des deux PCR est estimée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % w/v, 8 μL de chaque produit de PCR sont déposés avec 500 ng de marqueur de poids moléculaire 1 kb DNA ladder (Promega).

7.5.6 Contrôle de l'efficacité de soustraction par PCR

Les matrices utilisées sont les produits de la seconde amplification dilués au 1/10 : produit soustrait et non soustrait. Les amorces sont soit celles fournies dans le kit CLONTECH PCR-Select cDNA subtraction kit de BD Biosciences Clontech (amorces GAPDH), soit des amorces personnelles (β -actine).

La réaction de PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 30 μL contenant 1 μL de matrice ; 0,2 mM de chaque dNTP ; 0,4 μM d'amorce 3' ; 0,4 μM d'amorce 5' ; 1 X d'enzyme advantage 2 polymerase mix ; 1 X de tampon de réaction (40 mM Tricine-KOH pH 8,7 ; 15 mM KOAc ; 3,5 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$; 3,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA ; 0,005 % Tween 20 ; 0,005 % Nonidet-P40).

Le programme de la PCR est le suivant :

30 s	94°C	18 cycles
30 s	60°C	
2 mn	68°C	

Tableau 36 : Efficacité de la soustraction - Programme de la PCR

Cinq microlitres de produit de PCR sont prélevés après 18 cycles et la PCR est relancée pour 5 cycles de plus, et ceci jusqu'au 33^{ème} cycle. La cinétique de la PCR est observé par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % w/v, 5 μL pour chaque étape sont déposés avec 500 ng de marqueur de poids moléculaire 1 kb DNA ladder (Promega).

L'efficacité de la soustraction est estimée en observant l'apparition de signal pour les gènes de ménage dans le produit soustrait par rapport au produit non soustrait.

7.5.7 Clonage du produit de soustraction

Afin d'individualiser les différents ADNc contenus dans le produit de soustraction, ce dernier est cloné avec le kit pGEM-T Easy Vector System (Promega) puis des bactéries JM109 (Promega) sont transformées.

Dans un volume réactionnel de 10 μL , 50 ng de produit de soustraction est lié à 50 ng de plasmide par 100 unités de T4 DNA ligase en présence du tampon de ligation rapide 1 X. La ligation est réalisée à TA pendant 1 h.

Cinquante microlitres de bactéries compétentes JM109 (10^8 cfu/ μ g ADN) sont transformées avec 2 μ L de produit de ligation. La transformation est réalisée par choc thermique : le mélange bactéries compétentes et produit de ligation est incubé 20 mn sur glace, ensuite le tube est plongé dans un bain à 42°C pendant 45 s et à nouveau laissé sur 2 mn glace. Les bactéries transformées sont incubées 45 minutes à 37°C avec 150 rpm d'agitation dans 950 μ L de milieu SOC (2 % tryptone ; 0,5 % extrait de levure ; 10 mM NaCl ; 2,5 mM KCl ; 10 mM MgCl₂ ; 10 mM Mg ; 20 mM glucose). L'ensemble des bactéries est ensuite mis à pousser à 37°C pour la nuit sur un milieu solide (LB ; agar ; 100 μ g/mL ampicilline ; 0,5 mM IPTG ; 80 μ g/mL X-Gal). La banque de soustraction est ainsi générée.

7.6 Criblage des banques de soustraction

Afin d'éliminer les faux positifs, les banques de soustraction sont criblées avec des sondes radiomarquées correspondant à l'ensemble des ARNm de la tumeur ou de la non-tumeur. Ce criblage a été réalisé à partir de deux représentations différentes de la banque, soit directement à partir des clones bactériens, soit à partir des fragments d'ADNc enrichis.

7.6.1 A partir de clones bactériens

Les clones contenant un insert (clones blancs) sont repiqués et organisés dans des boîtes de 14 cm de diamètre contenant un milieu de culture sélectif (LB ; agar ; 100 µg/mL ampicilline). Les boîtes sont réalisées en double et sont incubées à l'étuve à 37°C pour la nuit.

La membrane Hybond N+ (Amersham Biosciences) est déposée à la surface du milieu de culture pendant 1 mn ; la membrane est orientée par rapport à la boîte. La membrane est placée 7 mn dans un bain de dénaturation (1,5 M NaCl ; 0,5 N NaOH), bactéries sur la face supérieure. Elle est ensuite placée 3 mn dans un bain de neutralisation (1,5 M NaCl ; 0,5 M Tris-HCl pH 7,2 ; 1 mM EDTA). Elle est enfin lavée dans un bain de SSC 2 X puis séchée à l'air pendant environ 2 h.

Les acides nucléiques sont fixés de façon covalente à la membrane par un traitement de 20 mn à la soude 0,4 N. La membrane est ensuite tamponnée par un passage court dans un bain de SSC 5 X. Elle est conservée humide dans une poche hermétique à 4°C.

7.6.2 A partir des ADNc soustraits

Les clones contenant un insert sont repiqués dans 200 μL de milieu sélectif (LB ; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilline) et organisés dans des microplaques NUNC 96 puits de culture. La culture est réalisée à 37°C et 150 rpm pendant la nuit.

La PCR est réalisée dans des plaques de 96 puits, directement à partir de la culture bactérienne. Les amorces M13 permettent d'amplifier les inserts contenus dans les plasmides pGEM-T Easy Vector.

La réaction de PCR est réalisée dans un volume final de 20 μL contenant 1 μL de culture bactérienne ; 0,4 μM de chaque amorce M13; 0,35 mM de chaque dNTP ; 2 mM MgCl_2 ; 1,5 unité de Taq polymérase (Promega) ; 1 X tampon de réaction (50 mM KCl ; 10 mM Tris-HCl pH 9 ; 0,1 % Triton X-100).

Le programme de la PCR est le suivant :

30 s	94 °C	1 cycle
30 s	95°C	23 cycles
15 s	55°C	
4 mn	72°C	

Tableau 37 : PCR en plaque 96 puits - Programme de la PCR

Les amplicons sont observés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % w/v, 2 μL de chaque produit de PCR sont déposés avec 500 ng de marqueur de poids moléculaire 100 pb DNA ladder (Promega).

Les membranes sont réalisées à l'aide d'un appareil à dot blot au format 96 puits (HYBRI-DOT, Invitrogen Life Technologies). Deux à 8 membranes peuvent être réalisées à partir d'un même produit de PCR.

La membrane Hybond N⁺ (Amersham Biosciences) et le papier Wathman épais sont humidifiés par un passage dans un bain d'eau puis tamponnés 5 mn dans un bain de SSC 10 X et disposée dans l'appareil à dot blot comme préconisé par le fabricant. Les produits de PCR (2 µL) sont dénaturés 5 mn à 95°C, dilués dans 150 µL de SSC 10 X puis déposés dans les puits de l'appareil à dot blot et enfin aspirés.

L'appareil est démonté, la membrane est plongée 5 mn dans un bain de dénaturation (1,5 mM NaCl ; 0,5 N NaOH) puis 1 mn dans un bain de neutralisation (1,5 M NaCl ; 0,5 M Tris-HCl pH 7,2 ; 1 mM EDTA). La membrane est ensuite séchée 1 h dans une étuve à 50°C.

La fixation des acides nucléiques est réalisée comme décrit dans le chapitre 8.4.1. La membrane est conservée humide dans une poche hermétique à 4°C.

7.6.3 Réalisation des sondes radio-marquées

7.6.3.1 Sonde marquée par transcription inverse

La transcription inverse est réalisée à partir de 1 µg d'ARN totaux et 25 µg/mL d'oligo(dT₁₂₋₁₈), en présence du tampon (50 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 75 mmol/L KCl ; 3 mmol/L MgCl₂ ; 10 mM DTT) (Invitrogen Life Technologies), de 0,5 mM de chaque dNTP (Invitrogen Life Technologies). Le tube de réaction est traité 10 mn à 60°C afin d'éliminer les structures secondaires et tertiaire des acides nucléiques. Les réactifs sensibles à la chaleur sont ensuite ajoutés sur glace, 600 unités de SuperScript II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies) et 40 unités de RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega), 50 µCi de α³²P dCTP. La réaction est réalisée dans un volume final de 50 µL pendant 1 h à 37°C.

7.6.3.2 Sonde marquée par Random Priming

Dans un premier temps, l'ADNc est synthétisé selon la technique SMART. Le protocole est le même que celui utilisé lors de la synthèse de l'ADNc en vue de la SSH. Par contre la purification du produit de PCR est réalisée avec des colonnes S300 (Amersham Biosciences) selon les recommandations du fournisseur. Ces colonnes éliminent les amorces et les nucléotides non incorporés.

Le marquage des sondes est réalisé avec le kit Random Priming DNA Labeling System d'Invitrogen Life Technologies comme décrit ci-dessous.

L'ADNc purifié (25 ng) est dénaturé par un traitement de 5 mn à 100°C puis les différents réactifs suivant sont ajoutés dans un volume final de 50 µL : 20 mM dATP, dGTP, dTTP chacun ; 50 µCi $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (AS 3000 Ci/mole, NEN LIFE SCIENCES) ; 3 unités du fragment de klenow et le tampon de réaction (200 mM HEPES ; 50 mM Tris-HCl ; 5 mM MgCl₂ ; 10 mM 2-mercaptoethanol ; 0,4 mg/mL BSA ; 5,4 OD₂₆₀ hexamère ; pH 6,8). La réaction est réalisée à 25°C pendant 2 h puis arrêtée par l'addition de 10 mM d'EDTA.

7.6.3.3 Contrôle des sondes

L'incorporation du $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP est contrôlée en comptant la radioactivité contenue 1 µL d'ADNc marqué avant et après purification par des colonnes G50 (Amersham Biosciences). Ces colonnes éliminent les nucléotides non incorporés.

Les sondes sont conservées à -20°C pendant plusieurs semaines.

7.6.4 Hybridation des sondes sur les membranes

La membrane est préhybridée au moins 1 h à 42°C dans 10 mL de tampon de préhybridation (5 X Denhart ; 0,5 % SDS ; 5 X SSC).

La sonde (1.10^6 à 2.10^6 cpm/mL de tampon d'hybridation) est mélangée à l'ADN de sperme de saumon (100 µg/mL de tampon d'hybridation) et l'ensemble est dénaturé par un traitement de 10 mn à 95°C. Ce mélange est ajouté au tampon de préhybridation pour former le tampon d'hybridation. L'hybridation est réalisée à 42°C pendant toute une nuit.

La membrane est lavée dans des bains de plus en plus stringents : 2 bains successifs dans la solution de lavage 1 (2 X SSC ; 0,1 % SDS) sont réalisés à 65°C, suivis de 2 bains dans la solution de lavage 2 (1 X SSC ; 0,1 % SDS) à TA. La membrane est scellée dans un sac plastique. Un film Biomax MR (Kodak) est exposé avec la membrane à -80°C. La durée de l'exposition est variable.

7.7 Analyse des séquences

Dans un premier temps, j'ai réalisé les extractions d'ADN plasmidique et le séquençage des clones d'intérêts dans le laboratoire. Lorsque le nombre d'échantillons sélectionnés a augmenté, nous avons fait appel à la société Genome Express (Grenoble) qui réalise le séquençage d'échantillons à partir de clones bactériens, en format 96 puits. L'analyse bioinformatique des séquences est ensuite réalisée dans le laboratoire avec différents logiciels en ligne.

7.7.1 Mini préparation d'ADN plasmidique

L'extraction des plasmides est réalisée selon le principe de la lyse alcaline avec le kit de Promega, Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems. Le protocole est décrit ci-dessous.

Les clones d'intérêts sont mis en culture (37°C ; 150 rpm) la veille dans 3 mL de milieu sélectif (LB ; ampicilline 100 µg/mL).

Les bactéries sont culottées par une centrifugation de 5 mn à 6000 g puis resuspendues dans 250 µL de solution de resuspension (50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 10 mM EDTA ; 100 µg/mL RNase A). La lyse des cellules est réalisée par l'addition de 250 µL de solution de lyse (0,2 N NaOH ; 1 % SDS). La lyse est poursuivie pendant 5 mn puis 10 µL d'une solution de protéase alcaline sont ajoutées et la lyse reprend pour 10 mn. La lyse est arrêtée par l'addition de 350 µL de solution de neutralisation (4,09 M hydrochloride de guanidine; 0,759 M acétate de potassium ; 2,12 M acide acétique glacial). Le surnageant est récupéré après une centrifugation de 10 mn à 14000 g et transféré dans une colonne. Cette dernière est centrifugée 1 mn à 14000 g et lavée par 750 µL puis 250 µL de solution de lavage (60 mM acétate de potassium ; 10 mM Tris-HCl ; 60 % éthanol).

L'élution est réalisée par l'addition de 100 µL d'eau sans nucléase suivie d'une centrifugation de 1 mn à 14000 g.

La qualité de l'ADN plasmidique et la taille de l'insert sont vérifiées par migration sur un gel d'agarose 1,2 % w/v, 6 µL d'ADN plasmidique non digéré, 20 µL d'ADN plasmidique digéré par *EcoRI* sont déposés avec 500 ng de marqueur de poids moléculaire 1 kb (Promega).

Les ADN plasmidiques sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

7.7.2 Séquençage

Le séquençage est réalisé à l'aide du kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems). Le protocole utilisé est décrit ci-dessous.

La réaction est réalisée dans 10 µL avec 200 à 500 ng d'ADN plasmidique, 2 pmoles d'amorce M13 et de 4 µL de Terminator Ready Reaction Mix (dNTP ; dNTP terminateur de chaîne, chacun marqué avec un fluorochrome différent ; AmpliTaq DNA polymerase FS ; MgCl₂ ; Tris-HCl pH 9).

Le programme de la PCR est le suivant :

30 s	96°C	25 cycles
15 s	50°C	
4 mn	60°C	

Tableau 38 : Séquençage - Programme de la PCR

Le produit de séquençage est purifié par une précipitation de 10mn à TA en présence d'acétate de sodium 3 M pH 4,8 (1 : 10 vol) et d'éthanol absolue (2,5 vol). Les culots obtenus

par centrifugation (30 mn à 13000 rpm) sont lavés à l'éthanol 70 % et séchés sur la paillasse pendant 1 h, à TA.

Le produit de séquençage est ensuite analysé par l'automate de séquençage « Applied ABI 377A DNA sequence » après migration sur un gel d'acrylamide/bisacrylamide (35/5) contenant 36 % d'urée, dans un tampon TBE (89 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 89 mM acide borique ; 2 mM EDTA).

7.7.3 Analyse bio-informatique des séquences

Les séquences sont lues et corrigées à l'aide du logiciel Sequencing Analysis 3.3 (PE Applied Biosystems).

Après élimination des régions correspondant au vecteur, les séquences sont alignées avec des banques de données contenant l'ensemble des séquences d'ADN humain déjà séquencées (banque nr) à l'aide du logiciel en ligne MEGABLAST de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/)⁸⁴.

Les alignements multiples sont réalisés avec le logiciel en ligne ClustalW 1.8 de BCM.

7.7.4 Clonalité B : PCR Ca1 / Ca2

La réaction de PCR est réalisée dans un volume final de 50 µL contenant 2 µL de matrice ; 1 µM des amorces Ca1 et Ca2 ; 140 µM de chaque dNTP ; 1,5 mM MgCl₂ ; 1,5 unité de Taq polymérase (Promega) ; 1 X tampon de réaction (50 mM KCl ; 10 mM Tris-HCl pH 9 ; 0,1 % Triton X-100).

Le programme de la PCR est le suivant :

5 mn	94 °C	1 cycle
1 mn	94°C	35 cycles
1 mn	60°C	
1 mn	72°C	
5 mn	72°C	1 cycle

Tableau 39 : Clonalité B - Programme de la PCR Ca1 / Ca2

Le produit de PCR est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 2 % w/v, 5 µL de chaque produit de PCR sont déposés avec 500 ng de marqueur de poids moléculaire 100 pb DNA ladder (Promega).

7.8 Quantification par RT-PCR en temps réel

7.8.1 Transcription inverse : technique hexamère

La transcription inverse de l'ARN en ADNc simple brin est réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux et de 500 pmol d'hexamères, le tube de réaction est traité 10 mn à 70°C afin d'éliminer les structures secondaires et tertiaire des acides nucléiques. Les réactifs sensibles à la chaleur sont ensuite ajoutés sur glace, le tampon (50 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 75 mmol/L KCl ; 3 mmol/L MgCl₂ ; 10 mM DTT) (Invitrogen Life Technologies), 1 mM de chaque dNTP (Invitrogen Life Technologies), 200 unités de SuperScript II RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies) et 20 unités de RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega). La réaction est réalisée dans un volume final de 20 µL pendant 1 h à 37°C. Les enzymes sont inactivés par traitement à la chaleur (10 mn à 65°C).

Les ADNc ainsi obtenus sont dilués au 1/10 et conservés à -20°C pendant quelques années.

7.8.2 PCR en temps réel

La PCR en temps réel est réalisée à partir des ADNc synthétisés ci-dessus et dilués au 1/10, chaque point est réalisé en double avec le LightCycler (Roche Applied Science). Le volume réactionnel de 10 μ L contient 1 μ L de matrice (ADNc dilué au 1/10), 1 μ L de mix LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals), 3 à 5 mM de MgCl₂ et 0,5 μ M de chaque amorce. La température de transition est de 20°C/s tout au long de la PCR ; la lecture de la fluorescence est réalisée à la fin de l'étape d'hybridation des amorces soit à 72°C.

Le programme pour cette PCR est le suivant :

10 mn	95 °C	1 cycle
1 s	95°C	50 cycles
10 s	50°C à 64°C	
26 s	72°C	

Tableau 40 : PCR en temps réel - Programme de la PCR

La courbe de fusion est réalisée entre 60°C et 95°C avec une lecture continue de la fluorescence et avec une température de transition de 0,05°C/s.

L'étude de la cinétique est réalisée avec la méthode « second derivative maximum » et les valeurs de Ct sont calculées à l'aide du logiciel LightCycler version 3,5.

Pour vérifier qu'il n'y a pas d'ADN génomique contaminant dans les échantillons d'ARN, une PCR en temps réel est réalisée directement en utilisant les ARN totaux comme matrice.

7.8.3 Séquences des amorces utilisées

N°	Forward Primer		Reverse Primer	
	Séquence 5' 3'	Tm	Séquence 5' 3'	Tm
2	ATGAATGGCTCCACGAG	60	TTGCGCTGTTATCCCT	60
4	CCGGAATCTGAACCCT	61	CGGCTTTGGTGACTCT	61
5	GGTTTGAAGATGCCGC	60	GTTGCCAGCCCTCCTA	61
6	AACGGAAATCTGTTCGC	60	AGATCAGGTTTCGTCCTTTAG	60
7	GCAGTCTAGCGACCAC	60	GCCGTAGGCCCAGTTA	60
8	TCAACATCCTGCCAGC	60	GCTGTTCCGACTTGGT	61
9	CAGAAAATGGAAGAGACGC	60	TCTTGGTATCGACATCGTCA	60
10	CGTGTTCTTCGACATTGC	60	ACCCGTATGCTTTAGGAT	60
11	GATAGGAATCATGTCTGGTCG	60	GTCTCCTCATAGATAAGACCG	60
12	GAAGGAGACGGTCTGG	60	GGGTGAACTTGTCGATG	60
14	AGAATGTCAAAGCCAAAATTC	59	GCAGATCATCTTGTCGC	60
15	CAAGACAAAGGCGGTTT	60	CGAGGGGTAATACGCT	60
17	AAGATAAGGCTTTCAAGCAG	60	GTTATGGCAGGGAATAGAG	59
19	ATCGGCATGGACGTAG	60	GGCGATCCTCTTTGGG	60
20	GAGGTGAAACGGGAGC	60	AGCGGGACTTGCCATA	60
21	AACTACGGGGTTGGTG	60	CTGTGAGAGGGCTCAT	60
23	CTACTCGTGACGCTTC	59	CGTCGGCGAGGTAATT	62
24	TCTCATTGACCGGAACCA	60	CCGAGGTACATATAAGCCC	59
25	GTCCGTGATGGTCAGCT	60	ACGTTGGTGTTAGGCA	60
26	AGTAACAGACACACGATG	59	CTGACAGTCCGTGCTC	61
27	ACACTATTCTAAGAGTCCC	60	ACTCGAATGCGTAGACC	60
28	CCCCGATAACTTCGTG	59	CCCTGGTGTGTGTCAG	60
29	ACTCTTACCATGAAGACCC	60	CTCCAGACGTTTGTAGC	59
30	AATACCCAACGCACAAA	60	CCCACCTGTAACGTAGAG	59
31	CCAGTGTCAAATGAACTTC	60	TGTTGTGCAAATGTAGCT	59
32	CCCGTGTGGTTGCTAAG	61	CACTCAAGGGGAGGTG	59
33	CATCGGTCCTTACAGCC	60	GGCGTGCATTTGACTT	60
34	TCCCCTTACTGAGCGG	60	GACACTACCTACTGGTGT	59
35	CTTCTGAAAACAACGTTT	54	GAAGGGACAGAAGATGACAG	60
36	CCTACCCAATCTGTGCAGGCAG	55	GGAATCCACAAGCTCTAGC	58
37	AGCAAGGCAAAGAGTGTG	52	CTCCTCCTGGGTCTGGAA	62
38	CAGTGTGTGAGTCTGGAATG	56	CACATTCTCAAGAGGAAAGG	56
39	TGTTTCGAGCAGTACATCAAC	58	TCCACATCCTTCTTCAGAGT	58

Tableau 41 : Séquences des amorces pour la RQ-PCR

7.9 Adresses des fournisseurs

Amersham Biosciences Europe GmbH - Succursale France - Parc Technologique - Rue René Razel - Saclay - 91898 Orsay Cedex.

www.amershambiosciences.com

BD Biosciences Clontech - OZYME - BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex.

www.clontech.com

Genset Genomic Research Center - Route nationale 7 - 91030 Evry Cedex.

Pour la synthèse des oligonucléotides

www.genset.fr

Genome express - 11, Chemin des prés - 38944 Meylan

www.genomex.com

Invitrogen Life Technologies - Invitrogen SARL - BP 96 - 95613 Cergy Pontoise Cedex

www.invitrogen.com

Kodak France - 26, rue Villiot - 75594 Paris Cedex 12

www.frkodak.com

NEN Life Science Products - BP 52 - 93152 Le Blanc Mesnil Cedex

www.nenlifsci.com

New England BioLabs - OZYME - BP 268 - 78053 St Quentin Yvelines Cedex

www.neb.com

PE Applied Biosystems -

www.appliedbiosystems.com

Promega France SARL - Parc d'Activités des verrières - 69260 Charbonnières

www.promega.com

Roche Applied Science - Roche Diagnostics - 2, avenue du Vercors - BP 59 - 38242 Meylan Cedex

www.roche-applied-science.com

Sigma Aldrich Chimie SARL pour l'ensemble des produits chimiques - L'Isle d'Abeau Chesnes - BP 701 - 38297 St Quentin Fallavier

Pour les différents produits chimiques

www.sigma-aldrich.com

8 ANNEXE : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alberts, B. et al. in *Molecular Biology of the Cell* (Garland Publishing, 1994).
2. Peng, H. et al. Clonality analysis of defined cell populations in paraffin-embedded tissue sections by RT-PCR amplification of X-linked G6PD gene. *J Pathol* **191**, 313-7. (2000).
3. Gleissner, B., Maurer, J. & Thiel, E. Detection of immunoglobulin heavy chain genes rearrangements in B-cell leukemias, lymphomas, multiple myelomas, monoclonal and polyclonal gammopathies. *Leuk Lymphoma* **39**, 151-5. (2000).
4. Gutzmer, R. et al. Detection of clonal T cell receptor gamma gene rearrangements in cutaneous T cell lymphoma by LightCycler-polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* **116**, 926-32. (2001).
5. Elenbaas, B. et al. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* **15**, 50-65. (2001).
6. Houlston, R. S. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol* **54**, 206-14. (2001).
7. Jubb, A. M., Bell, S. M. & Quirke, P. Methylation and colorectal cancer. *J Pathol* **195**, 111-34. (2001).
8. Falini, B. & Mason, D. Y. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* **99**, 409-26. (2002).
9. Pierotti, M. A., Schichman, S. A., Sozzi, G. & Croce, C. M. in *Cancer Medecine* (eds. Bast, R. C. et al.) (NC Decker Inc, Canada, 2000).
10. Faeron, E. R. & Vogelstein, B. in *Cancer Medecine* (eds. Bast, R. C. et al.) (NC Decker Inc, Canada, 2000).
11. Coffin, J. M. Genes responsible for transformation by avian RNA tumor viruses. *Cancer Res* **36**, 4282-8. (1976).
12. Bjorge, J. D., Jakymiw, A. & Fujita, D. J. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* **19**, 5620-35. (2000).

13. Sears, R. C. & Nevins, J. R. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem* **22**, 22 (2002).
14. Barbacid, M. ras genes. *Annu Rev Biochem* **56**, 779-827 (1987).
15. Knudson, A. G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 820-3. (1971).
16. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70. (2000).
17. Chang, F., Syrjanen, S. & Syrjanen, K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* **13**, 1009-22. (1995).
18. Amundson, S. A., Myers, T. G. & Fornace, A. J., Jr. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* **17**, 3287-99 (1998).
19. Milner, J. & Medcalf, E. A. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild- type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* **65**, 765-74 (1991).
20. Harvey, M. et al. A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nat Genet* **9**, 305-11 (1995).
21. Vardiman, W. J., Harris, L. N. & Brunning, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **100**, 2292-302 (2002).
22. WHO. *WHO - Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (eds. Jaffe, E. S., Lee Harris, N., Stein, H. & Vardiman, J. W.).
23. Macintyre, E., Willerford, D. & Morris, S. W. Non-Hodgkin's Lymphoma: Molecular Features of B Cell Lymphoma. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 180-204 (2000).
24. Beljaards, R. C. et al. Primary cutaneous CD30-positive large cell lymphoma: definition of a new type of cutaneous lymphoma with a favorable prognosis. A European Multicenter Study of 47 patients. *Cancer* **71**, 2097-104. (1993).
25. Willemze, R. et al. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood* **90**, 354-71. (1997).

26. Fink-Puches, R. et al. Primary cutaneous lymphomas: applicability of current classification schemes (European Organization for Research and Treatment of Cancer, World Health Organization) based on clinicopathologic features observed in a large group of patients. *Blood* **99**, 800-5. (2002).
27. Durkop, H. et al. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* **68**, 421-7. (1992).
28. Falini, B. et al. CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood* **85**, 1-14. (1995).
29. Smith, C. A. et al. CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* **73**, 1349-60. (1993).
30. Durkop, H. et al. The restricted expression pattern of the Hodgkin's lymphoma-associated cytokine receptor CD30 is regulated by a minimal promoter. *J Pathol* **192**, 182-93. (2000).
31. Horie, R. et al. A variant CD30 protein lacking extracellular and transmembrane domains is induced in HL-60 by tetradecanoylphorbol acetate and is expressed in alveolar macrophages. *Blood* **88**, 2422-32 (1996).
32. Durkop, H. et al. Structure of the Hodgkin's lymphoma-associated human CD30 gene and the influence of a microsatellite region on its expression in CD30(+) cell lines. *Biochim Biophys Acta* **1519**, 185-91. (2001).
33. Horie, R. et al. Frequent expression of the variant CD30 in human malignant myeloid and lymphoid neoplasms. *Am J Pathol* **155**, 2029-41 (1999).
34. Gerdes, J., Schwarting, R. & Stein, H. High proliferative activity of Reed Sternberg associated antigen Ki-1 positive cells in normal lymphoid tissue. *J Clin Pathol* **39**, 993-7. (1986).
35. Ellis, T. M., Simms, P. E., Slivnick, D. J., Jack, H. M. & Fisher, R. I. CD30 is a signal-transducing molecule that defines a subset of human activated CD45RO+ T cells. *J Immunol* **151**, 2380-9. (1993).

36. Gruss, H. J. et al. Expression and regulation of CD30 ligand and CD30 in human leukemia- lymphoma cell lines. *Leukemia* **8**, 2083-94. (1994).
37. Gruss, H. J. & Dower, S. K. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* **85**, 3378-404. (1995).
38. Mori, M. et al. CD30-CD30 ligand interaction in primary cutaneous CD30(+) T-cell lymphomas: A clue to the pathophysiology of clinical regression. *Blood* **94**, 3077-83. (1999).
39. Lee, S. Y., Kandala, G., Liou, M. L., Liou, H. C. & Choi, Y. CD30/TNF receptor-associated factor interaction: NF-kappa B activation and binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9699-703. (1996).
40. Harlin, H., Podack, E., Boothby, M. & Alegre, M. L. TCR-independent CD30 signaling selectively induces IL-13 production via a TNF receptor-associated factor/p38 mitogen-activated protein kinase- dependent mechanism. *J Immunol* **169**, 2451-9. (2002).
41. Schneider, C. & Hubinger, G. Pleiotropic signal transduction mediated by human CD30: a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family. *Leuk Lymphoma* **43**, 1355-66. (2002).
42. Younes, A. et al. CD30-ligand and CD40-ligand expression in lymph nodes involved with Hodgkin's disease. *Ann Oncol* **8 Suppl 2**, 97-100 (1997).
43. Younes, A. & Carbone, A. CD30/CD30 ligand and CD40/CD40 ligand in malignant lymphoid disorders. *Int J Biol Markers* **14**, 135-43. (1999).
44. Horie, R. et al. Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene* **21**, 2493-503. (2002).
45. Zinzani, P. L. et al. Clinical implications of serum levels of soluble CD30 in 70 adult anaplastic large-cell lymphoma patients. *J Clin Oncol* **16**, 1532-7. (1998).
46. Hargreaves, P. G. & Al-Shamkhani, A. Soluble CD30 binds to CD153 with high affinity and blocks transmembrane signaling by CD30. *Eur J Immunol* **32**, 163-73. (2002).

47. Macgrogan, G. et al. CD30-positive cutaneous large cell lymphomas. A comparative study of clinicopathologic and molecular features of 16 cases. *Am J Clin Pathol* **105**, 440-50 (1996).
48. French, L. E., Shapiro, M., Junkins-Hopkins, J. M., Vittorio, C. C. & Rook, A. H. Regression of multifocal, skin-restricted, CD30-positive large T-cell lymphoma with interferon alfa and bexarotene therapy. *J Am Acad Dermatol* **45**, 914-8. (2001).
49. Willemze, R. & Beljaards, R. C. Spectrum of primary cutaneous CD30 (Ki-1)-positive lymphoproliferative disorders. A proposal for classification and guidelines for management and treatment. *J Am Acad Dermatol* **28**, 973-80. (1993).
50. Bekkenk, M. W. et al. Primary and secondary cutaneous CD30(+) lymphoproliferative disorders: a report from the Dutch Cutaneous Lymphoma Group on the long-term follow-up data of 219 patients and guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* **95**, 3653-61. (2000).
51. Dummer, R., Hess-Schmid, M. & Burg, G. Cutaneous T-cell lymphomas: prognosis and quality-of-life issues. *Clin Lymphoma* **1 Suppl 1**, S21-5. (2000).
52. Drews, R., Samel, A. & Kadin, M. E. Lymphomatoid papulosis and anaplastic large cell lymphomas of the skin. *Semin Cutan Med Surg* **19**, 109-17. (2000).
53. LeBoit, P. E. Lymphomatoid papulosis and cutaneous CD30+ lymphoma. *Am J Dermatopathol* **18**, 221-35. (1996).
54. Paulli, M. et al. CD30/Ki-1-positive lymphoproliferative disorders of the skin--clinicopathologic correlation and statistical analysis of 86 cases: a multicentric study from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Cutaneous Lymphoma Project Group. *J Clin Oncol* **13**, 1343-54. (1995).
55. Stein, H. et al. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* **96**, 3681-95. (2000).
56. Filippa, D. A. et al. CD30 (Ki-1)-positive malignant lymphomas: clinical, immunophenotypic, histologic, and genetic characteristics and differences with Hodgkin's disease. *Blood* **87**, 2905-17. (1996).
57. Duyster, J., Bai, R. Y. & Morris, S. W. Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene* **20**, 5623-37 (2001).

58. Chan, W. Y. et al. Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry* **28**, 1033-1039 (1989).
59. Dumber, T. S., Gentry, G. A. & Olson, M. O. Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry* **28**, 9495-501. (1989).
60. Iwahara, T. et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* **14**, 439-49. (1997).
61. Morris, S. W. et al. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* **14**, 2175-88. (1997).
62. Morris, S. W. et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* **263**, 1281-4. (1994).
63. Kadin, M. E. & Morris, S. W. The t(2;5) in human lymphomas. *Leuk Lymphoma* **29**, 249-56. (1998).
64. Fujimoto, J. et al. Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5). *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4181-6. (1996).
65. Kuefer, M. U. et al. Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice. *Blood* **90**, 2901-10. (1997).
66. Sandlund, J. T. et al. Clinical features and treatment outcome for children with CD30+ large-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **12**, 895-8. (1994).
67. Lander, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921. (2001).
68. Hsiao, L. L. et al. A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics* **7**, 97-104. (2001).
69. Green, C. D., Simons, J. F., Taillon, B. E. & Lewin, D. A. Open systems: panoramic views of gene expression. *J Immunol Methods* **250**, 67-79 (2001).
70. Ahmed, F. E. Molecular techniques for studying gene expression in carcinogenesis. *J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* **20**, 77-116 (2002).
71. Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**, 169-93 (2000).

72. Schena, M. et al. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10614-9 (1996).
73. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14863-8 (1998).
74. Jordan, B. Puces-actualités. *Medecine sciences* **18**, 297-301 (2002).
75. Bertucci, F. et al. [DNA arrays: technological aspects and applications.]. *Bull Cancer* **88**, 243-52 (2001).
76. Liang, P. & Pardee, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-71. (1992).
77. Diatchenko, L. et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6025-30. (1996).
78. Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y. F. & Siebert, P. D. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* **303**, 349-80 (1999).
79. Kiss, C. et al. Improved subtractive suppression hybridization combined with high density cDNA array screening identifies differentially expressed viral and cellular genes. *J Virol Methods* **107**, 195-203 (2003).
80. Ji, W., Wright, M. B., Cai, L., Flament, A. & Lindpaintner, K. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics* **3**, 12 (2002).
81. Beylot-Barry, M., Groppi, A., Vergier, B., Pulford, K. & Merlio, J. P. Characterization of t(2;5) reciprocal transcripts and genomic breakpoints in CD30+ cutaneous lymphoproliferations. *Blood* **91**, 4668-76. (1998).
82. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9. (1987).
83. Soubeyran, P., Cabanillas, F. & Lee, M. S. Analysis of the expression of the hybrid gene bcl-2/IgH in follicular lymphomas. *Blood* **81**, 122-7. (1993).

84. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10. (1990).
85. Coulombe, P. A. The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 17-29. (1993).
86. Yoshikawa, K., Katagata, Y. & Kondo, S. Relative amounts of keratin 17 are higher than those of keratin 16 in hair-follicle-derived tumors in comparison with nonfollicular epithelial skin tumors. *J Invest Dermatol* **104**, 396-400 (1995).
87. Weiss, R. A., Eichner, R. & Sun, T. T. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J Cell Biol* **98**, 1397-406. (1984).
88. Paladini, R. D., Takahashi, K., Bravo, N. S. & Coulombe, P. A. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* **132**, 381-97. (1996).
89. Komine, M. et al. Inflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor alpha induces K6b keratin synthesis through a transcriptional complex containing NFkappa B and C/EBPbeta. *J Biol Chem* **275**, 32077-88. (2000).
90. Jiang, C. K. et al. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6786-90. (1993).
91. Komine, M. et al. Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **116**, 330-8. (2001).
92. Hattori, N. et al. Interferon-gamma, a strong suppressor of cell proliferation, induces upregulation of keratin K6, one of the inflammatory- and proliferation- associated keratins. *J Invest Dermatol* **119**, 403-10. (2002).
93. Meyuhas, O., Baldin, V., Bouche, G. & Amalric, F. Glucocorticoids repress ribosome biosynthesis in lymphosarcoma cells by affecting gene expression at the level of transcription, posttranscription and translation. *Biochim Biophys Acta* **1049**, 38-44 (1990).

94. Bouche, G. et al. Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0---G1 transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 6770-4 (1987).
95. Busch, H. & Smetana, K. The nucleolus. *Academic Press New-York* (1970).
96. Dubus, P. et al. [Study of B-lymphocyte clonality using in vitro gene amplification (PCR) in paraffin embedded samples]. *Ann Pathol* **14**, 227-33 (1994).
97. Hildebrandt, T. et al. Identification of THW, a putative new tumor suppressor gene. *Anticancer Res* **20**, 2801-9 (2000).
98. Hildebrandt, T., van Dijk, M. C., van Muijen, G. N. & Weidle, U. H. Loss of heterozygosity of gene THW is frequently found in melanoma metastases. *Anticancer Res* **21**, 1071-80 (2001).
99. Reynolds, A. B., Roesel, D. J., Kanner, S. B. & Parsons, J. T. Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol Cell Biol* **9**, 629-38 (1989).
100. Bonne, S., van Hengel, J. & van Roy, F. Chromosomal mapping of human armadillo genes belonging to the p120(ctn)/plakophilin subfamily. *Genomics* **51**, 452-4. (1998).
101. Reynolds, A. B. et al. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol* **14**, 8333-42. (1994).
102. Anastasiadis, P. Z. & Reynolds, A. B. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci* **113**, 1319-34. (2000).
103. Daniel, J. M. & Reynolds, A. B. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* **19**, 3614-23. (1999).
104. Kim, S. W. et al. Isolation and characterization of XKaiso, a transcriptional repressor that associates with the catenin Xp120(ctn) in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* **277**, 8202-8. (2002).
105. van Hengel, J., Vanhoenacker, P., Staes, K. & van Roy, F. Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7980-5. (1999).

106. Li, Y. & Kufe, D. The Human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen signals nuclear localization of the catenin p120(ctn). *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 440-3. (2001).
107. Jawhari, A. U., Noda, M., Pignatelli, M. & Farthing, M. Up-regulated cytoplasmic expression, with reduced membranous distribution, of the src substrate p120(ctn) in gastric carcinoma. *J Pathol* **189**, 180-5. (1999).
108. Dillon, D. A., D'Aquila, T., Reynolds, A. B., Fearon, E. R. & Rimm, D. L. The expression of p120ctn protein in breast cancer is independent of alpha- and beta-catenin and E-cadherin. *Am J Pathol* **152**, 75-82. (1998).
109. Gold, J. S., Reynolds, A. B. & Rimm, D. L. Loss of p120ctn in human colorectal cancer predicts metastasis and poor survival. *Cancer Lett* **132**, 193-201. (1998).
110. Skoudy, A., Gomez, S., Fabre, M. & Garcia de Herreros, A. p120-catenin expression in human colorectal cancer. *Int J Cancer* **68**, 14-20. (1996).
111. Syrigos, K. N., Karayiannakis, A., Syrigou, E. I., Harrington, K. & Pignatelli, M. Abnormal expression of p120 correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *Eur J Cancer* **34**, 2037-40. (1998).
112. Shimazui, T. et al. Prognostic value of cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer Res* **56**, 4154-8. (1996).
113. Mann, K., Deutzmann, R., Paulsson, M. & Timpl, R. Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC. *FEBS Lett* **218**, 167-72 (1987).
114. Termine, J. D. et al. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **26**, 99-105 (1981).
115. Swaroop, A., Hogan, B. L. & Francke, U. Molecular analysis of the cDNA for human SPARC/osteonectin/BM-40: sequence, expression, and localization of the gene to chromosome 5q31- q33. *Genomics* **2**, 37-47 (1988).
116. McVey, J. H., Nomura, S., Kelly, P., Mason, I. J. & Hogan, B. L. Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene. Intron/exon organization and an unusual promoter region. *J Biol Chem* **263**, 11111-6 (1988).

117. Motamed, K. SPARC (osteonectin/BM-40). *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 1363-6. (1999).
118. Bradshaw, A. D. & Sage, E. H. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* **107**, 1049-54. (2001).
119. Yamanaka, M. et al. Analysis of the gene expression of SPARC and its prognostic value for bladder cancer. *J Urol* **166**, 2495-9. (2001).
120. Yan, Q. & Sage, E. H. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* **47**, 1495-506. (1999).
121. Briggs, J., Chamboredon, S., Castellazzi, M., Kerry, J. A. & Bos, T. J. Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells. *Oncogene* **21**, 7077-91 (2002).
122. Ledda, F. et al. The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol* **108**, 210-4 (1997).
123. Sturm, R. A. et al. Osteonectin/SPARC induction by ectopic beta(3) integrin in human radial growth phase primary melanoma cells. *Cancer Res* **62**, 226-32. (2002).
124. Porte, H. et al. Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *Int J Cancer* **64**, 70-5 (1995).
125. Porte, H. et al. Overexpression of stromelysin-3, BM-40/SPARC, and MET genes in human esophageal carcinoma: implications for prognosis. *Clin Cancer Res* **4**, 1375-82 (1998).
126. Thomas, R., True, L. D., Bassuk, J. A., Lange, P. H. & Vessella, R. L. Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* **6**, 1140-9. (2000).
127. Ledda, M. F. et al. Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med* **3**, 171-6 (1997).
128. Pei, L. & Melmed, S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* **11**, 433-41. (1997).

129. Kakar, S. S. Molecular cloning, genomic organization, and identification of the promoter for the human pituitary tumor transforming gene (PTTG). *Gene* **240**, 317-24. (1999).
130. Prezant, T. R., Kadioglu, P. & Melmed, S. An intronless homolog of human proto-oncogene hPTTG is expressed in pituitary tumors: evidence for hPTTG family. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 1149-52. (1999).
131. Chen, L., Puri, R., Lefkowitz, E. J. & Kakar, S. S. Identification of the human pituitary tumor transforming gene (hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization. *Gene* **248**, 41-50. (2000).
132. Zhang, X. et al. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol* **13**, 156-66. (1999).
133. Lee, I. A., Seong, C. & Choe, I. S. Cloning and expression of human cDNA encoding human homologue of pituitary tumor transforming gene. *Biochem Mol Biol Int* **47**, 891-7. (1999).
134. Dominguez, A. et al. hpttg, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG. *Oncogene* **17**, 2187-93. (1998).
135. Puri, R., Tousson, A., Chen, L. & Kakar, S. S. Molecular cloning of pituitary tumor transforming gene 1 from ovarian tumors and its expression in tumors. *Cancer Lett* **163**, 131-9. (2001).
136. Heaney, A. P. et al. Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours. *Lancet* **355**, 716-9. (2000).
137. Saez, C. et al. Expression of hpttg proto-oncogene in lymphoid neoplasias. *Oncogene* **21**, 8173-7 (2002).
138. Heaney, A. P., Horwitz, G. A., Wang, Z., Singson, R. & Melmed, S. Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis. *Nat Med* **5**, 1317-21. (1999).
139. Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T. & Kirschner, M. W. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* **285**, 418-22. (1999).

140. Hashimoto, Y. et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6336-41. (2001).
141. Tajima, H. et al. Evidence for in vivo production of Humanin peptide, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-related insults. *Neurosci Lett* **324**, 227-31. (2002).
142. Niikura, T., Hashimoto, Y., Tajima, H. & Nishimoto, I. Death and survival of neuronal cells exposed to Alzheimer's insults. *J Neurosci Res* **70**, 380-91 (2002).
143. Maximov, V., Martynenko, A., Hunsmann, G. & Tarantul, V. Mitochondrial 16S rRNA gene encodes a functional peptide, a potential drug for Alzheimer's disease and target for cancer therapy. *Med Hypotheses* **59**, 670-3 (2002).
144. Baserga, S. J. et al. Polyadenylation of a human mitochondrial ribosomal RNA transcript detected by molecular cloning. *Gene* **35**, 305-12 (1985).
145. Penta, J. S., Johnson, F. M., Wachsman, J. T. & Copeland, W. C. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res* **488**, 119-33 (2001).
146. Caricasole, A. et al. A novel rat gene encoding a Humanin-like peptide endowed with broad neuroprotective activity. *Faseb J* **16**, 1331-3. (2002).
147. Take, H. et al. Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 321-8. (2000).
148. Gout, I. et al. Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *Embo J* **19**, 4015-25. (2000).
149. Borinstein, S. C. et al. SETA is a multifunctional adapter protein with three SH3 domains that binds Grb2, Cbl, and the novel SB1 proteins. *Cell Signal* **12**, 769-79 (2000).
150. Narita, T. et al. Assignment of SH3KBP1 to human chromosome band Xp22.1-->p21.3 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **93**, 133-4 (2001).
151. Dikic, I. CIN85/CMS family of adaptor molecules. *FEBS Lett* **529**, 110 (2002).
152. Chen, B., Borinstein, S. C., Gillis, J., Sykes, V. W. & Bogler, O. The glioma-associated protein SETA interacts with AIP1/Alix and ALG-2 and modulates apoptosis in astrocytes. *J Biol Chem* **275**, 19275-81 (2000).

153. Kirsch, K. H. et al. The adapter type protein CMS/CD2AP binds to the proto-oncogenic protein c-Cbl through a tyrosine phosphorylation-regulated Src homology 3 domain interaction. *J Biol Chem* **276**, 4957-63 (2001).
154. Brett, T. J., Traub, L. M. & Fremont, D. H. Accessory protein recruitment motifs in clathrin-mediated endocytosis. *Structure (Camb)* **10**, 797-809 (2002).
155. Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y. & Dikic, I. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* **416**, 183-7. (2002).
156. Szymkiewicz, I. et al. CIN85 participates in Cbl-b-mediated downregulation of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* **277**, 12 (2002).
157. Watanabe, S. et al. Characterization of the CIN85 adaptor protein and identification of components involved in CIN85 complexes. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 167-74. (2000).
158. Petrelli, A. et al. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* **416**, 187-90. (2002).
159. Satterwhite, E. et al. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* **98**, 3413-20. (2001).
160. Avram, D. et al. Isolation of a novel family of C(2)H(2) zinc finger proteins implicated in transcriptional repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *J Biol Chem* **275**, 10315-22. (2000).
161. Nakamura, T. et al. Evi9 encodes a novel zinc finger protein that physically interacts with BCL6, a known human B-cell proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **20**, 3178-86. (2000).
162. Saiki, Y., Yamazaki, Y., Yoshida, M., Katoh, O. & Nakamura, T. Human EVI9, a homologue of the mouse myeloid leukemia gene, is expressed in the hematopoietic progenitors and down-regulated during myeloid differentiation of HL60 cells. *Genomics* **70**, 387-91. (2000).
163. Wakabayashi, Y. et al. Homozygous deletions and point mutations of the Rit1/Bcl11b gene in gamma-ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 598-603 (2003).

164. Bernard, O. A. et al. A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **15**, 1495-504. (2001).
165. Avram, D., Fields, A., Senawong, T., Topark-Ngarm, A. & Leid, M. COUP-TF-interacting protein 1 (CTIP1) is a sequence-specific DNA binding protein. *Biochem J* **27** (2002).
166. Chang, C. C., Ye, B. H., Chaganti, R. S. & Dalla-Favera, R. BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6947-52. (1996).
167. Seyfert, V. L., Allman, D., He, Y. & Staudt, L. M. Transcriptional repression by the proto-oncogene BCL-6. *Oncogene* **12**, 2331-42. (1996).
168. Lukowsky, A. Clonality analysis by T-cell receptor gamma PCR and high-resolution electrophoresis in the diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Methods Mol Biol* **218**, 303-20 (2003).
169. Holder, J. E., Colloby, P. S., Fletcher, A. & Hutchinson, P. E. Regressing cutaneous lymphomas of T-cell and B-cell lineage. *Br J Dermatol* **132**, 815-20 (1995).