

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2010

Thèse n° 1780

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie cellulaire et physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 17 Décembre 2010

Par Anne-Lise PEILLE

Né(e) le 03 Octobre 1982 à Talence

Etude de la régulation de l'expression de PLAGL1 par des mécanismes épigénétiques dans les sarcomes

Membres du Jury

M. J. ROBERT, Professeur à l'université Bordeaux 2.....	Président
M. R. DANTE, Directeur de recherche INSERM, Lyon	Rapporteur
M. L. JOURNOT, Directeur de recherche CNRS, Montpellier	Rapporteur
M. C. GROSSET, Chargé de recherche INSERM, Bordeaux	Examineur
Mme. L. BRESSON-BEPOLDIN, Chargée de recherche CNRS, Bordeaux ..	Directrice de thèse

*« C'est pas avec des idées préconçues
qu'on fait avancer la recherche »*

Laurence Bresson-Bépoldin

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Laurence Bresson-Bépoldin, ma directrice de thèse de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma thèse au sein de l'unité INSERM U916, VINCO. Le sujet initial est bien loin de ce que nous présentons ici... Nous étions bien loin d'imaginer la galère dans laquelle nous embarquions ! Merci de m'avoir laissé une grande liberté d'opinion, d'expression et de décision dans la manière de mener ce travail, désolée de l'avoir dirigé vers de la génétique... J'ai beaucoup appris grâce à cette indépendance, c'est assez rare pour être souligné. Merci donc pour la grande confiance que tu m'as accordé. Je n'occulte pas les moments de doutes et d'incompréhension mutuelle mais je souhaite uniquement garder en mémoire nos réunions plus ou moins scientifiques jusque tard le soir, ton aide préciseuse, tes conseils indispensables, ta rigueur scientifique rassurante, tes encouragements nombreux et variés, ta patience avec ce manuscrit... et avec moi... J'espère que tu ne vas pas trouver les figures de ce manuscrit trop petites 😊

Je tiens à remercier François Ichas et Josy Reiffers de m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire. Je tiens également à remercier Frédéric Chibon pour avoir sauvé le soldat ZAC-PLAGL1 en l'orientant vers les sarcomes.

J'exprime toute ma gratitude au Pr. Jacques Robert de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse ainsi qu'à M. Laurent Journot et M. Robert Dante d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail, j'espère que le volume de ce manuscrit ne vous aura pas fait regretter votre choix... Merci également à M. Christophe Grosset d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie aussi tout le personnel du laboratoire et plus particulièrement :

- Anne-Marie, tatie-mamie du labo, tes crises de nerfs et de rire vont me manquer ! je sais que tu vas finir tard le jour de ma soutenance mais j'ai pris soin de choisir un jour où tu n'avais pas aquagym...*
- Chantal, pour son aide précieuse en bio mol*
- Jean-Pierre Portail, merci pour le turón qui m'a aidé à tenir le coup lors de longues soirées passées au labo.*

Un merci tout particulier à Valérie, qui m'avoir poussé à travailler sur le pyro à un moment où l'on ne savait plus quoi faire de ce maudit ZAC. Merci de m'avoir fait la gentillesse de corriger ce manuscrit et pour ton enthousiasme sans limite, toujours réconfortant.

Je souhaite également à remercier tous les étudiants du laboratoire et plus particulièrement :

- Pascal Breson mon meilleur voisin de bureau, tes bagues et tes t-shirts fluo me manquent ;*
- Marina Simon ma collègue de biomol toujours drôle et de bonne humeur ;*
- Alban Bessede pour son aide et ses précieux conseils scientifiques et autres...*
- Christophe Rey, toujours d'humeur égale, travailler à tes cotés a été un réel plaisir même si tes horaires me déconcertaient un peu... merci mille fois pour l'aide que tu m'as apporté dans l'impression de ce manuscrit.*
- Stéphane Puyo, monsieur saucisson-yop-frites-poulet-foot pour la gentillesse et la patience dont tu as fait preuve lorsque, au moindre problème de western blot ou de pyro, je venais de chercher*
- François Le Loarer pour sa prose et ses goûts musicaux sans équivalence*
- François Moisan, nos conversations sur l'ARN et les PCR me manquent, merci de m'avoir fait découvrir la série TBBT, notamment l'épisode où l'on apprend que dans la recherche « qu'un résultat négatif et quand même un résultat »...*
- Merci à Laetitia Andrique et Céline Auzanneau, pour ces soirées « avenir professionnel » à la calle ocho, comme l'avenir semble moins stressant et pénible devant un mojito et en écoutant de la salsa. Je ne sais pas si on finira par monter ce fameux salon de thé mais j'espère que chacune trouvera ce qui lui manque*
- Barbara Lortal, la seule personne au monde à avoir plus de chaussures que Laetitia et moi réunies !*
- Audrey Kauffmann, pour sa gentillesse, sa patience et son aide précieuse pour toutes les analyses de méthylation, nous n'aurions pas réussi sans ça !*
- un grand merci à Marion Zanese, nos vacances à Playa del Carmen resteront gravées dans ma mémoire, merci de ton soutien sans faille durant ces trois années.*

Je tiens à dire un grand merci aux non-VINCO : Elodie Rouch, Myriam Chassin et Jalila El Arrouchi pour m'avoir soutenu dans les moments difficiles, pas uniquement professionnels, qui ont émaillé ces trois ans.

Merci aussi aux ex-U920, Sophie Dedieu, Julie Millour, Raphael Pineau pour m'avoir donné envie de poursuivre dans cette voie. Un merci tout particulier à Marion Bouchareilh, qui m'a dirigé vers Laurence lorsque je cherchais une thèse.

Pour finir je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu durant cette thèse et plus largement durant mes études, en premier lieu mes parents et mes sœurs, merci de m'avoir donné la chance de faire de si longues études. Merci de votre soutien sans faille et de votre enthousiasme, cette thèse est un peu la votre.

Liste des abréviations

µg : Microgramme	dNTP : désoxynucléotide tri phosphate
µl : Microlitre	EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique
µM : Micromolaire	EGF : epidermal growth factor
3'UTR : 3' Non-traduite	EGFP : « Enhanced green fluorescent protein » ou protéine fluorescente verte plus
5'UTR : 5' Non-traduite	EORTC : European organisation for research and treatment of cancer
5AZC : 5-Azacytidine	FDR : False discovery rate ou taux de faux positif
5AZdC : 5-Azadeoxycytidine	FSC : Forward SCatter
A : Adénine	Fw : Forward
Ac ou « Ab » : Anticorps ou « Antibody »	G : Guanine
ADN : acide désoxyribonucléique	GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire	GFP : « Green fluorescent protein » ou protéine fluorescente verte
AGO : Argonaute	GIST : Gastro Intestinal Stromal Tumor
ARN : acide ribonucléique	HAT : Histone acétyltransférase
ARNm : ARN messenger	HDAC : Histone déacétylase
ARNr : ARN ribosomal	HDM : histone déméthylase
ARNsn : petits ARN nucléaires	HMT : Histone Methyltransferase
ARNt : ARN de transfert	IP : iodure de propidium
ATP : Adenosine triphosphate	IPTG : isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside
BCL-2 : B-cell CLL/lymphoma 2	KDa : kilo dalton
BET : bromure d'éthidium	LB : milieu Luria-Bertani
C : Cytosine	LMS : léiomyosarcome
CpG : Cytosine ^{phosphate} Guanosine	LOI : loss of imprinting ou perte de l'empreinte
Ct : threshold cycle	
D.O : Densité optique	
DAB : diamino-3,3'benzidine	
Décitabine : 2'-Déoxy-5-azacytidine	
DMR : differentially methylated region ou région différenciellement méthylée	
DMSO : Diméthylsulfoxyde	
DNMT : Méthyltransférase	

LOT1 : Lost on transformation 1
 LPS : liposarcome
 MBD : Methyl Binding Domain (domaine de liaison Methyl-CpG)
 MBP : Methyl Binding Protein (Protéine liant les groupements méthyles)
 MDR : multidrugs resistente protein
 MeCP2 : Protéine liant les CpG méthylés
 MGMT : O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase
 min : minute
 miRNA : microRNA
 miRNP : miRNA-containing ribonucleoprotein (ou ribonucléoprotéine contenant des microRNA)
 ml : millilitre
 mM : millimolaire
 nt : nucleotide
 pb ou : Paire de Base
 PBS : Phosphate Buffered Saline
 PBS-T : Phosphate Buffered Saline – Tween 20
 PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction en chaine de polymerase)
 PEG : polyethylene glycol
 PFA : paraformaldéhyde
 PLAGL1 : PLeiomorphic Adenoma Gene Like 1
 pré-miARN : microARN précurseur
 pri-microRNA : microARN primaire
 PVDF : difluorure de polyvinylidène
 qPCR : PCR quantitative
 qRT-PCR : RT-PCR quantitative
 RISC : RNA-induced silencing complex
 RNAi : RNA interference
 RNase : Ribonucléase
 RNP : Ribonucléoprotéine
 rpm : rotation par minute
 RPMI : Roswell Park Memorial Institute
 RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction
 Rv : Reverse
 SAM : S-adénosylméthionine
 SDS : sodium dodécyl sulfate
 Sec : seconde
 siRNA : Small interfering RNA
 SSC : Side SCatter
 STS : sarcomes des tissus mous
 T : Thymidine
 TAE : Tris-acide acétique-EDTA
 TBS : Tris buffered saline
 TBST : TBS + Tween-20 0.1%
 TMRM : tetramethylrhodamine methyl ester
 TNDM : Transient neonatal diabetes mellitus ou diabetes néonatal transitoire
 TP53 : tumor protein p53
 TSA : Trichostatin A
 US : undifferentiated sarcoma ou sarcoma indifférencié
 UTR : untranslated region, Région non traduite
 X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-p-D-galactopyranoside
 ZAC1 : Zinc-finger gene involved in Apoptosis and Cell-cycle control 1 gene

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	25
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	49
.1 REGULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE PAR UN MECANISME EPIGENETIQUE : MODIFICATION DE L'ADN ET DE SES PROTEINES ASSOCIEES.....	51
.1.1 Méthylation de l'ADN.....	51
.1.1.1 Principe.....	51
.1.1.2 Les îlots CpG : définition et localisation.....	53
.1.1.3 Méthyltransferases.....	55
.1.1.4 Fonctions de la méthylation	59
.1.1.5 Méthylation de l'ADN et pathologies	61
.1.1.6 Applications cliniques de la méthylation	65
.1.1.6.1 Tests diagnostiques impliquant la méthylation.....	65
.1.1.6.2 Statut de méthylation et réponse à la chimiothérapie	67
.1.1.6.3 Nouvelles approches thérapeutiques par les agents déméthylants	69
.1.2 Modifications des histones.....	71
.1.2.1 Acétylation des histones.....	73
.1.2.2 Modifications des histones et cancers.....	75
.1.3 Empreinte parentale.....	77
.1.4 Conclusion	83
.2 REGULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE PAR UN MECANISME EPIGENETIQUE : MICRORNA	87
.2.1 Découverte des microRNA.....	87
.2.2 Synthèse des microRNA.....	89
.2.3 Modes d'action des microRNA	95
.2.4 MicroRNA et cancers	97
.2.5 Conclusion	103
.3 LA PROLIFERATION ET LA MORT CELLULAIRE : REGULATION ET DEREGLATION DANS LES CANCERS	107
.3.1 Le cycle cellulaire.....	107
.3.1.1 Les phases du cycle cellulaire	107
.3.1.2 Les protéines régulatrices du cycle cellulaire	109
.3.1.3 Les points de contrôle « checkpoint » du cycle cellulaire.....	111
.3.1.4 Cycle cellulaire et cancers.....	113
.3.2 La mort cellulaire.....	115
.3.2.1 Nécrose, autophagie, anoïkis.....	115
.3.2.2 L'apoptose	117
.3.2.2.1 Description générale	117
.3.2.2.2 Circonstances du déclenchement de l'apoptose.....	119
.3.2.2.3 Les caspases : acteurs principaux de l'apoptose	119
.3.2.2.4 La voie intrinsèque ou mitochondriale.....	123
.3.2.2.5 La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort	123
.3.2.3 Apoptose et cancer.....	125
.4 PLAGL1 (PLEIOMORPHIC ADENOMA GENE LIKE 1).....	127
.4.1 Circonstances de la découverte de ZAC1/LOT1/PLAGL1.....	127
.4.2 Expression et caractéristiques de ZAC1/LOT1/PLAGL1.....	129
.4.3 Voies de signalisation impliquant ZAC1/LOT1/PLAGL1	131
.4.4 Localisation chromosomique de PLAGL1.....	133
.4.5 Dérégulation de l'expression de PLAGL1 dans diverses pathologies.....	135
.4.5.1 Expression de PLAGL1 dans les cancers	135
.4.5.2 Expression de PLAGL1 dans d'autres pathologies.....	137
.4.6 Fonctions de la protéine ZAC1/LOT1/PLAGL1.....	139
.4.7 Régulation de l'expression de PLAGL1 par méthylation de son promoteur	141
.4.8 Conclusion	143

.5	MODELE D'ETUDE : LES SARCOMES DES TISSUS MOUS	145
.5.1	<i>Facteurs de risque</i>	145
.5.2	<i>Récidive</i>	145
.5.3	<i>Les types de sarcomes</i>	147
.5.4	<i>Traitement</i> :	153
.5.4.1	La chirurgie :	153
.5.4.2	La chimiothérapie	155
.5.4.2.1	Chimiothérapie adjuvante (après chirurgie)	155
.5.4.2.2	Chimiothérapie néo-adjuvante (avant chirurgie)	155
.5.4.3	La radiothérapie.....	157
.5.4.4	Les thérapies ciblées.....	157
.5.5	<i>La génétique des sarcomes</i>	159
.5.6	<i>Signatures prédictives dans les sarcomes</i>	161
.5.6.1	Exemple d'une signature transcriptomique : CINSARC.....	161
.5.6.2	Exemple d'une signature microRNA	163
.5.7	<i>Conclusion</i>	165
	OBJECTIFS DU TRAVAIL	167
	MATERIEL ET METHODES	173
.1	CULTURE CELLULAIRE	175
.2	CLONAGE.....	175
.2.1	<i>Culture bactérienne</i>	175
.2.2	<i>Souches bactériennes</i>	177
.2.3	<i>Vecteurs plasmidiques</i>	177
.2.4	<i>Clonage en TOPO TA : utilisation d'IPTG, X gal</i>	179
.2.5	<i>Sous-clonage classique par PCR ou digestion</i>	181
.2.6	<i>Purification du produit PCR</i>	183
.2.7	<i>Digestion enzymatique</i>	185
.2.8	<i>Séparation et purification de fragments d'intérêt</i>	185
.2.9	<i>Ligation</i>	187
.2.10	<i>Transformation bactérienne</i>	187
.2.11	<i>Extraction plasmidique</i>	189
.2.11.1	Minipreps avec kit promega	189
.2.11.2	Midipreps avec le kit Qiagen	189
.2.12	<i>Vérification des clones obtenus par digestion enzymatique et/ou séquençage</i>	189
.2.13	<i>Mutagenèse dirigée</i>	191
.3	TRANSFECTION	191
.4	QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION D'ARNM ET MICRORNA PAR QRT-PCR.....	193
.4.1	<i>Extraction des ARN</i>	193
.4.1.1	Extraction des ARN totaux	193
.4.1.2	Extraction des microRNA	195
.4.2	<i>Dosage des ARN totaux et des microRNA</i>	195
.4.3	<i>Transcription inverse</i>	197
.4.3.1	Rétro-transcription des ARNm.....	197
.4.3.2	Rétro-transcription des microRNA.....	197
.4.4	<i>PCR quantitative (qPCR)</i>	199
.4.4.1	Quantification des ARNm	199
.4.4.2	Quantification des microRNA	201
.4.5	<i>Electrophorèse pour vérifier la présence d'une bande unique</i>	203
.4.6	<i>Analyse des résultats obtenus</i>	203
.5	IMMUNOCYTOFLUORESCENCE	207
.5.1	<i>Principe</i>	207
.5.2	<i>Mise en pratique</i>	207
.6	IMMUNOHISTOCHEMIE.....	209
.6.1	<i>Principe</i>	209
.6.2	<i>Mise en pratique</i>	209
.7	CYTOMETRIE	213

.7.1	Principe.....	213
.7.2	Mesure de l'apoptose.....	215
.7.3	Mesure du cycle cellulaire.....	217
.7.4	Immunofluorescence de <i>PLAGL1</i> sur cellules en suspension pour une analyse en cytométrie de flux.....	217
.8	WESTERN BLOT.....	219
.8.1	Principe.....	219
.8.2	Extraction des protéines.....	219
.8.3	Dosage des protéines.....	221
.8.4	Réalisation du western blot et anticorps utilisés.....	221
.9	ANALYSE DE LA METHYLATION DU PROMOTEUR DE <i>PLAGL1</i>	223
.9.1	Principe général de l'étude.....	225
.9.2	Extraction d'ADN génomique à partir de lignées.....	225
.9.3	Dosage.....	225
.9.4	Traitement au bisulfite de sodium.....	227
.9.4.1	Principe.....	227
.9.4.2	Protocole.....	227
.9.5	PCR (Polymerase Chain Reaction).....	229
.9.5.1	Principe.....	229
.9.5.2	Protocole.....	231
.9.6	Electrophorèse pour vérifier la présence d'une bande unique.....	231
.9.7	Pyroséquençage.....	233
.9.7.1	Principe.....	233
.9.7.2	Protocole.....	235
.9.8	Analyses statistiques.....	237

PREMIERE PARTIE : REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE *PLAGL1* DANS LES SARCOMES..... 241

.1	RESULTATS DE LA PARTIE : REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE.....	243
.1.1	Modèles d'étude.....	243
.1.2	Expression transcriptionnelle de <i>PLAGL1</i> dans les sarcomes.....	245
.1.2.1	Profil génomique de <i>PLAGL1</i>	245
.1.2.1.1	Lignées.....	245
.1.2.1.2	Tumeurs.....	247
.1.2.2	Expression du transcrit <i>PLAGL1</i>	249
.1.2.2.1	Lignées.....	249
.1.2.2.2	Tumeurs.....	251
.1.2.2.3	ARNm de <i>PLAGL1</i> : facteur diagnostique ou pronostique ?.....	253
.1.3	Régulation transcriptionnelle de <i>PLAGL1</i> par la méthylation de son promoteur.....	255
.1.3.1	Mise au point de l'analyse de méthylation par pyroséquençage.....	255
.1.3.2	Etude de la méthylation de <i>PLAGL1</i> dans les lignées.....	261
.1.3.3	Etude de la méthylation de <i>PLAGL1</i> dans des tumeurs.....	265
.1.3.4	Profils de méthylation du promoteur de <i>PLAGL1</i>	265
.1.3.4.1	Comparaison entre le profil de méthylation des sarcomes et celui d'une culture primaire de fibroblastes.....	267
.1.3.4.2	Comparaison du profil de méthylation des quatres types de sarcomes.....	269
.1.3.5	Méthylation du promoteur de <i>PLAGL1</i> et expression de son transcrit.....	271
.1.3.6	Méthylation du promoteur de <i>PLAGL1</i> et facteurs cliniques.....	277
.1.3.6.1	Corrélation entre méthylation des CpG / expression de <i>PLAGL1</i> et facteurs cliniques.....	277
.1.3.6.2	Autres sites de méthylation corrélés aux facteurs cliniques.....	281
.1.4	Conclusions générales.....	283
.2	DISCUSSION DE LA PARTIE : REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE.....	287
.2.1	Etat des connaissances sur <i>PLAGL1</i>	287
.2.2	Expression de <i>PLAGL1</i> dans les cellules tumorales.....	291
.2.2.1	Expression de <i>PLAGL1</i> dans les sarcomes.....	291
.2.2.2	Rôle pronostique ou diagnostique de l'ARNm de <i>PLAGL1</i> dans les sarcomes.....	295
.2.3	Régulation de l'expression de <i>PLAGL1</i> par méthylation.....	297
.2.4	Apport de la technique de pyroséquençage pour l'étude de la méthylation de l'ADN.....	301
.2.5	Mise en évidence d'un profil de methylation.....	303
.2.5.1	Signature tumorale de méthylation de l'ADN.....	307

.2.5.2	Signature inter-tumorale de méthylation de l'ADN.....	309
.2.6	<i>Corrélation expression-méthylation</i>	311
.2.7	<i>Méthylation et facteurs cliniques</i>	317
.2.8	<i>Conclusion</i>	325
.2.9	<i>Perspectives</i>	327
DEUXIEME PARTIE : REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DE PLAGL1, DANS LES SARCOMES.....		331
.1	RESULTATS DE LA PARTIE : REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE.....	335
.1.1	<i>Rappel sur l'expression du transcrit de PLAGL1 dans les sarcomes</i>	335
.1.2	<i>Expression de la protéine PLAGL1</i>	335
.1.2.1	Lignées.....	335
.1.2.2	Tumeurs.....	339
.1.3	<i>Hypothèses pouvant expliquer la dichotomie des profils transcriptomiques et protéiques de PLAGL1 dans les sarcomes</i>	341
.1.3.1	Hypothèse d'une modification de la demi-vie de PLAGL1.....	341
.1.3.2	Hypothèse de mutations de PLAGL1.....	341
.1.4	<i>Identification de microRNA pouvant potentiellement cibler PLAGL1</i>	345
.1.5	<i>Test en cytométrie</i>	347
.1.5.1	Principe du test.....	347
.1.5.2	Quantification de l'efficacité et de la spécificité de transfection des microRNA.....	349
.1.5.3	Effet des microRNA sur l'expression de l'EGFP par leur fixation au 3'UTR de PLAGL1.....	353
.1.6	<i>Expression des microRNA d'intérêt dans les lignées de sarcomes</i>	361
.1.7	<i>Effet de l'ajout des microRNA sur l'expression de PLAGL1 dans les MFH128</i>	363
.1.7.1	Validation des microRNA dans les cellules MFH128.....	363
.1.7.2	Effet des microRNA sur l'expression du transcrit PLAGL1.....	365
.1.7.3	Effet des microRNA sur l'expression de la protéine PLAGL1.....	365
.1.8	<i>Effet de l'utilisation d'anti-microRNA sur l'expression de PLAGL1 dans les LPS78 et LPS80</i>	367
.1.8.1	Validation des anti-microRNA dans les lignées LPS78 et LPS80.....	367
.1.8.2	Effet des anti-microRNA sur l'expression du transcrit PLAGL1.....	369
.1.8.3	Effet des anti-microRNA sur l'expression de la protéine PLAGL1.....	369
.2	ETUDES FONCTIONNELLES DE PLAGL1.....	371
.2.1	<i>Effet de la transfection de PLAGL1 dans des cellules HeLa sur l'apoptose</i>	371
.2.1.1	Mesure de l'apoptose en cytométrie.....	371
.2.1.2	Mécanisme apoptotique mis en jeu dans les HeLa.....	375
.2.2	<i>Effet de la transfection de PLAGL1 dans des cellules HeLa sur le cycle cellulaire</i>	375
.2.3	<i>Effet de l'utilisation de miRNA dans les MFH128 sur le cycle cellulaire et l'apoptose</i>	377
.2.4	<i>Conséquences de l'ajout des microRNA dans les cellules MFH128 sur l'expression des gènes cibles de PLAGL1</i>	377
.2.5	<i>Conclusions générales</i>	381
.3	DISCUSSION DE LA PARTIE : REGULATION POST-TRANSCRIPTIONNELLE.....	383
.3.1	<i>Etat des connaissances sur PLAGL1</i>	383
.3.2	<i>Expression de PLAGL1 dans les sarcomes</i>	383
.3.3	<i>Régulation par des microRNA</i>	389
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....		399
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		409

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : méthylation de la position 5 d'une cytosine par DNMT (d'après Espada and Esteller, 2009) qui utilise la S-adenosyl-L- méthionine (SAMe) comme donneur de méthyle, ce qui provoque la libération de S-adenosyl homocysteine (SAH).	54
Figure 2 : séquence peptidique des enzymes de la famille des DNMT (d'après Bourc'his et al., 2001).....	54
Figure 3 : maintien de la méthylation de l'ADN par DNMT1 (d'après Espada and Esteller, 2009).....	54
Figure 4 : anomalies de développement chez des souris sauvege (gauche) et mutées pour DNMT1 (droite), A : anomalie de l'embryon, B : anomalie du sac vitellin (Li E et al., 1992)	56
Figure 5 : compaction de la chromatine en réponse à la méthylation de l'ADN.....	58
Figure 6 : régulation de la transcription par méthylation de l'ADN (Deltour et al., 2005)	60
Figure 7 : formule chimique de la deoxycytidine, la cytidine, la 5-aza-2'deoxycytidine et de la 5-azacytidine	68
Figure 8 : compaction de l'ADN par liaison aux histones (Caterino and Hayes, 2007).....	70
Figure 9 : structure octamerique des histones H2A, H2B, H3 et H4	72
Figure 10 : organisation des nucléosomes autour de l'histone H1	72
Figure 11 : régions génomiques soumises à l'empreinte parentale chez la souris (Cattanach et al., 1996).....	78
Figure 12 : régulation commune de deux gènes d'empreinte <i>IGF2</i> et <i>H19</i> . (Reik and Murrell, 2000).....	78
Figure 13 : régulation des gènes <i>SLC22A 2 / 3</i> par des ARN non codants transcrit à partir du gène <i>IGF2</i> (Gabory and Dandolo, 2005)	78
Figure 14 : synthèse et modes d'actions des microRNA (He and Hannon, 2004).....	88
Figure 15 : A : comparaison des motifs protéiques des 4 protéines AGO humaines, B : structure d'une protéine AGO, C : détail de la protéine AGO2 (L1 et L2 : linker) (Höck and Meister, 2008)	92
Figure 16 : séquence minimale de complémentarité entre le microRNA et le 3'UTR : le seed d'après Filipowicz et al. 2008 (Filipowicz et al., 2008)	94
Figure 17 : modes de répression de la traduction par les microRNA d'après Filipowicz et al. 2008 (Filipowicz et al., 2008).....	96

Figure 18 : nombre de publications sur les microRNA depuis 2000	102
Figure 19 : les étapes du cycle cellulaire.....	106
Figure 20 : couples CDK / cyclines mises en jeu lors des différentes étapes du cycle cellulaire	108
Figure 21 : protéines régulant les CDK et des cyclines au cours du cycle cellulaire.....	110
Figure 22 : points de contrôle du cycle cellulaire	110
Figure 23 : implication de p53 dans le cycle cellulaire et l'apoptose	112
Figure 24 : caractéristiques morphologiques des différentes morts cellulaires (de Bruin and Medema, 2008).....	114
Figure 25 : schéma comparant les différentes phases de la nécrose et de l'apoptose.....	116
Figure 26 : schéma des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose (Galluzzi et al., 2009)	118
Figure 27 : structure des différentes caspases humaines impliquées soit, dans l'apoptose, soit dans l'inflammation (activation des cytokines) (Taylor et al., 2008)	120
Figure 28 : voie intrinsèque de l'apoptose (Castanier and Arnoult, 2010)	122
Figure 29 : différents types de récepteurs de mort mis en jeu lors de l'apoptose extrinsèque	122
Figure 30 : boucle d'amplification de l'apoptose extrinsèque (Hotchkiss and Nicholson, 2006)	124
Figure 31 : comparaison des deux isoformes protéique de PLAGL1 par rapport aux exons de l'ARNm (Poulin and Labelle, 2005)	128
Figure 32 : représentation schématique de PLAGL1: Zinc finger region [(C2H2).7], linker région (<i>linker</i>); Pro/Gln/Glu-riche région (<i>PQE</i>), et COOH terminaison (<i>C-ter</i>), Nucléotides (Nt)	128
Figure 33 : mode d'action de PLAGL1 (ZAC) selon son site de fixation sur les promoteurs	128
Figure 34 : inhibition de l'apoptose induite par PLAGL1 avec les inhibiteurs de caspases dans des cellules SKOVZ (cellules SKOV, issues de d'une tumeur ovarienne exprimant PLAGL1) d'après Kamikihara <i>et al.</i> , (Kamikihara et al., 2005).....	138
Figure 35 : immunohistochimie, expression de PLAGL1 dans les cellules de Purkinje (A), un méningiome (B), un GBM (C) et un astrocytome de bas grade (D) (Lemeta et al., 2007)..	138
Figure 36 : implication de PLAGL1 dans la tumorigenèse. Diminution de la survie de souris xenogreffées avec des cellules 10A transfectées avec un plasmide vide (pointillé) (Hide et al., 2009).....	138

Figure 37 : caryotype de LPS différencié avec des chromosomes en anneau, des chromosomes géants et des associations de télomères (Sandberg, 2004)	148
Figure 38 : caryotype de MFH caractérisé par une polyploïdie d'après Soft Tissue Sarcomas: Lessons from the Past, Challenges for the Future Presented at the 90th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology, Atlanta, March 6, 2001. Sharon W Weiss M.D.....	148
Figure 39 : exemple de caryotype de LMS ; A: LMS prostatique, caryotype de la tumeur primaire sans remaniement majeur sauf le chromosome en anneau (9) (haut), B: LMS rare avec un événement génétique (translocation 18,20) (haut) et de multiples délétions (2, 4, 9, 11, 18, 22) (bas) ; C : LMS présentant une triploïdie pour un grand nombre de chromosomes voire une quadriploïdie (Sandberg, 2005)	150
Figure 40 : caryotype typique d'un GIST avec une délétion du chromosome 14 et du 1p (Sandberg and Bridge, 2002).....	150
Figure 41 : mutations de KIT associées à différents types de cancers	156
Figure 42 : profils génomiques des sarcomes (Chibon et al., 2010) a : profil à amplifications, b : profil à bras ou chromosomes entiers, c : profil complexe	158
Figure 43 : mode de sélection des gènes de CINSARC	160
Figure 44 : Kaplan-Meier représentant la survie sans métastase dans deux séries de sarcomes selon a : la signature CINSARC et b : le grade défini par la FNCLCC. (Chibon et al., 2010)	162
Figure 45: carte du pRK7-ZAC.....	176
Figure 46 : carte du pEGFP-C3	178
Figure 47 : carte du pTRACER.....	178
Figure 48 : Technique de clonage par TOPO TA invitrogen.....	178
Figure 49 : principe de la transcription inverse des ARNm et des microRNA par le système miScript Qiagen.....	196
Figure 50 : principe des qRT-PCR réalisées sur ARNm et microRNA grâce au système miScript Qiagen.....	200
Figure 51 : détermination du Ct ou Take off de la qPCR	202
Figure 52 : principe du Sybr Green I.....	202
Figure 53 : quantification de la fluorescence émise par le Sybr Green I lors des qRT-PCR sur ARNm.	204

Figure 54 : quantification de la fluorescence émise par le Sybr Green I lors des qRT-PCR sur microRNA	204
Figure 55: représentation schématique d'un cytomètre en flux	212
Figure 56 : spectre d'émission et d'excitation des fluorochromes utilisés en cytométrie de flux	212
Figure 57 : structure du TMRM ,	214
Figure 58 : graphiques représentant les évènements mesurés en fonction de leurs caractéristiques en FFC et SSC et de la fluorescence mesurée en FL1 (pour les cellules exprimant la GFP) ou FL2 (pour les cellules marquées au TMRM pour la mesure de l'apoptose).....	214
Figure 59: graphique représentant les évènements mesurés en fonction de la fluorescence mesurée en FL2-W, représentant les différentes phases du cycle cellulaire (cellules marquées à l'iodure de propidium).....	216
Figure 60: représentation schématique du principe de transfert iBlot	222
Figure 61 : principe du traitement au bisulfite de sodium.....	226
Figure 62 : préparation des produits PCR pour le séquençage	232
Figure 63 : principe du pyroséquençage	234
Figure 64 : A : cartouche permettant l'injection des enzymes, substrats, nucléotides lors de l'analyse par pyroséquençage, B : système d'aspiration permettant la purification de l'ADN monocaténaire avant le pyroséquençage	234
Figure 65 : principe de la CGH array. A : procédure, B : profil génomique obtenu après CGH array.....	244
Figure 66 : validation des sondes utilisées pour quantifier <i>PLAGL1</i> par puces Affymetrix sur les sarcomes.....	248
Figure 67 : quantification relative de l'ARNm de <i>PLAGL1</i> par qRT-PCR dans les lignées de sarcomes, le sein et le placenta.....	248
Figure 68 : tableau récapitulatif des données génomiques et transcriptomiques des lignées de sarcomes (gauche), corrélation entre les valeurs des puces Affymétrie et les résultats de qRT-PCR	248
Figure 69 : corrélation entre les deux sondes utilisées pour quantifier <i>PLAGL1</i> en puce Agilent.....	250
Figure 70 : niveau d'expression de l'ARNm de <i>PLAGL1</i> (en log ₂) dans les différents types de sarcomes étudiés.....	250

Figure 71 : corrélation entre l'expression du transcrit <i>PLAGLI</i> et les remaniements génomiques du 6q24-q25 dans A : les sarcomes, B : les GIST (entre les deux lignes rouges se situe la zone de non remaniement)	252
Figure 72 : l'expression de l'ARNm de <i>PLAGLI</i> est significativement différente en fonction : A : du grade dans les LMS, B : de la différenciation tumorale dans les LMS, C : de la survenue de métastase dans les US, D : de la récurrence locale dans les US.	252
Figure 73 : représentation schématique de l'îlot CpG P1 du gène <i>PLAGLI</i> , les barres noires représentent les 118 CpG et leur répartition au sein de l'îlot.....	254
Figure 74 : représentation de l'îlot CpG du promoteur de <i>PLAGLI</i> et de la stratégie mise en œuvre pour l'étude de la méthylation au pyroséquenceur	254
Figure 75 : Effet de la congélation/décongélation des échantillons sur l'efficacité de la PCR	256
Figure 76 : exemple d'une PCR de l'amplicon 3 ayant une efficacité variable en fonction de la tumeur considérée	256
Figure 77 : pourcentage de méthylation des 118CpG du promoteur de <i>PLAGLI</i> dans les quatre lignées de sarcome (en vert : MFH148, en rose : MFH128, en violet : LPS80 et en bleu : LPS78).....	260
Figure 78 : corrélation entre l'expression de <i>PLAGLI</i> et le pourcentage de méthylation calculé sur l'ensemble des CpG du promoteur de <i>PLAGLI</i> , dans les lignées MFH148 (rouge), MFH128 (vert), LPS78 (jaune) et LPS80 (orange).....	260
Figure 79 : corrélation entre l'expression de <i>PLAGLI</i> et le pourcentage de méthylation calculé sur les CpG significatifs du promoteur de <i>PLAGLI</i> (même code couleur que précédemment)	262
Figure 80 : pourcentage de méthylation des positions les plus corrélées à l'expression de <i>PLAGLI</i>	262
Figure 81 : profil de méthylation des tumeurs MFH148 et MFH128	262
Figure 82 : comparaison entre les profils de méthylation de la tumeur MFH148 (vert foncé) et de la lignée MFH148 (vert clair).....	262
Figure 83 : comparaison entre les profils de méthylation de la tumeur MFH128 (rose foncé) et de la lignée MFH128 (rose clair)	262
Figure 84 : profils de méthylation obtenus pour toutes les tumeurs par groupe, A : LMS, B : US, C : LPS, D : GIST	264
Figure 85 : exemple du profil de méthylation obtenu pour trois tumeurs de chaque groupe, A : LMS, B : US, C : LPS, D : GIST	264

Figure 86 : profils de méthylation des quatre groupes tumoraux de sarcomes	266
Figure 87 : profil de méthylation des fibroblastes IA482B.....	266
Figure 88 : mise en évidence des CpG différentiellement méthylés entre les quatre types de sarcomes et les fibroblastes	266
Figure 89 : mise en évidence des CpG spécifiques de chaque type de sarcomes	268
Figure 90 : corrélation entre le pourcentage de méthylation globale et l'expression de <i>PLAGL1</i>	270
Figure 91 : corrélation entre le pourcentage de méthylation globale et l'expression de l'ARNm de <i>PLAGL1</i> dans les LPS (A), les GIST (B), les US (C) et les LMS (D).....	270
Figure 92 : corrélation entre le pourcentage de méthylation des positions significatives et l'ARNm de <i>PLAGL1</i> dans les GIST (A), les LPS (B), les LMS (C) et les US (D).....	270
Figure 93 : corrélation positive (A) et négative (B) des CpG avec l'ARNm de <i>PLAGL1</i> dans les US	272
Figure 94 : corrélation entre l'expression de <i>PLAGL1</i> et la moyenne de méthylation des CpG non significatifs dans les LPS	274
Figure 95 : corrélation entre l'expression de <i>PLAGL1</i> et la moyenne de méthylation des CpG non significatifs dans les GIST	274
Figure 96 : CpG corrélés à la fois à l'expression de <i>PLAGL1</i> et à un ou plusieurs facteurs cliniques dans les LMS. CpG 33 corrélé à l'expression (A) et au grade (B) ;.....	276
Figure 97 : CpG corrélés à la fois à l'expression de <i>PLAGL1</i> et à un ou plusieurs facteurs cliniques dans les US. CpG 109 corrélé à l'expression (A), au grade (B) et à la récurrence locale (C), CpG 107 corrélé à l'expression (D), à survie globale (E) et à la métastase (F) ...	278
Figure 98 : A : pourcentage de méthylation du CpG 95 en fonction de la classification de Miettinen dans les GIST ; B : survie globale en fonction du niveau de méthylation du CpG 19 dans les LMS	280
Figure 99 : exemple d'étude de la méthylation d' <i>IGSF4</i> par MSP et séquençage (Röhrs et al., 2009).....	302
Figure 100: corrélation entre le pourcentage de méthylation globale et l'expression de <i>PLAGL1</i>	310
Figure 101 : modèle d'interaction entre deux gènes situés sur deux chromosomes différents	320
Figure 102 : immunofluorescence sur HeLa non transfectées (A) ou transfectées avec pRK7-ZAC (B). Marquage de <i>PLAGL1</i> en vert et des noyaux au Hoechst 33258.....	334

Figure 103: expression de la protéine PLAGL1 (en vert) dans les cellules : A : MFH128, B : MFH148, C : LPS78, D : LPS80, E : HeLa transfectées avec pRK7-ZAC, noyaux des cellules marqués au Hoechst 33258 (en bleu)	336
Figure 104 : validation de l'anticorps anti-PLAGL1 en western blot, expression de la protéine PLAGL1 dans les cellules HeLa transfectées avec pRK7-ZAC et dans les cellules HeLa non transfectées (marquage de l'actine a été utilisé comme témoin de charge)	336
Figure 105: expression de la protéine PLAGL1 dans les lignées de sarcomes visualisée par western-blot.....	336
Figure 106: schéma récapitulatif et hypothèses de travail	340
Figure 107 : immunofluorescence, marquage de PLAGL1 dans les LPS78 (A) non traitées et dans les LPS78 traitées 24h au MG123 à 5µM (B).....	340
Figure 108: visualisation des produits de RT-PCR sur gel d'agarose mettant en évidence l'amplification des deux isoformes d'ARNm de PLAGL1 dans les MFH128 (A), les MFH148 (B), les LPS78 (C) et les LPS80 (D)	340
Figure 109: comparaison des séquences protéiques de PLAGL1 sauvage et de PLAGL1 traduite dans les LPS78	342
Figure 110 : principe du test en cytométrie permettant de quantifier la capacité de certains microRNA à se fixer au 3'UTR de PLAGL1	348
Figure 111 : différence de fluorescence de l'EGFP après ajout du 3'UTR de PLAGL1	348
Figure 112 : principe du test en cytométrie permettant de quantifier la capacité de certains microRNA à se fixer au 3'UTR de <i>PLAGL1</i> avec ajout des microRNA d'intérêt.....	348
Figure 113 : calcul de l'efficacité des amorces utilisées pour la qRT-PCR des microRNA, A : amorce mir15a, B : amorce mir15b, C : amorce mir16, D : amorce 424, E : amorce rnu1a1, F : amorce snoRA73a	350
Figure 114 : A : gel de migration des produits de qPCR sur microRNA, B : quantification des microRNA dans les HeLa par qRT-PCR	350
Figure 115: résultats de qRT-PCR montrant l'augmentation de la quantité des microRNA suite à leur transfection dans les cellules HeLa, un microRNA est transfecté dans les HeLa puis tous les microRNA étudiés sont quantifiés pour vérifier la spécificité de la détection	352
Figure 116: moyenne de fluorescence des HeLa transfectées avec pEGFP-C3 et un microRNA à 5 nM (A), 10 nM (B), 20 nM (C), et 30 nM (D) pendant 24h.....	354

Figure 117: variations de fluorescence observées dans les HeLa co-transfectées avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1 et un microRNA à 5 nM (A), 10 nM (B), 20 nM (C), et 30 nM (D) pendant 24 h.....	354
Figure 118: représentation schématique du 3'UTR de PLAGL1 avec la localisation des deux sites de fixation des microRNA d'intérêt.....	356
Figure 119 : variations de fluorescence observées dans les HeLa co-transfectées avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir1 et un microRNA à 5 nM (A), 10 nM (B), 20 nM (C), et 30 nM (D) pendant 24 h.	356
Figure 120 : variations de fluorescence observées dans les HeLa co-transfectées avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir2 et un microRNA à 5 nM (A), 10 nM (B), 20 nM (C), et 30 nM (D) pendant 24 h.	358
Figure 121 : variations de fluorescence observées dans les HeLa co-transfectées avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1- mir1+2 et un microRNA à 5 nM (A), 10 nM (B), 20 nM (C), et 30 nM (D) pendant 24 h.	358
Figure 122: quantification des microRNA d'intérêt et des gènes de ménage dans les lignées MFH128, LPS78 et LPS80 par qRT-PCR	360
Figure 123 : expression relative des quatre microRNA d'intérêt dans les lignées LPS78 et LPS80 par rapport à la lignée MFH128 (calcul basé sur l'équation $2^{-\Delta\Delta Ct}$, cf. Équation 2, page 198) à partir des résultats de la Figure 122	360
Figure 124: quantifications par qRT-PCR de tous les microRNA suite à la transfection d'un microRNA dans les cellules MFH128 afin de vérifier la spécificité de l'amplification.....	362
Figure 125: variation de l'expression de la protéine PLAGL1 suite à la transfection des quatre microRNA à 5 nM (A), 10 nM (B) et 20 nM (C) pendant 24 h.....	364
Figure 126 : résultats des qRT-PCR montrant la diminution de la quantité des microRNA suite à la transfection de leur anti-microRNA correspondant dans les cellules LPS78	366
Figure 127: résultats des qRT-PCR montrant la diminution de la quantité des microRNA suite à la transfection de leur anti-microRNA correspondant dans les cellules LPS80.....	368
Figure 128: quantification de l'expression protéique de PLAGL1 par cytométrie des LPS78 transfectées avec 50 nM (A) et 100 nM (B) d'anti-microRNA pendant 24 h.....	370
Figure 129: quantification de l'expression protéique de PLAGL1 par cytométrie des LPS80 transfectées avec 50 nM (A) et 100 nM (B) d'anti-microRNA pendant 24 h.....	370

Figure 130 : cytométrie en flux : mesure de l'apoptose induite par la transfection de pTRACER-PLAGL1-46 ou pTRACER-PLAGL1-51 dans des HeLa pendant 24 h (A) ou 48 h (B).....	372
Figure 131 : western blot : activation des caspases 3 et 7 suite à la transfection de HeLa pendant 24 h avec pRK7-ZAC	374
Figure 132: diminution de l'expression de certains gènes cibles de PLAGL1 suite à l'ajout des microRNA 15a (A), 15b (B), 16 (C) ou 424 (D).....	376
Figure 133 : alignement des séquences protéiques des trois membres de la famille PLAG (Kas et al., 1998).....	382
Tableau 1 : exemple de gènes dont le statut de méthylation est corrélé avec la réponse aux traitements chimiothérapeutiques dans certains cancers	66
Tableau 2 : différences de structure de l'ADN et des protéines associées en fonction du niveau de compaction de la chromatine	82
Tableau 3 : gènes du 6q ayant un îlot CpG susceptible d'être méthylé (Tessem et al., 2008)	142
Tableau 4 : amorces utilisées pour le clonage de la phase codante de PLAGL1 (clon PLAGL1 rv2 fw2) et de la région 3'UTR de PLAGL1 (UTR PLAGL1 rv fw)	180
Tableau 5: réactifs nécessaire à la réaction de PCR pour le clonage	182
Tableau 6: descriptif des réactifs nécessaire à la réaction de ligation.....	186
Tableau 7 : amorces utilisées pour la mutagenèse des sites de fixation des microRNA sur le 3'UTR de PLAGL1	190
Tableau 8 : mélange réactionnel utilisé pour la mutagenèse dirigée.....	190
Tableau 9 : étapes de la PCR servant pour la mutagenèse dirigée	190
Tableau 10 : volumes de réactifs nécessaire à la transfection par Exgen de cellules en fonction du type de plaques de culture utilisées	190
Tableau 11 : volumes de réactifs nécessaire à la transfection par lipofectamine de cellules en fonction du type de plaques de culture utilisées.....	192
Tableau 12: préparation de la réaction de transcription inverse pour les ARNm	196
Tableau 13: préparation de la réaction de transcription inverse pour les microRNA	196
Tableau 14 : récapitulatif des amorces utilisées pour les qRT-PCR servant à quantifier les ARNm	198

Tableau 15: cycles de qPCR.....	200
Tableau 16:Anticorps utilisés pour l’immunocytofluorescence.....	206
Tableau 17 : statistiques des paramètres mesurés: moyenne, médiane et moyenne géométrique de fluorescence et le pourcentage de cellules fluorescentes.....	214
Tableau 18: composition du gel de concentration à 5 %	220
Tableau 19: composition du gel de migration à 10 %	220
Tableau 20 : liste des anticorps utilisés pour les expériences de Western blot.....	222
Tableau 21: techniques d'analyses de méthylation de l'ADN (d’après (Brena et al., 2006))	224
Tableau 22 : étapes du traitement de l’ADN au bisulfite de sodium	226
Tableau 23: déroulement de la réaction de PCR	228
Tableau 24: mélange réactionnel de PCR	230
Tableau 25 : remaniements génomiques de la région chromosomique de <i>PLAGL1</i> mesurés par CGH array dans les lignées de sarcomes	246
Tableau 26 : remaniements génomiques de la région chromosomique de <i>PLAGL1</i> mesurés par CGH array dans les tumeurs de sarcomes	246
Tableau 27 : niveau d’expression de <i>PLAGL1</i> dans les lignées de sarcomes, ARNm quantifié par puce Affymetrix	248
Tableau 28 : niveau d’expression de <i>PLAGL1</i> dans les tumeurs de sarcomes, ARNm quantifié par puce Affymetrix pour les LMS, US, LPS et par puce Agilent pour les GIST	250
Tableau 29 : tableau récapitulatif des amorces de PCR et de séquençage utilisées pour l'analyse de méthylation du promoteur de <i>PLAGL1</i> par pyroséquençage.....	258
Tableau 30 : comparaison du pourcentage de méthylation globale et de l'expression de <i>PLAGL1</i> dans les lignées de sarcome	260
Tableau 31 : CpG corrélés à l’expression de <i>PLAGL1</i> dans les GIST.....	272
Tableau 32 : CpG corrélés à l’expression de <i>PLAGL1</i> (respectivement) dans les US, LMS et LPS	272
Tableau 33 : facteurs de transcription susceptibles de se fixer aux CpG significativement corrélés à l’expression de <i>PLAGL1</i>	274
Tableau 34 : récapitulatif des CpG corrélés à un ou plusieurs facteurs cliniques dans les US	280
Tableau 35 : récapitulatif des facteurs de transcription pouvant potentiellement se fixer aux CpG corrélés à un ou plusieurs facteurs cliniques	282

Tableau 36 : tableau récapitulatif des données obtenues sur les lignées de sarcomes, le tissu mammaire et placentaire, ainsi que sur deux GIST et un LPS. Immunofluorescence : marquage PLAGL1 en vert et marquage des noyaux en bleu- Hoeschst. Immunocytochimie : marquage PLAGL1 en DAB	338
Tableau 37 : récapitulatif des microRNA pouvant théoriquement se fixer au 3'UTR de PLAGL1 obtenu auprès de plusieurs bases de données, leur séquence, leurs cibles connues faisant partie de la famille de PLAGL1 et leur locus dans le génome humain	346
Tableau 38 quantification des microRNA suite à leur transfection dans les HeLa.....	352
Tableau 39 : quantification des microRNA suite à leurs transfection dans les MFH128	362
Tableau 40 : quantification des microRNA suite à la transfection d'anti-microRNA dans les LPS78	366
Tableau 41 : quantification des microRNA suite à la transfection d'anti-microRNA dans les LPS80	368

Etude de la régulation de l'expression de PLAGL1 par des mécanismes épigénétiques dans les sarcomes

PLAGL1 est un gène soumis à l'empreinte parentale qui code pour une protéine impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. *PLAGL1* est donc soupçonné d'être un gène suppresseur de tumeur localisé en 6q24-25, une région fréquemment délétée dans les cancers. De précédentes études menées sur des cancers d'origine épithéliale ont mis en évidence la perte d'expression du gène *PLAGL1*, soit par perte d'hétérozygotie, soit par méthylation des deux allèles du gène. Néanmoins, les mécanismes de régulation de l'expression de *PLAGL1* restent encore mal connus.

Peu de choses sont connues sur l'étiologie des sarcomes, sauf qu'ils présentent de nombreux remaniements chromosomiques, y compris dans la région contenant le gène *PLAGL1*. Compte-tenu du rôle connu de *PLAGL1*, notre objectif a été d'étudier dans les sarcomes : 1) son profil d'expression et son impact dans la physio-pathologie de ces cancers et 2) de caractériser ses mécanismes de régulation épigénétique, comme la méthylation de son promoteur et son éventuelle régulation par des microRNA.

Ainsi nous montrons que 1) *PLAGL1* est différentiellement exprimé selon le type de sarcome considéré, 2) le niveau d'expression de l'ARNm de *PLAGL1* peut être un outil diagnostique et/ou pronostique dans ce type de cancer. Nous avons également mis en évidence pour la première fois, 3) que seuls certains CpG du promoteur de *PLAGL1* conditionnaient sa transcription et 4) que le niveau de méthylation de certains CpG du promoteur de *PLAGL1* pouvait être utilisé comme outil diagnostique ou pronostique. Pour finir, nous avons montré l'existence d'une régulation épigénétique de *PLAGL1* par certains microRNA (15a, 15b, 16 et 424) dans les sarcomes.

Mots clés : PLAGL1, épigénétique, méthylation de l'ADN, microRNA, sarcomes

Regulation of PLAGL1 expression by epigenetic mechanisms in sarcomas

PLAGL1 gene is an imprinting gene, expressed only from the paternal allele in normal tissues, which codes for a protein inducing G1 cell cycle arrest and apoptosis suggesting that it could be the tumor suppressor gene of the 6q24-25 chromosomal region. Several studies have shown its loss of expression in some epithelial cancers, which was due to epigenetic alterations like: lost of heterozygosity or promoter hypermethylation. Nevertheless, regulation mechanisms of *PLAGL1* expression are still elusive.

The etiology of sarcomas is still poorly understood. However, they are characterized by lot of chromosomal alterations including the chromosomal region of *PLAGL1*. Given the role of *PLAGL1*, our aims were to study in sarcomas 1) the *PLAGL1* expression profile and its clinico-pathological impact in these cancers, and 2) the epigenetic regulations of *PLAGL1* such as, its promoter methylation and its possible regulation by microRNA.

Our results show that: 1) *PLAGL1* is differentially expressed according to sarcoma sub-type; 2) *PLAGL1* mRNA expression could be a good diagnosis or prognosis tool in sarcoma. In addition, we demonstrate for the first time that 3) only few CpG sites are relevant for *PLAGL1* mRNA expression and 4) methylation level of some CpG could be use as new diagnosis or prognosis factor. Moreover, we highlight a new epigenetic mechanism of *PLAGL1* regulation by microRNA (15a, 15b, 16 and 424) in sarcomas.

Keywords: PLAGL1, epigenetic, DNA methylation, microRNA, sarcomas

Introduction bibliographique

.1 Régulation de l'expression génique par un mécanisme épigénétique : Modification de l'ADN et de ses protéines associées

.1.1 Méthylation de l'ADN

.1.1.1 Principe

La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique qui consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur une ou plusieurs bases de l'ADN.

Chez les procaryotes, plusieurs bases différentes peuvent être méthylées. L'adénine et la cytosine sont les deux bases les plus fréquemment méthylées. Chez les procaryotes, l'effet de la méthylation diffère en fonction de la base considérée. En effet, l'adénine méthylée joue un rôle dans les mécanismes de réparation comme lors de mésappariements, et sert également dans l'initiation de la réplication de l'ADN. La présence du groupement méthyle sur l'adénine permet aussi l'activation de la transcription (Falnes and Rognes, 2003). Une adénine peut être méthylée lorsqu'elle appartient à un motif de type : 5'GATC 3'. La méthylation de la cytosine dans les bactéries sert à protéger l'ADN bactérien des clivages par ses propres enzymes de restriction.

Chez les eucaryotes supérieurs, les sites méthylés ainsi que leurs fonctions sont différents de ceux des procaryotes. Concernant les plantes, seule la cytosine peut être méthylée mais les ADN méthylases reconnaissent deux sites particuliers : CpG et CpNpG. La méthylation de ces sites joue un rôle dans l'inactivation des éléments transposables, des allèles parentaux et des transgènes.

Chez les mammifères, la méthylation se fait **exclusivement sur une cytosine** lorsqu'elle est placée en amont d'une guanine. Toutes les cytosines de l'ADN ne sont pas susceptibles d'être méthylées. En effet, chez l'adulte cette modification de bases ne se produit que sur les

dinucléotides CpG contenus dans les **îlots CpG**, sauf dans les cellules embryonnaires où une méthylation des cytosines n'appartenant pas aux dinucléotides CpG est possible (Dodge et al., 2002). Dans les cellules somatiques normales de mammifère, le contenu en CG est de 40-45 % mais les dinucléotides CpG représentent seulement 1 à 4% du génome entier.

Entre 60 à 90 % des CpG de l'ADN sont méthylés (Espada and Esteller, 2009), les cytosines méthylées représentent donc 0,75 à 1 % des nucléotides totaux et 4 à 6% des cytosines sont méthylées.

.1.1.2 Les îlots CpG : définition et localisation

Les îlots CpG sont des régions contenant une grande densité de dinucléotides CpG souvent retrouvés au niveau des régions promotrices des gènes. De 40 à 50 % des gènes possèdent un ou plusieurs îlots CpG (Costello and Plass, 2001) ; (Espada and Esteller, 2009). Ces îlots sont concentrés dans les régions promotrices ou dans le premier exon des gènes, les autres régions comme les introns et les autres exons sont généralement pauvres en CpG (Robertson KD, 2000).

Pour être défini comme un îlot CpG, une séquence doit faire au moins 500 pb et avoir un contenu en CG supérieur à 55 % et un ratio CpG observé sur CpG aléatoire au moins égal à 0,62.

Les CpG méthylés sont principalement retrouvés au niveau de séquences répétées comme les séquences satellites : alphasat DNA et la famille Sau3A et les séquences des familles LINES (LINE-1 et LINE-2) et SINES (Alu et Mir) ainsi que des éléments parasites (rétrovirus, transposons) (Yoder et al., 1997). Mais également dans les promoteurs de certains gènes de suppresseurs de tumeur ou d'oncogènes. La méthylation de leurs îlots va engendrer une **répression de la transcription** de ces gènes, ce qui a des conséquences importantes dans les phénomènes de cancérisation (Nakao, 2001) mais également dans certaines pathologies psychiatriques comme la schizophrénie ou le syndrome de Rett (Feng and Fan, 2009).

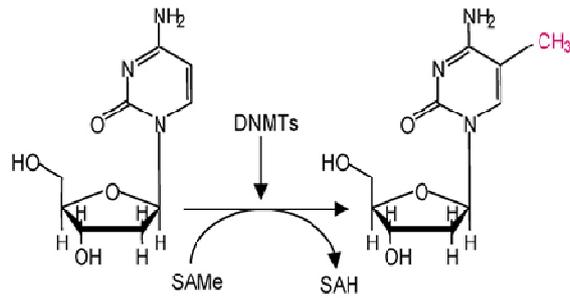


Figure 1 : méthylation de la position 5 d'une cytosine par DNMT (d'après Espada and Esteller, 2009) qui utilise la S-adenosyl-L- méthionine (SAMe) comme donneur de méthyle, ce qui provoque la libération de S-adenosyl homocysteine (SAH).

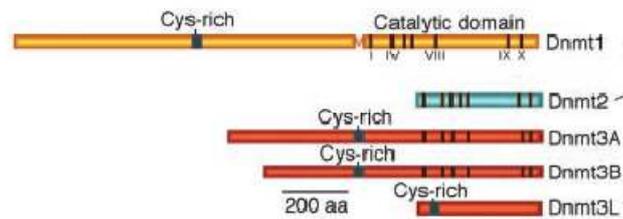


Figure 2 : séquence peptidique des enzymes de la famille des DNMT (d'après Bourc'his et al., 2001)

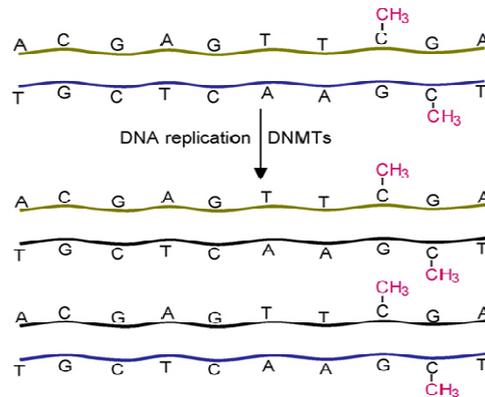


Figure 3 : maintien de la méthylation de l'ADN par DNMT1 (d'après Espada and Esteller, 2009)

.1.1.3 Méthyltransferases

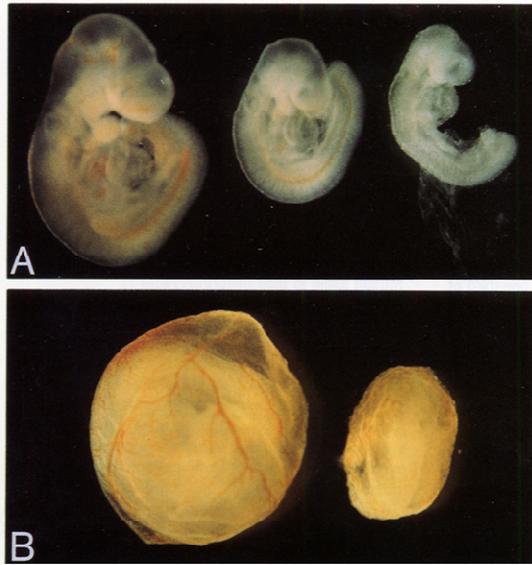
La méthylation des CpG est un processus important dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Ce mécanisme est catalysé par une famille d'enzymes, les méthyltransferases, regroupant 5 membres (DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L) (Figure 2). Ces enzymes transfèrent un groupement méthyle provenant de la S-adénosylméthionine sur une cytosine de l'ADN qui est suivie d'une guanine (Figure 1). Cette nouvelle base s'appelle 5-méthylcytosine (Bestor, 2000). La S-adénosylméthionine est une coenzyme nécessaire à la croissance cellulaire et impliquée dans la biogenèse de métabolites essentiels comme les polyamines, certaines hormones et des neurotransmetteurs (Figure 1).

En 1992 et 1999, Li E et Okano M. ont muté les gènes codant pour certaines *Dnmt* (1 ou 3a et 3b) dans des cellules embryonnaires de souris. Les cellules homozygotes pour la mutation inactivatrice d'une méthyltransferase ont ensuite été implantées chez des souris et l'effet de cette perte d'expression a été observé sur le développement embryonnaire. Ces souris avaient un développement anormal *in utero* aboutissant à une létalité de l'embryon (Figure 4). Ces travaux ont permis de montrer que la méthylation de l'ADN est un processus indispensable au développement embryonnaire (Bestor, 2000), (Li E et al., 1992) .

Des études *in vitro* ont démontré que, dans les cellules saines et cancéreuses humaines, l'absence du gène *DNMT1* provoque une hypométhylation globale et la mort cellulaire, confirmant donc le rôle primordial de la méthylation de l'ADN dans l'homéostasie cellulaire (Brown and Robertson, 2007), (Chen et al., 2007).

La première méthyltransferase découverte a été la méthyltransferase 1 (DNMT1). La DNMT1 est la plus abondante des DNMT dans les cellules somatiques. C'est une protéine d'environ 180KDa dont la principale fonction est le maintien de la méthylation au cours des divisions cellulaires (Figure 3). Cette protéine est constituée de deux domaines, un domaine régulateur de 120KDa contenant un sous-domaine riche en cystéine, relié à un domaine catalytique par une répétition de glycine et de lysine.

Lors d'une division cellulaire, les sites CpG méthylés deviennent hémiméthylés puisque le site CpG sur le brin néosynthétisé n'est pas méthylé comparativement au brin parental. Cette région palindromique du CpG hémiméthylé est reconnue par DNMT1 qui méthyle le brin nouvellement formé. Cela permet de conserver la méthylation au cours des divisions



**Figure 4 : anomalies de développement chez des souris sauvage (gauche) et mutées pour DNMT1 (droite),
A : anomalie de l'embryon, B : anomalie du sac vitellin (Li E et al., 1992)**

cellulaires (Robertson et al., 1999), (Pradhan and Esteve, 2003). DNMT1 a 5 à 30 fois plus d'affinité pour les sites hémiméthylés que pour les sites non méthylés (Costello and Plass, 2001), (Bestor, 2000).

La deuxième méthyltransferase est DNMT2. Elle a été découverte par homologie de séquence avec DNMT1, c'est la moins connue de toutes les ADN méthyltransferases, mais c'est pourtant la plus conservée au cours de l'évolution puisque on la retrouve chez les protistes, les végétaux, les champignons et les animaux ce qui suggère un rôle important de cette protéine dans tous ces organismes. Pourtant, l'absence de DNMT2 dans les souris knock-out pour ce gène a très peu d'effet sur le profil de méthylation de l'ADN et il ne semble pas que cette enzyme participe à la méthylation *de novo* telle qu'observée dans les cancers (Saito and Berk, 2001). Cependant, on note une différence dans la structure des centromères pour les souris KO pour ce gène (Bestor, 2000). En 2001, une équipe a découvert que l'ARNm de *dnmt2* est fortement diminué dans les cancers colorectaux et gastriques mais les conséquences de cette diminution d'expression reste encore méconnues (Kanai et al., 2001), (Hermann et al., 2004).

La dernière classe de méthyltransferases regroupe trois enzymes (DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L) très homologues. Les DNMT3A et DNMT3B sont deux enzymes structurellement et fonctionnellement très semblables. Ces deux enzymes, contrairement à la DNMT1, n'ont pas de spécificité pour les sites hémiméthylés mais elles ont une légère préférence pour les sites non-méthylés (Yokochi and Robertson, 2002). Ces deux enzymes sont très exprimées dans les cellules embryonnaires, les cellules indifférenciées et au moment de l'implantation embryonnaire. Elles jouent un rôle important dans le développement embryonnaire et le contrôle de la méthylation *de novo* (Robertson et al., 1999). Pourtant, il est important de noter que plusieurs études mettent en évidence la fonction de méthylase *de novo* de DNMT1 tout comme DNMT3A et DNMT3B (Rhee et al., 2002). Ces trois enzymes DNMT3 sont des inhibiteurs de la transcription puisque qu'il a été montré qu'elles pouvaient lier l'histone déacétylase 1 (HDAC1) et participer à la déacétylation des queues d'histones impliquée dans l'inhibition de la transcription (Deplus et al., 2002).

La DNMT3B est impliquée en pathologie, la perte d'expression de DNMT3B serait responsable du syndrome ICF (immunodéficience, instabilité des centromères, anomalies faciales) caractérisé, entre autres, par une hypométhylation des séquences satellites péri-centromériques (Maraschio et al., 1988).

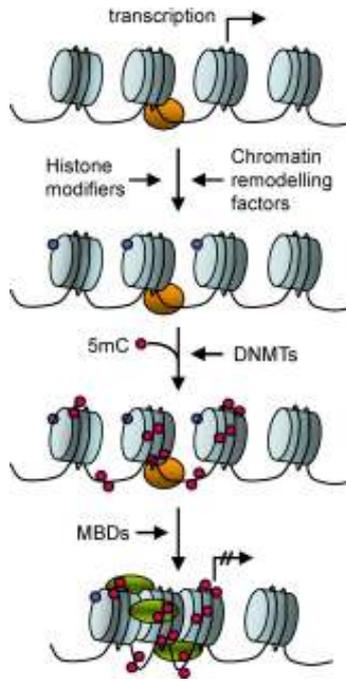


Figure 5 : compaction de la chromatine en réponse à la méthylation de l'ADN

De récentes études ont démontré que DNMT3L interagissait avec les deux autres isoformes DNMT3, plus particulièrement DNMT3A, pour la régulation de la méthylation *de novo* dans la phase embryonnaire (Chedin et al., 2002), (Hata et al., 2002), (Suetake et al., 2004). De plus chez les souris, il a été montré que la perte d'expression de DNMT3L causait un défaut d'empreinte maternelle et une stérilité chez les mâles (Hata et al., 2006), confirmant son rôle dans les mécanismes d'empreinte maternelle durant l'embryogenèse, rôle qu'elle exerce de façon indépendante de son activité méthyltransferase (Bourc'his et al., 2001).

.1.1.4 Fonctions de la méthylation

La méthylation de l'ADN est impliquée dans plusieurs fonctions essentielles à l'intégrité d'une cellule eucaryote et dans sa physiologie normale. Elle joue un rôle important dans : la stabilité chromosomique et dans la structure de la chromatine (Robertson, 2002), dans l'inactivation des gènes soumis à l'empreinte parentale, dans l'inactivation des éléments transposables (Herman and Baylin, 2003) et dans l'inactivation du chromosome X chez la femme (Jaenisch and Bird, 2003).

En effet, l'hyperméthylation de certains promoteurs a lieu de façon physiologique dans certaines cellules pour inactiver des gènes tissus spécifiques ou des gènes du développement. Mais elle peut aussi avoir lieu dans toutes les cellules d'un organisme, comme lors de l'inactivation du chromosome X chez la femme (Grant and Chapman, 1988), (Gartler and Riggs, 1983), (Riggs, 2002).

Dans des conditions physiologiques, **la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans la répression de la transcription en compactant l'ADN** (Figure 5) (Attwood et al., 2002). En effet, la méthylation de l'ADN permet le recrutement de protéines particulières, liant spécifiquement l'ADN méthylé. Ces protéines recrutent à leur tour des protéines de modification des histones permettant la **compaction de l'ADN**. Ainsi, la méthylation de l'ADN est étroitement liée à la transition de la structure en collier de perle de la chromatine (10 nm de diamètre, fruit de multiples modifications des histones, qui seront discutées plus tard) au niveau supérieur de compaction (30 nm de diamètre encore appelé forme solénoïde). Ce changement conformationnel de la chromatine est généralement associé à une inhibition de l'expression des gènes (Klose and Bird, 2006) ; (Bird and Wolffe, 1999) ; (Jaenisch and Bird, 2003).

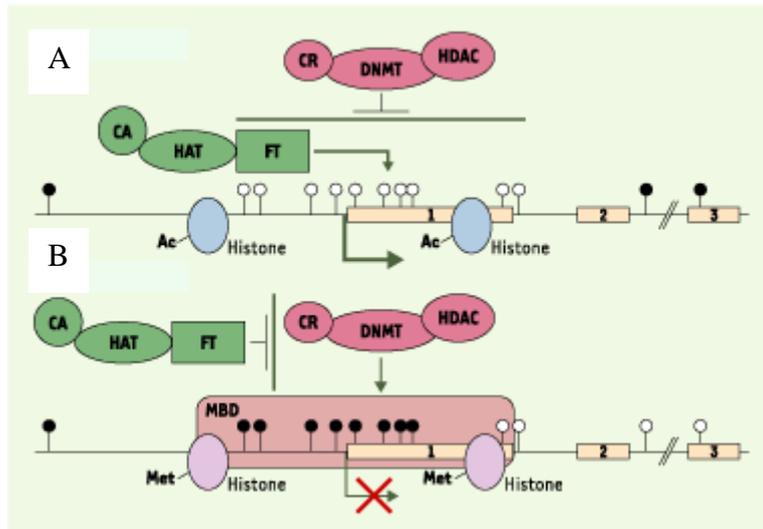


Figure 6 : régulation de la transcription par méthylation de l'ADN (Deltour et al., 2005)

A : ADN non méthylé, pas de liaison des protéines de compaction de la chromatine, liaison des facteurs de transcription (FT) et transcription du gène, B : ADN méthylé, liaison des protéines de compaction de la chromatine (MBD, HDAC), pas de liaison des facteurs de transcription (FT), d'où une répression de la transcription du gène

Il existe trois familles de protéines liant les cytosines méthylées et faisant l'interphase entre l'ADN méthylé et la chromatine (Nan and Bird, 2001) : les protéines à domaine MBD pour Methyl CpG Binding Domain (MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 et MBD4), les protéines à doigts de zinc de la famille Kaiso (ZBTB4 et ZBTB38) et deux protéines à domaine SRA pour SET and RING-finger associated (UHRF1 et UHRF2). Ces différentes protéines se lient à l'ADN méthylé et induisent une répression de la transcription par recrutement d'histones déacétylases et méthylases qui condensent la chromatine et la rendent inaccessible aux facteurs de transcription (Kass et al., 1997). Ainsi, MeCP2 interagit avec un corépresseur Sin3 homologue A (Sin3A) et recrute le complexe HDAC1 (Nan et al., 1998), (Jones et al., 1998). MeCP2 peut également interagir directement avec la machinerie de transcription pour réprimer l'expression des gènes hyperméthylés (Kaludov and Wolffe, 2000). Les protéines de liaison à l'ADN répriment également la transcription en masquant les sites de liaison à des facteurs de transcription dont la séquence de liaison à l'ADN contient un ou plusieurs motifs CpG (Yu et al., 2000) (Klose and Bird, 2006). Cela a été montré pour c-myc, CREB et E2F (Campanero et al., 2000), (Prendergast and Ziff, 1991), (Iguchi-Arigo and Schaffner, 1989) (Figure 6).

.1.1.5 Méthylation de l'ADN et pathologies

La méthylation de l'ADN peut également intervenir dans de multiples pathologies. Ainsi, la maladie ATR-X (Alpha thalassémie liée à l'X avec retard mental) est causée par des mutations dans le gène *ATR-X* codant pour une DNA hélicase (ayant un domaine identique aux DNMT3 suggérant une activité de remodelage de la chromatine) et provoque des changements dans le profil de méthylation des cellules (Gibbons et al., 1997), (De Sario, 2009). Le syndrome de Rett est un autre exemple de pathologie liée à une altération de la méthylation de l'ADN. Ce syndrome résulte de la mutation inactivatrice du gène codant pour MeCP2, qui interagit normalement avec les groupements méthyles de l'ADN et permet le recrutement des histones déacétylases (HDAC), ce qui permet la répression de la transcription. Dans le syndrome de Rett, certains gènes normalement réprimés par MeCP2 sont exprimés en raison de l'absence de MeCP2 (Paulsen and Ferguson-Smith, 2001). Par contre, dans les cancers notamment du sein, on note une surexpression de MeCP2 (Billard et al., 2002).

D'autres maladies arborant des profils anormaux de méthylation où des désordres d'empreintes parentales de méthylation ont été décrits comme le syndrome de Prader-Willi/Angelman, Beckwith/Wiedemann et également plusieurs cancers (Paulsen and Ferguson-Smith, 2001).

Une hyperméthylation des CpG de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs est fréquemment observée dans les cancers malgré une hypométhylation globale du génome causant son instabilité (Esteller, 2008). Environ 60 % des gènes ont un îlot CpG dans leur promoteur et il a été estimé que 1,4 % des CpG pouvaient avoir une méthylation anormalement élevée et que ce nombre pouvait atteindre 10 % lors du développement tumoral (Costello et al., 2000). Plusieurs études ont montré une hyperméthylation des gènes impliqués dans :

- l'arrêt du cycle cellulaire (*P16^{ink4a}* ou *CDKN2A*, *P15^{ink4b}* ou *CDKN2B*, *P14^{arf}*, *RB*, *PLAGL1*),
- l'apoptose (*DAPK1*, *RASSF1A*, *CASP8*, *TFRSF10C*, *TFRSF10D*, *PLAGL1*),
- la réparation de l'ADN (*MGMT*, *MLH1*)
- l'adhérence cellulaire et le remodelage tissulaire (*CDH1*, *CDH13*, *TIMP3*),

l'inhibition de la transcription de ces gènes conduit à une cancérisation cellulaire.

Cependant le type de gènes méthylés ainsi que leur fréquence de méthylation varie d'un type tumoral à l'autre (Esteller et al., 2001), (Michalowski et al., 2008). **L'hypométhylation globale du génome**, en touchant notamment des éléments répétés, entraîne une **instabilité** de celui-ci en favorisant des cassures de l'ADN et des recombinaisons. Des séquences satellites péricentromériques sont également hypométhylées causant des translocations qui peuvent être spécifiques d'un type de cancer, comme par exemple t(1;16) dans les tumeurs du rein principalement chez l'enfant appelées tumeurs de Wilms (néphroblastome) (Yeh et al., 2002). Mais l'hypométhylation touche également des oncogènes aboutissant à leur réexpression comme *HRAS*, *MAGE* (dans le mélanome), *S100A4* un gène associé à la formation de métastases (dans le cancer du côlon) et le gène du papillomavirus humain 16 (*HPV16*) (dans le cancer de l'utérus) (Esteller, 2008).

Les DNMT jouent un rôle prédominant dans la méthylation aberrante des promoteurs. Par exemple, plusieurs études ont démontré que ces enzymes, principalement les DNMT3a et DNMT3b responsables de la méthylation *de novo*, sont surexprimées dans les tumeurs par

rapport aux tissus normaux (Issa et al., 1993), (Robertson et al., 1999). Il a également été montré que la DNMT1 est une enzyme qui, lorsque son expression est augmentée dans un tissu normal, est capable d'induire une méthylation *de novo* et ainsi de provoquer la transformation cellulaire (Bakin and Curran, 1999).

Les méthyltransferases joueraient donc un rôle primordial dans l'oncogenèse et l'évolution des cellules cancéreuses.

.1.1.6 Applications cliniques de la méthylation

.1.1.6.1 Tests diagnostiques impliquant la méthylation

Dans les années 1940 Mandel et Metais (MANDEL and METAIS, 1948) ont été les premiers à découvrir des acides nucléiques extracellulaires dans le sérum humain. L'ADN est retrouvé dans la circulation des personnes saines, durant la grossesse, après un traumatisme ou après une transplantation (Tsang and Lo, 2007). L'ADN est aussi présent dans la circulation des personnes atteintes d'un cancer (Diehl et al., 2008). Chez ces patients, il a été estimé que 93 % de l'ADN circulant étaient issus d'une tumeur ou de métastases (Jahr et al., 2001). Il semble que cet ADN soit libéré durant la nécrose ou l'apoptose tumorale (Jahr et al., 2001). Cet ADN peut donc être facilement utilisé comme source de biomarqueurs circulants, plus facile à recueillir et à analyser que l'ARN ou les protéines (Cottrell and Laird, 2003).

Plusieurs études ont montré que la méthylation de l'ADN pouvait être utilisée comme biomarqueur dans de nombreux cancers (Herman, 2004) comme le cancer de la vessie (Dulaimi et al., 2004), (Hoque et al., 2006), de la prostate (Tokumaru et al., 2004), (Hoque et al., 2005) ou de l'ovaire (Ibanez de Caceres et al., 2004). Plusieurs études ont mis en évidence la possibilité de détecter l'hyperméthylation de certains gènes dans le sérum de patients atteints de cancer du colon pour les gènes *HMLH1* (homologue Mut L humain 1) et *P16^{INKaA}* (ou *CDKN2A*) (Grady et al., 2001) et du foie pour les gènes *P16^{INK4a}*, *P15^{INK4b}* (ou *CDKN2B*) et *RASSF1A* (Zhang et al., 2007).

De plus, ces études montrent que l'utilisation des techniques **d'analyse de méthylation de l'ADN permettrait d'anticiper et de détecter plus tôt la survenue d'un cancer** chez les

Agent chimiothérapeutique	Classe de médicament	Gène impliqué	Status de méthylation	pathologie	Réponse aux traitements	références
Carmusine	Agent alkylant	<i>MGMT</i> (O6-méthylguanine-DNA méthyltransferase)	hyperméthylé	gliome	+++	(Esteller et al., 2000) ; (Esteller and Herman, 2004)
Cyclophosphamide	Agent alkylant	<i>MGMT</i> (O6-méthylguanine-DNA méthyltransferase)	hyperméthylé	Lymphome diffus à grandes cellules B	+++	(Esteller et al., 2002)
Temozolomide	Agent alkylant	<i>MGMT</i> (O6-méthylguanine-DNA méthyltransferase)	hyperméthylé	gliome	+++	(Paz et al., 2004)
BCNU (1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea)	Agent alkylant	<i>MGMT</i> (O6-méthylguanine-DNA méthyltransferase)	hyperméthylé	gliome	+++	(Issa, 2007)
Methotrexate	Anti-métabolite	<i>RFC</i> (gène transporteur des folates réduits)	hyperméthylé	Lymphome du système nerveux central	---	(Ferreri et al., 2004)
Cisplatine et dérivés	Agent alkylant	<i>hMLH1</i> (homologue Mut L humain 1)	hyperméthylé	astrocytome	+++	(Plumb et al., 2000) ; (Fukushima et al., 2005)
Irinotecan	Inhibiteur de topoisomérase	<i>WRN</i> (Werner syndrome gene)	hyperméthylé	gliome	+++	(Esteller et al., 2000)
Taxol et dérivés	Poison du fuseau	<i>CHFR</i> (checkpoint with FHA and RING finger)	hyperméthylé	Cancers digestifs et oraux	+++	(Agrelo et al., 2006)
Cisplatine et dérivés	Agent alkylant	<i>P73</i>	hyperméthylé	Cancer du rein	+++	(Toyota et al., 2009)

Tableau 1 : exemple de gènes dont le statut de méthylation est corrélé avec la réponse aux traitements chimiothérapeutiques dans certains cancers

sujets à risque, comparé aux techniques classiques de dépistage. En effet, une étude sur le cancer du poumon montre qu'il est possible de détecter des anomalies de la méthylation de l'ADN 3 ans plus tôt que ne le font les dépistages classiques chez les fumeurs ou les personnes exposées à des carcinogènes (Palmisano et al., 2000). La détection d'anomalies de méthylation des gènes *P16^{ink4a}*, *P15^{INK4b}* (ou *CDKN2B*) et *Rassf1a* permet d'anticiper de 9 ans le diagnostic de cancer du foie (Zhang et al., 2007).

Par ailleurs, une étude menée par Hoque *et al.*, démontre une augmentation de la méthylation de certains gènes (*APC*, *GSTP1*, *RASSF1A*, et *RARB2*) en fonction du grade tumoral. Ainsi 33% des grades I/II, et 65 % des grades III/IV, montrent une hyperméthylation d'au moins un de ces quatre gènes (p=0.007) (Hoque et al., 2006).

La méthylation pourrait donc servir comme test diagnostique complémentaire mais également pour le suivi des patients en rémission du cancer afin de détecter rapidement les rechutes.

.1.1.6.2 Statut de méthylation et réponse à la chimiothérapie

La méthylation d'un gène donné peut influencer la réponse à la chimiothérapie (Tableau 1). Dans ce cadre, le gène le plus étudié est le gène de la O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase (*MGMT*) qui est responsable de la réparation des adduits alkyles sur la base guanine dans l'ADN. La perte d'expression du gène *MGMT* est associée à une augmentation de la sensibilité aux agents alkylants, notamment le cisplatine (Gerson, 2004).

D'autres gènes, inhibés par l'hyperméthylation dans une tumeur, peuvent prédire la réponse à la chimiothérapie (Issa, 2007), comme par exemple :

- le gène homologue Mut L humain 1 (*HMLH1*) (Plumb et al., 2000),
- le gène transporteur des folates réduits (*RFC*) (Ferreri et al., 2004),
- le gène *CHFR* (checkpoint with FHA and RING finger),
- le gène *WRN* (Werner syndrome gene) (Agrelo et al., 2006), (Esteller et al., 2000),
- le gène *TP73* un homologue de *TP53* (Toyota et al., 2009).

Ces exemples de gènes impliqués dans la réponse aux traitements, leur statut de méthylation et les réponses aux différentes drogues sont répertoriés dans le Tableau 1.

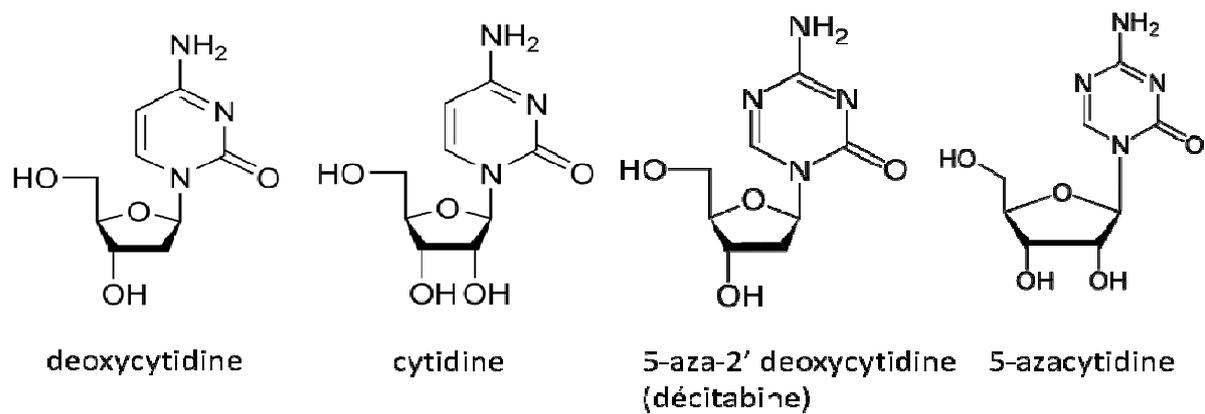


Figure 7 : formule chimique de la deoxycytidine, la cytidine, la 5-aza-2'deoxycytidine et de la 5-azacytidine

.1.1.6.3 Nouvelles approches thérapeutiques par les agents déméthylants

La méthylation de l'ADN est récemment apparue comme un processus primordial de l'oncogenèse. En effet, durant la cancérogenèse, on peut noter une hypométhylation globale du génome ce qui permet l'activation de gènes responsables d'une instabilité centromérique et d'éléments répétés. Mais parallèlement à cette hypométhylation du génome, certains promoteurs, généralement de gènes suppresseurs de tumeur, sont hyperméthylés, ce qui conduit à leur perte d'expression, favorisant ainsi le développement tumoral. La méthylation de l'ADN est donc devenue tout naturellement une cible des traitements anticancéreux.

Ainsi, des essais cliniques sont en cours avec des agents chimiothérapeutiques ciblant la méthylation de l'ADN. Les deux principaux agents en essai sont la 2'-déoxy-5-azacytidine (ou décitabine ou dacogen, MGI Pharma) ainsi que la 5-azacytidine (5AZC, ou Vidaza, Celgene), deux analogues de la cytosine (Figure 7).

La déoxycytidine est une cytosine couplée à un déoxyribose (atome H sur le carbone 2 du ribose), ce nucléoside est spécifique de l'ADN à la différence de la cytidine qui est une cytosine couplée à un ribose (groupement OH sur le carbone 2 du ribose) dans l'ARN.

La 5-azacytidine a été développée à partir de la cytarabine (agent antimétabolique). Elle s'intercale à la place de la cytidine dans l'ADN et l'ARN au moment de la réplication et de la transcription. La présence d'un azote supplémentaire sur le cycle de la cytosine empêche les DNMT d'agir et bloque ainsi la méthylation de l'ADN, mais son action n'est pas spécifique de l'ADN ou l'ARN. Ainsi, en s'insérant dans l'ARNm, la 5-azacytidine bloque le processus de traduction, bloque les cellules en phase S du cycle cellulaire et se montre très cytotoxique (Santini et al., 2001).

La 5-aza-2'deoxycytidine dérive de la deoxycytidine et est donc plus spécifique de l'ADN. Tout comme la 5-azacytidine, la présence d'un atome d'azote supplémentaire empêche la méthylation par les DNMT. L'effet cytotoxique sur l'ADN de la 5-aza-2'deoxycytidine et de la 5-azacytidine est également dû à la liaison covalente des DNMT au groupement Aza ajouté à la cytidine (Jüttermann et al., 1994).

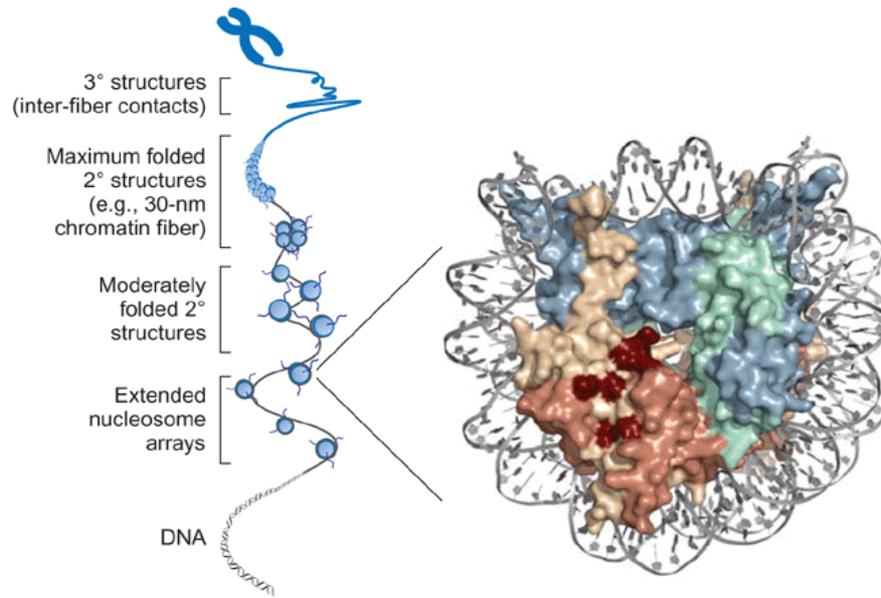


Figure 8 : compaction de l'ADN par liaison aux histones (Caterino and Hayes, 2007)

A droite, détail d'un nucléosome comprenant l'histone H2A (jaune), H2B (orange), H3 en bleue et H4 (vert)

En bloquant la méthylation, ces agents permettent la réexpression dans les tumeurs de certains gènes comme les gènes suppresseurs de tumeur et agissent donc sur la différenciation cellulaire, la réactivation de la transcription et la production de protéines (Attadia, 1993). Les résultats des études cliniques menées avec ces agents sont assez décevants pour les tumeurs solides (Santini et al., 2001). En revanche, les tumeurs hématopoïétiques comme les leucémies répondent beaucoup mieux à ces drogues. Plusieurs études cliniques de phase II confirment ces résultats (Steuber et al., 1996), (Willemze et al., 1997). La décitabine a permis d'obtenir une rémission chez les patients atteints du syndrome myélodysplasique (Van Den Bosch et al., 2004).

Le problème de ce type de traitement est sa faible spécificité. En effet, l'utilisation d'agents déméthylants permet la réexpression de certains gènes impliqués dans des voies anti-tumorales, mais peut également stimuler l'expression d'autres gènes qui pourraient être engagés dans des voies oncogéniques comme par exemple l'angiogenèse ou l'invasion cellulaire. De plus, ces agents déméthylants ne sont actifs que sur les cellules en prolifération et restent donc théoriquement inactifs sur les cellules hypo-proliférantes comme les cellules souches cancéreuses et pour l'instant leur utilisation reste surtout restreinte aux leucémies myéloïdes ou aux syndromes myélodysplasiques.

Aussi, ces molécules sont généralement associées aux chimiothérapies classiques ou à des inhibiteurs d'histone déacétylases (Vorinostat), protéines régulant l'état de condensation de l'ADN (Issa, 2007).

.1.2 Modifications des histones

Dans les noyaux des cellules, l'ADN n'est pas libre et relâché, mais lié à des protéines : les histones, qui dirigent et conditionnent la conformation et le degré de compaction de l'ADN (Figure 8). Les histones sont de petites protéines basiques formées d'un domaine globulaire hydrophobe composé de trois hélices α . Ces hélices permettent la dimerisation des histones. De part et d'autre de ces hélices se trouvent les extrémités N- et C-terminales sur lesquelles des modifications post-traductionnelles peuvent intervenir et moduler la liaison de ces protéines à l'ADN.

Il existe 5 histones différentes. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 s'organisent en octamère globulaire autour duquel 146 pb d'ADN vont s'enrouler pour former un nucléosome

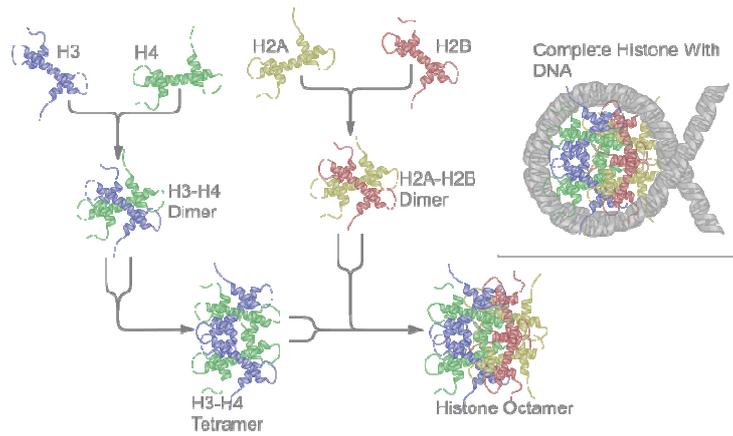


Figure 9 : structure octamerique des histones H2A, H2B, H3 et H4

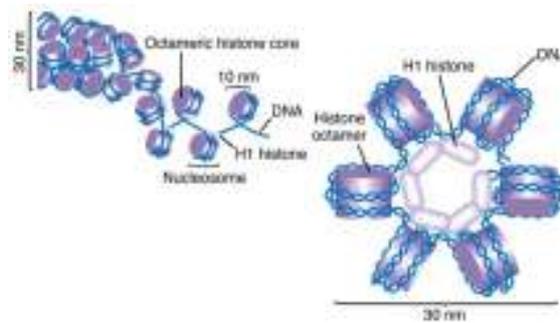


Figure 10 : organisation des nucléosomes autour de l'histone H1

(Figure 9) (Kornberg, 1974). L'organisation de l'ADN en nucléosome est appelée « collier de perle » et représente le premier niveau de compaction de l'ADN. La cinquième histone est l'histone H1 qui regroupe les nucléosomes autour d'elle, permettant une plus grande compaction de l'ADN (2^{ème} niveau de compaction) et rigidifiant la structure hélicoïdale ainsi formée (Figure 10).

L'association de l'ADN avec les histones et d'autres protéines de liaison à l'ADN, définit deux structures d'ADN. Il y a une forme relâchée, **faiblement condensée**, appelée l'**euchromatine**. Sa faible condensation rend l'ADN **accessible à la machinerie transcriptionnelle**. La deuxième forme est appelée l'**hétérochromatine**, et est caractérisée par un **fort degré de compaction** qui rend l'ADN **inaccessible aux facteurs de transcription**. Pour autant, le degré de compaction de l'ADN n'est pas constant le long de la double hélice. Ainsi pour un même chromosome, les deux formes cohabitent et déterminent les zones actives et les zones inactives de la chromatine. L'existence de l'ADN sous forme d'euchromatine ou d'hétérochromatine dépend de modifications des queues N-terminales des histones et C-terminales qui peuvent être des méthylations, des phosphorylations, ubiquitinations, sumoylations, (...) et acétylations, seuls types de modification que nous aborderons ici (Turner, 2002), (Turner, 2000), (Jenuwein and Allis, 2001).

L'activation ou la répression de la transcription peut être fonction du type de changement post-traductionnel mais également du résidu modifié ou du degré de modification.

Pensées à la base comme des éléments statiques et ne participant pas à l'expression des gènes, il est désormais établi que les histones sont un composant essentiel de la dynamique de la machinerie de régulation de la transcription des gènes.

.1.2.1 Acétylation des histones

Les lysines sont des acides aminés chargés positivement et lient donc fortement l'ADN chargé négativement, ceci induit la condensation de la chromatine, rendant l'ADN inaccessible aux facteurs de transcription. L'ajout d'un groupement acétyle sur les lysines enlève cette charge positive, ce qui réduit l'affinité des histones pour l'ADN et relâche donc l'ADN, qui devient accessible à la machinerie de transcription. De manière générale, l'acétylation des histones est un mécanisme activateur de la transcription.

L'acétylation est réalisée par des enzymes spécifiques appelées les HAT pour Histone Acetyl Transférase. L'effet des HAT sur la chromatine peut être facilement inversé par les HDAC (Histone DeAcétylases) qui enlèvent le groupe acétyle des lysines.

.1.2.2 Modifications des histones et cancers

Des changements dans les modifications des extrémités N- et C-terminales des histones peuvent intervenir dans les cellules cancéreuses. Les dérégulations des modifications d'histones sont en général le fruit d'altérations des gènes codant pour les HDAC, HAT, HMT (histone méthyltransférases) ou HDM (histone déméthylase) ; ces gènes peuvent être mutés ou transloqués, ce qui peut conduire à leur surexpression, sous expression ou absence d'expression.

Ces enzymes sont depuis peu ciblées par des molécules utilisées lors de traitements anticancéreux. La quasi-totalité de ces molécules ciblent des HDAC. Il existe quatre groupes d'inhibiteurs de HDAC définis selon leur classe structurale.

Parmi les plus connus, on peut citer :

- des acides aliphatiques, comme le butyrate de sodium (très utilisé pour les études *in vitro* mais beaucoup moins *in vivo* du fait de sa faible durée de vie), le phenylbutyrate, ou l'acide valproïque (dérivé de l'acide propylpentanoïque),
- des acides hydroxamiques, comme la trichostatine A (TSA) qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire *in vitro* mais son efficacité *in vivo* n'a pas été démontrée du fait de sa grande cytotoxicité. Des études *in vitro* démontrent clairement que la trichostatine A induit une apoptose dans les hépatocytes de rat (Vanhaecke et al., 2004) et qu'elle permet la réexpression de certains gènes suppresseurs de tumeurs.
- des térapeptides cycliques, comme la trapoxine, le depsipeptide et l'apidine. Mais seul le depsipeptide a, à ce jour, montré une efficacité sur la progression tumorale (Vinodhkumar et al., 2008).

Des études cliniques en cours, ou menées récemment aux Etats-Unis, combinent des inhibiteurs de DNMT et HDAC (protocole n°2004-0799 NCT00326170) et montrent un effet

additif de l'acide valproïque et de la décitabine, vis-à-vis de l'inhibition de la croissance tumorale et de l'induction de l'apoptose chez des patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Ces substances sont, pour le moment, surtout utilisées chez des patients atteints de leucémie myéloïde ou de syndrome myélodysplasique, leur action sur les tumeurs solides reste encore à démontrer.

La méthylation de l'ADN et les modifications d'histones sont deux mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. En effet, ces deux processus permettent par exemple l'extinction de gènes du développement chez l'adulte, mais ils sont également mis en jeu dans « **l'empreinte parentale** » qui permet l'expression monoallélique de certains gènes.

.1.3 Empreinte parentale

Un œuf fécondé de mammifère contient initialement le noyau d'un spermatozoïde et celui d'un ovocyte, à la différence de certains animaux et végétaux qui se reproduisent par parthénogenèse (c'est-à-dire à partir d'un seul noyau).

En 1984, Solter et Surani essaient d'échanger le noyau du spermatozoïde par celui d'un autre ovocyte et inversement afin d'observer les conséquences sur le développement embryonnaire murin et connaître la participation de chaque gamète (McGrath and Solter, 1983), (Surani et al., 1984), (Surani and Barton, 1983). Les gynogénètes (embryons développés à partir de deux ovocytes) et les androgénètes (embryons développés à partir de deux spermatozoïdes) n'arrivent jamais à terme. Les gynogénètes présentent un développement embryonnaire normal mais ont des anomalies des annexes embryonnaires, la situation est opposée pour les androgénètes. Cette expérience montre que les deux génomes ne sont pas équivalents mais surtout qu'ils jouent un rôle complémentaire dans le développement embryonnaire. Pour la première fois, une expérience montrait la non-équivalence des génomes parentaux. Solter et Surani ont alors émis l'hypothèse d'un mécanisme **d'empreinte génomique parentale**, mise en place durant la gamétogenèse.

Plus tard, Cattanach *et al.*, et Searle & Beechey tentent de déterminer l'importance de chaque chromosome murin en effectuant des expériences d'unidisomies parentales de chaque

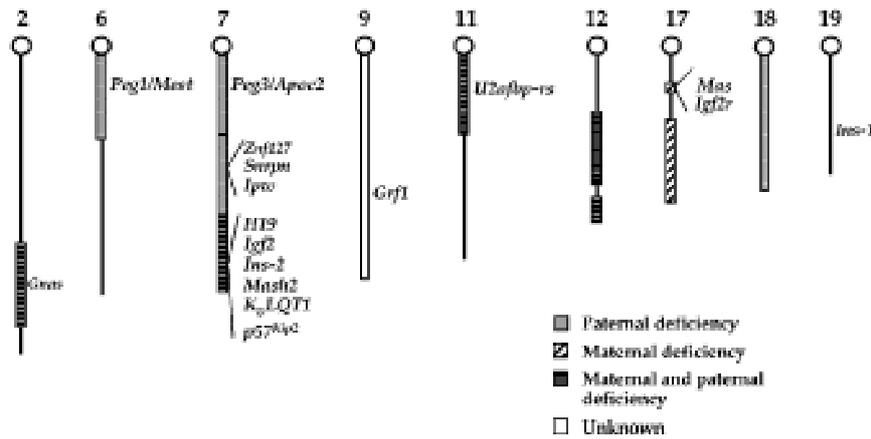


Figure 11 : régions génomiques soumises à l’empreinte parentale chez la souris (Cattanach et al., 1996)

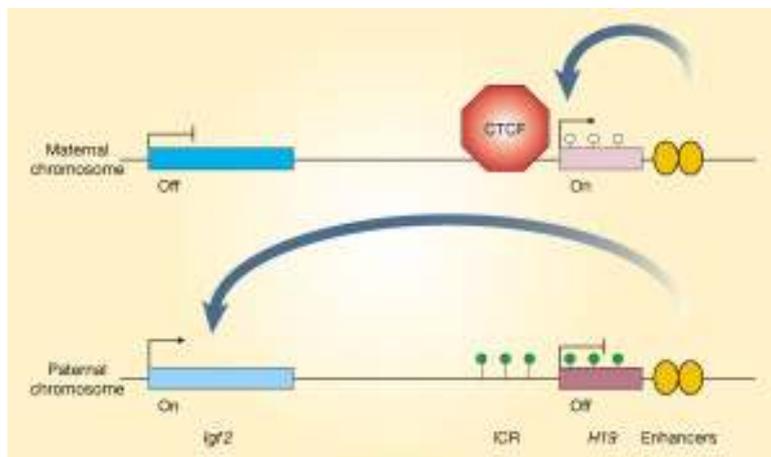


Figure 12 : régulation commune de deux gènes d’empreinte *IGF2* et *H19*. (Reik and Murrell, 2000)

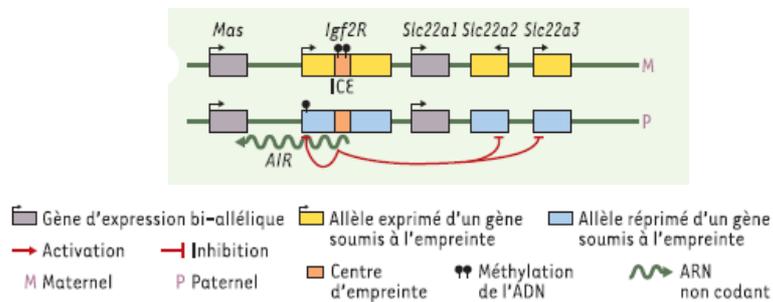


Figure 13 : régulation des gènes *SLC22A 2 / 3* par des ARN non codants transcrit à partir du gène *IGF2* (Gabory and Dandolo, 2005)

chromosome. Par croisement de souris présentant des remaniements chromosomiques, Cattanach et al., obtiennent des individus chez qui, certaines paires de chromosomes ou portions de chromosomes proviennent d'un seul des deux parents (Cattanach et al., 2004). Ceci permet de déterminer onze régions chromosomiques non équivalentes selon qu'elles proviennent du père ou de la mère, et qui affectent le développement, la survie ou le comportement murin (Figure 11). Ces onze régions génétiques sont soumises à l'empreinte parentale (Cattanach et al., 1996). Cette **empreinte permet de mettre sous silence un des deux allèles de certains gènes**. Les premiers gènes soumis à l'empreinte ont été mis en évidence dans les années 1990 : *IGF2* (insulin growth factor 2) et son récepteur *IGFR2* (Insulin growth factor 2 receptor) (DeChiara et al., 1990), (Barlow et al., 1991). Ont suivi plus tard les découvertes d'autres gènes soumis à l'empreinte parentale comme *PLAGL1* (Abdollahi et al., 2003).

Les gènes soumis à l'empreinte ne sont pas distribués de façon aléatoire dans le génome, mais sont regroupés en cluster, suggérant un contrôle commun de l'expression de ces gènes (Lopes et al., 2003). En effet, c'est le cas d'*IGF2* et *H19*. La protéine CTCF se lie à l'allèle maternel et active l'expression d'*H19*, l'expression d'*IGF2* est réprimé. Sur l'allèle paternel, l'ADN est méthylé, CTCF ne se fixe pas, *H19* ne s'exprime pas contrairement à *IGF2* (Figure 12).

Chez l'homme, les régions soumises à l'empreinte sont surtout retrouvées au niveau des chromosomes 6, 7, 11, 14, 15.

L'inactivation d'un des deux allèles observée lors de l'empreinte parentale fait appel à deux mécanismes évoqués plus haut que sont : la méthylation de l'ADN au niveau d'îlots CpG (également appelés DMR pour Differentially Methylated Region) et/ou les modifications d'histones (Lewis et al., 2004).

De plus, il a été démontré que les gènes d'empreinte produisent souvent des ARN non codants capables de réguler (réprimer) l'expression des gènes d'empreinte adjacents. Par exemple l'intron 2 du gène *Igfr2* contient le DMR ou centre d'empreinte qui est méthylé sur l'allèle maternel. A partir de l'allèle paternel non méthylé, s'exprime un ARN antisens qui serait responsable de la répression des gènes *IGFR2*, *SLC22A2* et *SLC22A3* (Figure 13) (Wutz et al., 1997), (Sleutels et al., 2002), (Rougeulle and Heard, 2002).

Les gènes soumis à l’empreinte parentale ont une expression monoallélique due à la répression d’un des deux allèles par méthylation, condensation de la chromatine ou encore ARN anti-sens. Du fait de cette expression monoallélique, la fonction des gènes d’empreinte est plus facilement perdue et peut être causée par 1) une mutation, 2) une délétion, 2) une méthylation, 3) une perte d’hétérozygotie de l’allèle normalement exprimé.

De très nombreuses pathologies résultent de la modification d’expression de ces gènes, parmi lesquelles :

- le syndrome Beckwith-Wiedemann qui est associé à des anomalies d’empreinte de la région humaine 11p15 et caractérisé par des malformations congénitales et des prédispositions à certaines tumeurs.
- Les syndromes Prader-Willi (perte d’expression de certains gènes notamment *SNRPN*) et d’Angelman (perte d’expression de *UBE3A*) qui sont associés à des modifications de l’empreinte de gènes de la région chromosomique 15q11-13 et caractérisés principalement par des retards mentaux.
- Les cancers liés à des pertes d’expression de gènes suppresseurs de tumeur soumis à l’empreinte parentale (*BRCA1* et 2, *PLAGL1*).

Dans de très nombreux cancers, on peut noter une perte de l’empreinte parentale (LOI pour loss of imprinting) qui aboutit, comme cela a été décrit plus haut, à une réexpression de l’allèle normalement réprimé ou à une perte d’expression de l’allèle normalement exprimé. La première LOI mise en évidence a été celle du gène *IGF2* dans les carcinomes du côlon, entraînant une prolifération anormale des cellules des cryptes du côlon, favorisant le phénomène de tumorigenèse. Depuis, cette LOI d’*IGF2* a été retrouvée dans de nombreux cancers (sein, rein, sarcomes, cancers hématopoïétiques...). **La perte de l’empreinte est un événement clé de la tumorigenèse et c’est un mécanisme très conservé dans les cancers.**

En effet, la perte de l’empreinte ou plus largement les **altérations épigénétiques** (méthylation de l’ADN, remodelage de la chromatine) sont deux **mécanismes précoces de l’oncogénèse**. Les modifications épigénétiques participent beaucoup au développement tumoral mais seraient surtout impliquées dans la transformation de cellules normales à l’origine des cancers. A ce jour deux hypothèses s’affrontent pour expliquer l’origine des cancers : soit une

		euchromatine	hétérochromatine
structure de la chromatine	structure	moins condensée, ouverte, accessible	condensée, fermée, inaccessible
	séquence ADN	riche en gènes	éléments répétés
	activité	exprimée, active	réprimée, silencieux
marqueurs épigénétiques	méthylation de l'ADN	hypométhylée	hyperméthylée
	acétylation d'histone	hyperacétylation des histones H3 et H4	hypoacétylation des histones H3 et H4
	méthylation d'histone	H3K4me2, H3K4me3, H3K9me1	H3K27me2, H3K27me3, H3K9me2, H3K9me3

Tableau 2 : différences de structure de l'ADN et des protéines associées en fonction du niveau de compaction de la chromatine

cellule différenciée se dédifférencie et acquiert des propriétés pro-prolifératives (hypothèse de la transition épithélio-mésenchymateuse), soit une cellule souche d'un tissu donné dérive et donne naissance à une tumeur (hypothèse de la cellule souche cancéreuse). Dans le cadre de cette deuxième hypothèse, plusieurs auteurs ont émis l'idée que le phénomène initial permettant la dérive des cellules souches d'un phénotype normal à un phénotype tumoral pouvait être d'origine épigénétique (Jones and Baylin, 2007).

D'après cette hypothèse, il existerait des gènes « gatekeepers » qui permettraient le maintien du phénotype normal des cellules souches lorsqu'ils sont épigénétiquement régulés et qui induiraient la dérive tumorale de ces cellules souches lorsqu'une dérégulation épigénétique interviendrait. Ces gènes comme *APC* ou la beta-catenine, qui sont des « gatekeepers » dans le cancer du côlon, sont donc considérés comme des **progéniteurs épigénétiques du cancer**. D'autre part, l'épigénétique est aussi responsable de **hétérogénéité des cellules tumorales** au sein d'une même tumeur, ce qui expliquerait que certaines sous populations cellulaires d'une tumeur répondent plus ou moins bien à une chimiothérapie, ou acquièrent une capacité d'invasion (Feinberg, 2005).

.1.4 Conclusion

Toutes les cellules d'un organisme partagent le même ADN mais la spécificité de leur protéome définit leur fonction et leur appartenance à un tissu spécialisé. Ainsi, chaque cellule exprime un nombre restreint de gènes, dont l'expression est régulée par plusieurs mécanismes parmi lesquels des mécanismes épigénétiques rendant l'ADN plus ou moins accessibles aux facteurs de transcription. Deux mécanismes épigénétiques ont été détaillés ici : la **méthylation de l'ADN** et la compaction de l'ADN due à des **modifications des histones**.

La méthylation de l'ADN se fait, chez les mammifères uniquement sur les cytosines placées en amont de guanine et appartenant à des îlots CpG placés en amont de la séquence codante des gènes. L'ajout du groupement méthyle sur les cytosines induit le recrutement de protéines liant spécifiquement l'ADN méthylé appelée MBD comme MECP2 qui permet la fixation d'un complexe multiprotéique (contenant entre autres des histones déacétylases) induisant la compaction de la chromatine et rendant l'ADN inaccessible aux facteurs de transcription.

L'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription définit deux types de chromatines : l'euchromatine qui est accessible aux facteurs de transcription, est caractérisée par une forme relâchée de l'ADN et une grande richesse en gène. Elle est généralement hypométhylée,

hyperacétylée et certaines lysines de ces histones sont méthylées. A l'inverse l'hétérochromatine est inaccessible aux facteurs de transcription, et caractérisée par une forme condensée de l'ADN et une richesse en éléments répétés. Elle est généralement hyperméthylée, hypoacétylée et certaines lysines des ses histones sont méthylées (Tableau 2).

L'épigénétique est un mécanisme de régulation de l'expression des gènes **transmissible au cours des générations**, qui peut également servir à réguler l'expression de gènes impliqués dans des processus généraux comme par exemple le développement, selon leur origine parentale. Ces gènes sont dit « soumis à l'empreinte parentale », la régulation épigénétique d'un des deux allèles conduit à une expression normale monoallélique. L'expression de ces gènes est dérégulée dans de nombreuses pathologies par une modification de cette empreinte parentale qui conduit à leur sur- ou sous expression. Dans l'oncogenèse on peut noter une perte d'expression de plusieurs gènes soumis à l'empreinte parentale et codant pour des gènes suppresseurs de tumeur. Cette perte d'expression est un mécanisme pro-oncogénique précoce. La précocité de cette altération en fait un bon outil diagnostique, mais aussi pronostique puisque l'état de méthylation de certains gènes peut informer sur la probabilité de réponse à un traitement ou sur la probabilité de rechute.

La méthylation de l'ADN et le remodelage de la chromatine sont deux mécanismes épigénétique étroitement liés à l'oncogenèse mais, récemment un autre mécanisme épigénétique a été découvert : la régulation de l'expression par **microRNA**, qui est également impliquée dans le processus de cancérisation.

.2 Régulation de l'expression génique par un mécanisme épigénétique : MicroRNA

Jusqu'à la découverte des ribozymes (ARN capable de catalyser des réactions chimiques), les ARN étaient uniquement considérés comme des intermédiaires de la synthèse protéique. Dans les années 90, Jorgensen *et al.*, ont découvert fortuitement une nouvelle classe d'ARN, capable de modifier l'expression de certains gènes (Napoli *et al.*, 1990). Mais le mécanisme responsable de ce phénotype resta inconnu jusqu'en 1994, quand Wassenegger montra que l'introduction d'ARN double brin dans des cellules d'*Arabidopsis thaliana* régula l'expression d'un gène (Wassenegger *et al.*, 1994). La même constatation a été faite par Fire et Mello en 1998 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998). Ce mécanisme fut alors nommé ARN interférence. L'ARN interférent se lie spécifiquement à l'ARNm cible, conduisant à la dégradation de celui-ci et de ce fait à l'inhibition de l'expression de la protéine correspondante. En 1993, un autre type ARN non codant a été mis en évidence par Lee *et al.*, : les microRNA (Lee *et al.*, 1993).

.2.1 Découverte des microRNA

Le premier microRNA découvert fut Lin-4 en 1993 (Lee *et al.*, 1993). A cette époque, l'équipe de Lee cherchait à élucider les mécanismes moléculaires permettant le développement de *C. elegans*. Cet organisme a six stades de développement : un stade embryonnaire, quatre stades larvaires et un stade adulte. Lee *et al.*, ont montré que l'introduction d'un ADN de 693 pb sans phase de lecture, chez le mutant Lin-4 qui réitère en permanence le stade larvaire L1, permettait le passage au stade de développement suivant. Cet ADN de près de 700 pb codait en fait pour un petit ARN de 22 nucléotides, capable à lui seul de restaurer le phénotype sauvage. Ils ont également montré que cet ARN ne codait pas pour une protéine, mais était capable de se lier à une séquence particulière du 3'UTR (région 3' terminale non traduite des ARNm) de deux ARNm codant pour les protéines LIN-14 et LIN-28. LIN-14 est une protéine qui bloque la transition L1-L2, ce petit ARN en se fixant au 3'UTR de Lin-14 induisait la dégradation de cet ARNm et bloquait la synthèse de cette protéine répresseur. Mais à cette époque, aucune homologie de séquence avec Lin-14 n'avait

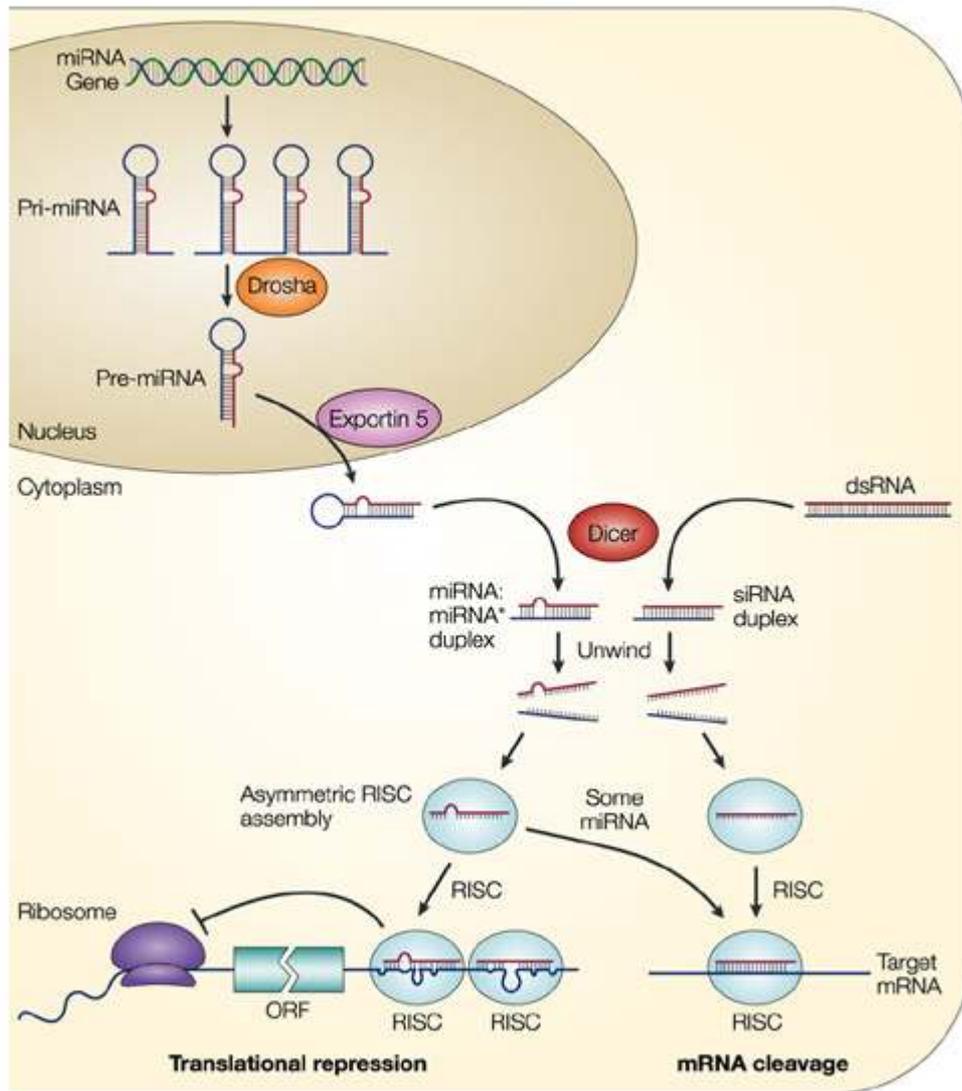


Figure 14 : synthèse et modes d'actions des microRNA (He and Hannon, 2004)

pu être mise en évidence dans les bases de données. Ce mécanisme était donc considéré comme un phénomène isolé et propre au nématode.

C'est dans les années 2000 que l'on peut noter un véritable engouement pour l'étude des microRNA, de leur synthèse, de leur mécanisme d'action et de leur(s) rôle(s).

En effet, en 2000 Reinhard *et al.*, montrent l'existence d'un second microRNA chez *C. elegans* : *let-7* qui permet de réguler l'expression des protéines LIN-41 et LIN-42 au cours du développement (Reinhart et al., 2000). Cette découverte a permis de généraliser le mode d'action de *lin-4* et de définir un nouveau mode de régulation de l'expression protéique. La même année, cette équipe découvre des séquences homologues de *let-7* chez tous les vertébrés et invertébrés étudiés (Pasquinelli et al., 2000). Cette découverte a marqué le début d'une analyse systématique des génomes des métazoaires et des plantes. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'existence d'ARN non codant chez l'Homme, la drosophile (...) (Lee and Ambros, 2001), (Lau et al., 2001), (Lagos-Quintana et al., 2001).

Ces études ont permis le développement de logiciel de prédiction de gènes codant pour des microRNA en 2003, et il a été estimé qu'1 % du génome codait pour des microRNA et qu'un tiers des microRNA du nématode *C. elegans* était conservé chez l'Homme. Les microRNA sont en quantité variable dans les cellules mais on peut estimer qu'il y a entre 1000 et 50000 microRNA par cellules chez *C. elegans* (Lim et al., 2003).

En 2004 D. Bartel émet l'hypothèse d'une répartition des microRNA dépendante des tissus et du stade de développement (Bartel, 2004).

.2.2 Synthèse des microRNA

La majorité des gènes codants pour des microRNA est située dans des régions intergéniques ou dans les introns de certains gènes et ont leurs propres régions régulatrices (Lagos-Quintana et al., 2001), (Lau et al., 2001). Une partie des gènes codant pour des microRNA est organisée en tandem ce qui induit une expression polycistronique de ceux-ci (Figure 14) (Altuvia et al., 2005).

Les gènes codant pour les microRNA sont transcrits par l'ARN polymérase II dans la grande majorité des cas, ce qui aboutit à la synthèse d'ARN non codants d'une ou plusieurs centaines

de bases, appelés **pri-microRNA**, qui sont caractérisés par une structure double brin partiellement homologue et une partie non complémentaire qui forme deux prolongements monocaténaire, mais aussi par la présence d'une coiffe en 5' et d'une queue poly(A) en 3' (Lee et al., 2004), (Cai et al., 2004). De façon occasionnelle, certains microRNA ayant des séquences promotrices de type Alu ou tRNA par exemple, peuvent être transcrits par l'ARN polymérase III (Borchert et al., 2006).

Une fois le pri-microRNA synthétisé, il va être pris en charge par un complexe protéique formé de deux protéines : DROSHA (une endonucléase) et DGCR8 (également appelé PASHA chez l'Homme) (Han et al., 2006). Ces deux protéines vont cliver les deux extrémités monocaténaire portant les coiffes en 5' et la queue poly(A) en 3', donnant ainsi naissance à un autre précurseur : le **pré-microRNA**.

DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) est une nucléoprotéine de liaison à l'ARN double brin, qui reconnaît le motif en épingle à cheveux du pri-microRNA et oriente le domaine catalytique RNase III de DROSHA pour le clivage du pri-microRNA en pré-microRNA (Han et al., 2004) . Ce clivage se fait 11 nucléotides de part et d'autre de l'hairpin (Lee et al., 2003) ; (Zeng et al., 2005). Le complexe DROSHA-DGCR8 va ensuite réduire la taille des extrémités monocaténaire pour avoir d'un côté l'extrémité 5' phosphate de l'hairpin et de l'autre deux nucléotides sortants en 3' de l'hairpin (Denli et al., 2004), (Han et al., 2006), (Han et al., 2004), (Gregory et al., 2004). Ce pré-microRNA a une structure en épingle à cheveux (hairpin loop) d'environ 70 nucléotides pour les microRNA synthétisés individuellement. Les pré-microRNA transcrits en polycistron sont constitués de plusieurs structures en épingle à cheveux (Altuvia et al., 2005)

Une fois le pré-microRNA synthétisé, il va être exporté du noyau vers le cytosol par EXP5 (l'exportine 5), qui reconnaît les 2 nucléotides de l'extrémité 3' non contenus dans l'hairpin (Zeng and Cullen, 2004), en utilisant du Ran-GTP (Bohnsack et al., 2004), (Yi et al., 2003).

Lorsque le pré-microRNA est dans le cytoplasme, la boucle de l'hairpin va être clivée par une autre RNase de type III spécifique de l'ARN double brin nommé DICER (Bernstein et al., 2001), (Hutvagner et al., 2001), (Ketting et al., 2001). Il résulte de ce clivage, un duplex de microRNA de 20 à 25 pb à la complémentarité imparfaite toujours lié à DICER et ses protéines associées : TRBP (transactivating (TAR) RNA binding protein) et PACT

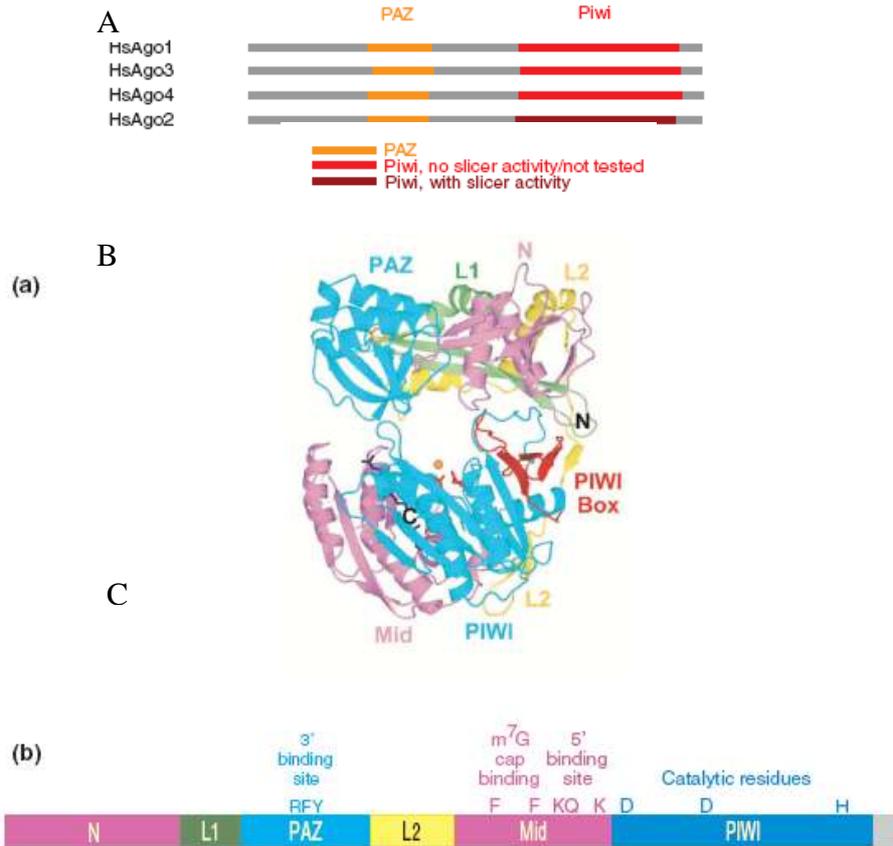


Figure 15 : A : comparaison des motifs protéiques des 4 protéines AGO humaines, B : structure d'une protéine AGO, C : détail de la protéine AGO2 (L1 et L2 : linker) (Höck and Meister, 2008)

(interferon-inducible dsRNA dependent protein kinase (PKR) activator) (Chendrimada et al., 2005), (Lee et al., 2006). Ce **duplex est constitué du microRNA mature et de son complémentaire** (identifié par une astérisque) (Lim et al., 2003), (Schwarz et al., 2003). En général, un brin du duplex est destiné à être le microRNA mature, l'autre étant dégradé. Le microRNA mature est celui qui est le moins thermodynamiquement stable et capable de s'hybrider à un ARN cible avec une faible homologie (Krol et al., 2004), (Schwarz et al., 2003). Mais dans de rares cas, le duplex peut être formé de deux microRNA mature par exemple mir458-3p et mir458-5p ou mir202 et mir202*, où dans ce cas, l'astérisque désigne non pas le brin destiné à être dégradé mais le plus thermodynamiquement stable.

Le microRNA mature est alors pris en charge par AGO (de la famille des protéines argonaute) et GW182 notamment, pour former un complexe dénommé miRISC résultant de l'association d'un microRNA et des protéines du complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) également appelé miRNP (microRNA+ des Ribo NucléoProtéines) (Maniataki and Mourelatos, 2005).

Chez l'Homme, il existe 8 protéines de la famille argonaute. Cette famille est subdivisée en 2 sous-famille : AGO, ubiquitaire dans les cellules de mammifère et PIWI, restreinte aux cellules des lignées germinale et hématopoïétique (Sasaki et al., 2003). Chez l'Homme, il existe 4 protéines PIWI et 4 protéines AGO, les gènes codants pour AGO1, 3 et 4 sont localisés sur le chromosome 1, tandis que le gène codant pour la protéine AGO2 est situé sur le chromosome 8. Le complexe RISC peut contenir les protéines AGO1-4 (Hammond et al., 2001), (Meister et al., 2004). Les protéines de la famille AGO possèdent, entre autres :

- un domaine de liaison à l'ARN très conservé,
- le domaine PAZ (Piwi-Argonaute Zwiller) qui peut lier l'extrémité 3' libre du microRNA
- un domaine MID permettant l'interaction avec l'extrémité 5' phosphate du microRNA (Höck and Meister, 2008),
- et un domaine PIWI ayant une forte homologie structurale avec les RNases (Lingel and Sattler, 2005) (Figure 15).

La protéine AGO2 est la seule protéine de la famille AGO à avoir un domaine PIWI à activité endonucléasique. En effet, bien que toutes les protéines AGO aient le domaine PIWI, celui-ci

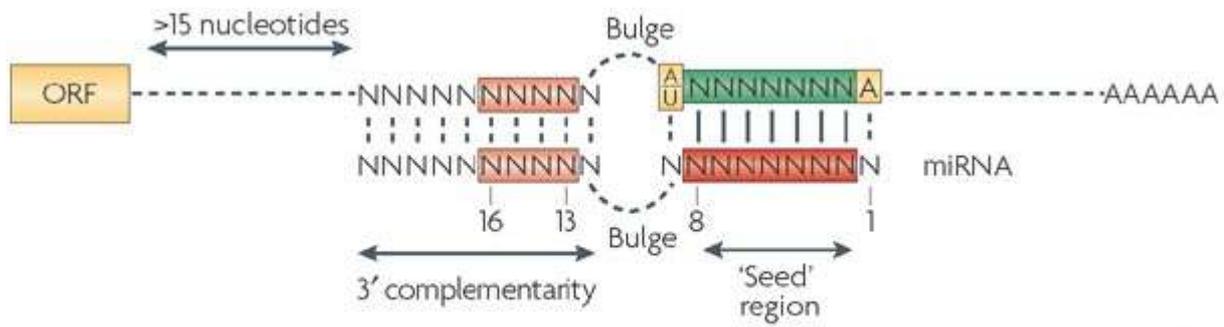


Figure 16 : séquence minimale de complémentarité entre le microRNA et le 3'UTR : le seed d'après Filipowicz et al. 2008 (Filipowicz et al., 2008)

est généralement inactif, sauf pour AGO2 qui peut donc cliver les ARN. AGO2 est nécessaire à la dégradation de l'ARNm cible, les autres AGO sont plutôt responsables de la répression de la traduction (Meister et al., 2004).

Le complexe miRNP ou miRISC va ensuite se lier à l'ARNm cible ce qui va engendrer plusieurs voies possibles, aboutissant toutes à la répression de la traduction (Gregory et al., 2005), (Martinez et al., 2002).

.2.3 Modes d'action des microRNA

A la différence des siRNA qui nécessitent une complémentarité parfaite entre l'ARN et la séquence cible pour induire une répression de la traduction, les microRNA peuvent bloquer la production de protéines en ayant une complémentarité imparfaite.

Contrairement aux siRNA qui peuvent se fixer sur une séquence homologue située dans n'importe quelle région de l'ARNm, chez les mammifères, les microRNA reconnaissent une séquence cible située dans la région 3'UTR de certains ARNm (Wang et al., 2004). La répression de la traduction par les microRNA peut se faire par plusieurs mécanismes :

- si la complémentarité est parfaite entre la séquence du microRNA et la séquence de reconnaissance du microRNA sur la région 3'UTR de l'ARNm cible, alors la liaison est totale et induit la **dégradation** du complexe miRISC-ARNm cible (comme pour les siRNA) ;
- lorsque la complémentarité est imparfaite entre le microRNA et sa séquence cible, il n'y a pas dégradation mais **séquestration** du complexe miRISC-ARNm dans des sous-domaines cytosoliques appelés les P-bodies. Cette relocalisation entraîne un blocage de la traduction car l'ARNm n'est plus accessible à la machinerie traductionnelle. Si la complémentarité n'est pas nécessairement totale pour ce dernier mécanisme d'action, une partie du microRNA (2 à 7 nucléotides appelé le « seed ») doit tout de même s'hybrider parfaitement à l'ARNm. (Figure 16) (Mazière and Enright, 2007).

Il existe plusieurs mécanismes de répression de la traduction des ARNm lorsque ceux-ci sont séquestrés dans les P bodies. La présence du miRISC sur le 3'UTR d'un ARNm peut entraîner une déadenylation de la queue poly(A) ou un blocage de l'initiation de la traduction

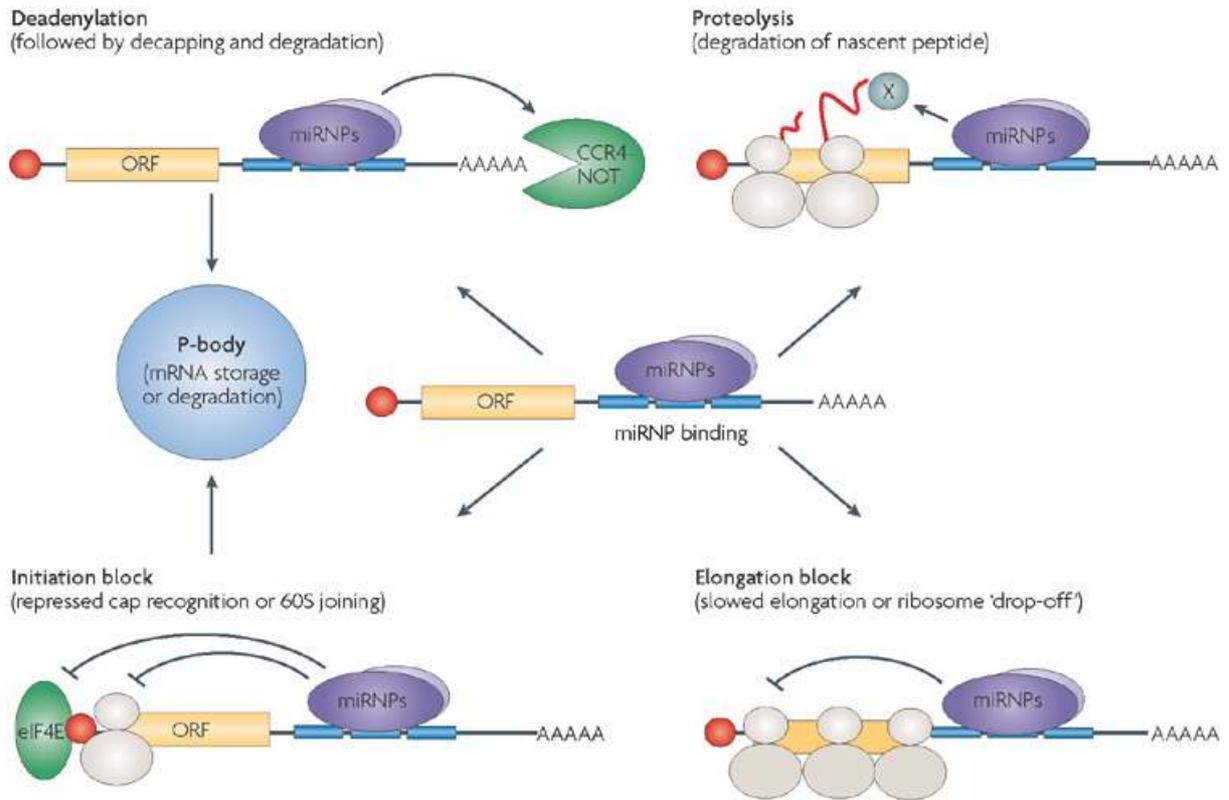


Figure 17 : modes de répression de la traduction par les microRNA d'après Filipowicz et al. 2008
(Filipowicz et al., 2008)

par masquage de la coiffe en 5'. Dans le cytoplasme, la fixation du miRISC peut aussi entraîner une répression de l'élongation des protéines en cours de synthèse ou une dégradation des peptides en cours de synthèse (Figure 17).

A la différence des siRNA qui sont spécifiques d'un seul ARNm donné, les microRNA, de part leur mécanisme ne nécessitant pas une parfaite hybridation, peuvent réguler de **très nombreux ARNm**. Un microRNA donné peut potentiellement réguler l'expression d'une ou plusieurs centaines de gènes. Inversement, **un ARNm donné peut être régulé par de multiple microRNA**.

Chez les animaux, les microRNA ciblent préférentiellement des gènes impliqués dans le développement, la prolifération et l'apoptose ou des gènes tissus spécifiques. En revanche, les gènes constitutifs, codant pour des protéines du cytosquelette ou des enzymes du métabolisme, sont très peu régulés par des microRNA.

.2.4 MicroRNA et cancers

Les gènes impliqués dans le développement sont classiquement dérégulés dans de nombreuses pathologies, comme le cancer. L'implication des microRNA ayant été clairement identifiée dans la régulation de l'expression de nombreux gènes du développement, plusieurs équipes ont émis l'hypothèse d'un rôle des microRNA dans le cancer.

En 2002, Eric Lai met en évidence pour la première fois **l'implication de microRNA dans l'oncogenèse** (Lai, 2002). Il montre ainsi que certains microRNA peuvent réguler l'expression de gènes cibles de la voie Notch comme le gène *Hairy/Enhancer of Split genes (HES)* qui code pour un répresseur de la transcription, régulant la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire notamment via les oncogènes *c-MYC*, *MAD* et *MAX*.

Avec le développement de logiciel de prédiction de fixation des microRNA aux 3'UTR des ARNm, il a pu être mis en évidence que de nombreux oncogènes ou suppresseurs de tumeur pouvaient être régulés par des microRNA.

Les loci des microRNA sont souvent retrouvés dans des **régions chromosomiques très remaniées** dans les cancers (Calin et al., 2004), ce qui altère l'expression de microRNA

régissant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, le développement, la mort, l'adhérence... Par exemple, les microRNA 15a et 16-1 qui répriment l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL2, sont localisés en 13q14 une région fréquemment délétée dans de nombreux cancers, comme la leucémie lymphoïde chronique, ou le cancer de la prostate. Ainsi leur perte d'expression entraîne la surexpression de la protéine anti-apoptotique BCL2, favorisant le développement tumoral (Calin et al., 2002).

Dans le cas de l'érythroleucémie, une insertion d'un ADN viral codant pour le cluster de microRNA 17-92 a été mise en évidence, aboutissant à une augmentation de la prolifération cellulaire en interférant avec la voie de l'EPO (Cui et al., 2007).

Une dérégulation de l'expression de plusieurs microRNA a pu être détectée dans de nombreux cancers, créant une véritable **signature microRNA** dans ce type de pathologie, et qui est propre à chaque cancer. De plus, la signature microRNA de la tumeur étant différente de celle du tissu sain, les microRNA pourraient servir de **biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques** (Lu et al., 2005), sachant que certains peuvent être dosés à partir de prélèvements sanguins (Mitchell et al., 2008), (Ng et al., 2009), (Tanaka et al., 2009).

Globalement, les microRNA sont sous-exprimés dans les cancers, mais quelques microRNA sont surexprimés. Les microRNA régulant des oncogènes sont de fait des microRNA suppresseur de tumeur et sont en général peu abondants dans les tumeurs, à l'inverse les microRNA ciblant les ARNm de gènes suppresseurs de tumeur, appelés des oncomiR (microRNA oncogéniques), sont surexprimés dans de nombreux cancers.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette altération de l'expression des microRNA :

- A ce jour, quelques **mutations** ou **polymorphismes** dans la séquence des microRNA ont pu être identifiées (Calin et al., 2005), (Duan et al., 2007), mais pas dans les séquences des protéines permettant leur expression ou leurs actions sur l'ARNm (Mishra, 2009),
- Les microRNA sont souvent retrouvés dans des **régions instables du génome** et sont souvent les cibles de **translocation** (Calin and Croce, 2007),

- L'altération de l'expression des microRNA peut également être due à une modification des protéines interagissant avec les microRNA. En 2006, il a pu être mis en évidence dans le cancer de la prostate, une **surexpression de la protéine DICER** qui de ce fait augmente la quantité de tous les microRNA (Chiosea et al., 2006).
- la répression de l'expression de certains microRNA peut aussi être due à des **mécanismes épigénétiques** tels que la méthylation de l'ADN. En effet, des expériences réalisées sur des lignées de cancer du colon (HCT116), déficientes ou non en DNMT1 et 3b, ont montré une expression différente du microRNA 124a (Lujambio et al., 2007). D'autres équipes ont montré une régulation des microRNA par méthylation de l'ADN en traitant des cellules tumorales à la 5AZdC, ce qui permettait d'augmenter le niveau d'expression du microRNA 127 dans le cancer de la vessie (Saito et al., 2006). Une régulation des microRNA 21, 203 et 205 par méthylation a aussi été mise en évidence dans des lignées de cancers de l'ovaire (Iorio et al., 2007). Bandres *et al.*, ont également mis en évidence des **îlots CpG dans les promoteurs des microRNA 9-1, 129-2 et 137** susceptibles d'être méthylés, dans le cancer colorectal (Bandres et al., 2009).

A propos de ce dernier mécanisme, il a d'ailleurs récemment été montré **une interconnexion entre les trois mécanismes épigénétiques** : méthylation de l'ADN, modifications d'histones et microRNA avec la découverte de la régulation par les microRNA des DNMT, HMT (Histone MéthylTransferase) et HDAC (Histone DeAcetylase) (Fabbri et al., 2007).

Outre le cancer, les microRNA sont également impliqués dans diverses pathologies comme le syndrome du X fragile (Jin et al., 2004), la maladie d'Alzheimer (Wang et al., 2008), le psoriasis (Sonkoly et al., 2007), le diabète (Tang et al., 2008) et l'obésité (Takanabe et al., 2008).

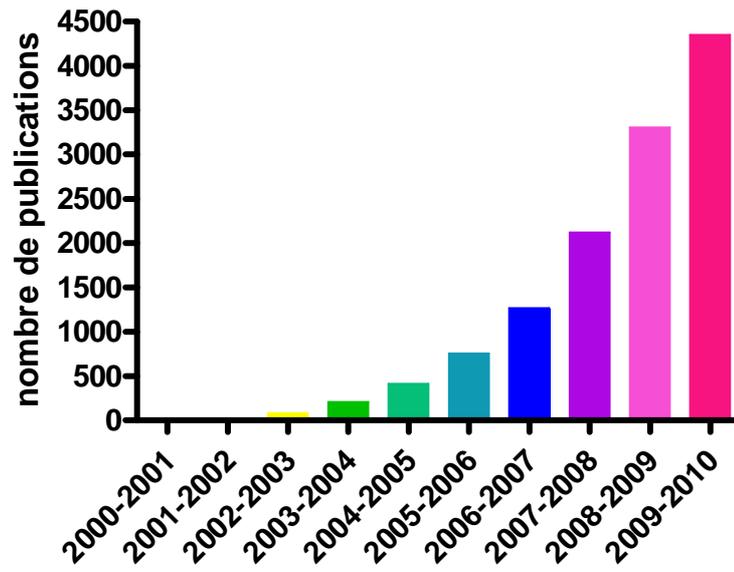


Figure 18 : nombre de publications sur les microRNA depuis 2000

.2.5 Conclusion

Les microRNA sont des acteurs majeurs de tous les processus cellulaires normaux et pathologiques. Leur découverte, bien que récente a suscité un engouement important, pour preuve, un tableau répertorie le nombre de publication contenant le terme microRNA dans le corps du texte par année depuis les années 2000, la fréquence de publication est exponentielle (Figure 18). L'enthousiasme pour ce nouveau mode de régulation de l'expression des gènes s'explique par la grande variété de processus régulés par les microRNA et par un mécanisme d'action variable, permettant de réguler un grand nombre de gènes.

En effet, les microRNA sont retrouvés en très grand nombre dans toutes les espèces, du nématode à l'Homme. On estime à près d'un millier les microRNA pouvant exister chez l'Homme. Ces microRNA sont en grand nombre dans une cellule ou un tissu donné, mais un microRNA particulier peut réguler un nombre très important de gènes cibles et ainsi influencer sur plusieurs acteurs d'une même voie de signalisation ou sur plusieurs voies de signalisation aux actions complémentaires et synergiques permettant ainsi un effet potentialisé.

A ce jour, les modes d'action des microRNA ne sont pas totalement expliqués. En effet, les processus permettant la séquestration de l'ARNm commencent juste à être élucidés. Ainsi, l'inhibition de l'expression protéique par répression de l'initiation de la traduction date de 2005. Les autres mécanismes de répression de l'expression protéique tels que la déadenylation, la dégradation de la protéine en cours de synthèse et le blocage de l'élongation ont été élucidés au cours de l'année 2006.

Si les modes d'actions des microRNA restent encore mal connus, les processus faisant intervenir les microRNA sont largement étudiés. Ainsi le rôle des microRNA dans le développement embryonnaire, le maintien de l'homéostasie cellulaire ou l'apparition et le maintien de certaines pathologies fait l'objet de nombreuses études.

L'implication des microRNA dans l'oncogenèse est de fait, devenue une piste sérieuse dans la compréhension des processus oncogéniques et dans le développement de nouveaux biomarqueurs (mise en évidence de « signatures microRNA » prédictives de la réponse aux traitements, de l'agressivité tumorale) ou de nouveaux traitements (traitement de tumeurs xénogreffées avec des microRNA ou leurs inhibiteurs).

Pour autant, il est important de noter que tous les mécanismes faisant intervenir les microRNA restent mal connus. En effet, alors qu'il est communément admis que les microRNA induisent une répression de la traduction, trois études parues entre 2006 et 2008 mettent en évidence une activation de la traduction de certains ARNm par des microRNA dans des conditions cellulaires particulières (privation de sérum ou certaines phases du cycle cellulaire) (Li et al., 2006), (Vasudevan et al., 2007), (Vasudevan et al., 2008).

Les microRNA font partie d'un mode de régulation de l'expression des gènes complexe et encore mal connu. Ainsi, l'interconnexion des microRNA avec les autres modes de régulation épigénétiques que sont la méthylation de l'ADN et les modifications d'histones ajoute à la complexité de ce processus. De plus, les gènes régulés par les microRNA le sont souvent également par méthylation de l'ADN ou par des changements de la conformation de l'ADN induits par les modifications d'histones. La bonne compréhension des mécanismes permettant ou non l'expression des gènes, déjà décrit comme étant régulés par méthylation de l'ADN ou par des modifications des histones, ne peut donc venir que d'une étude exhaustive de tous ces mécanismes épigénétiques.

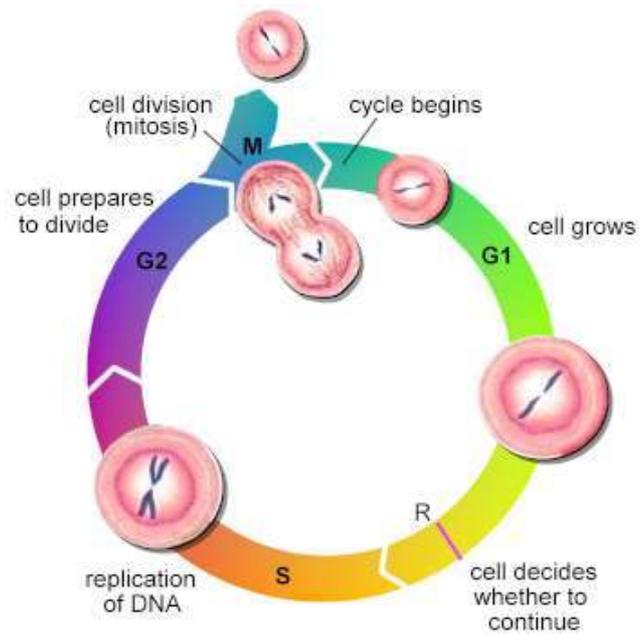


Figure 19 : les étapes du cycle cellulaire

.3 La prolifération et la mort cellulaire : régulation et dérégulation dans les cancers

.3.1 Le cycle cellulaire

Un cycle cellulaire est une succession d'événements moléculaires qui permet à une cellule mère de donner naissance à deux cellules filles identiques. Il se déroule en deux étapes : l'**interphase** durant laquelle la cellule grossit, accumule les nutriments nécessaires à l'étape suivante et réplique son ADN ; la **mitose** qui correspond à la division cellulaire qui permet la formation des deux cellules filles. Le cycle cellulaire peut être sous-divisé en quatre phases : trois phases durant l'interphase : G₀/G₁, S, G₂ et la phase M qui correspond à la mitose et à la cytokinèse (Figure 19).

.3.1.1 Les phases du cycle cellulaire

La phase G₀ est une phase de quiescence. En général, les cellules très différenciées sortent du cycle cellulaire en phase G₁ pour entrer en G₀ et ainsi stopper la progression du cycle cellulaire. Ce stade peut être permanent comme pour les neurones par exemple, ou transitoire, une cellule en G₀ pouvant retourner en G₁ et ainsi rentrer dans le cycle cellulaire.

La phase G₁ est la phase qui succède à la phase M du cycle précédent. C'est une phase de croissance pendant laquelle la cellule a une forte activité de biosynthèse ; la transcription et la traduction, qui étaient arrêtées durant la phase M, reprennent pour permettre la synthèse de protéines nécessaires à la réplication de l'ADN (protéines de la machinerie de réplication...) et la mitose (microtubules impliqués dans la formation du fuseau mitotique...).

La phase S est une phase de synthèse qui correspond à la réplication de l'ADN. Les chromosomes, auparavant monochromatidiens, deviennent bichromatidiens. Chaque chromosome est présent en deux copies (allèles maternel et paternel) et désormais avec deux chromatides, ces chromatides seront séparés pendant la mitose pour former deux cellules ayant le même contenu chromatidien. La traduction et la transcription sont très peu actives

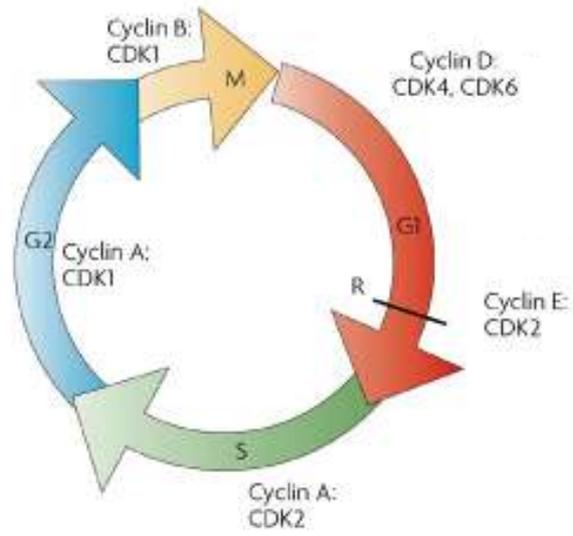


Figure 20 : couples CDK / cyclines mises en jeu lors des différentes étapes du cycle cellulaire

durant cette étape contrairement à la phase G1 sauf pour la synthèse d'histones nécessaire à la compaction du brin d'ADN néoformé.

La phase G2 fait suite à la réplication de l'ADN, c'est une phase préparatoire à la mitose durant laquelle la cellule synthétise les protéines nécessaires à la ségrégation des chromosomes, et à la cytotédière.

La phase M permet la division à proprement parler d'une cellule en deux cellules filles ayant le même contenu en chromosomes. La phase M est divisée en deux : la mitose qui correspond à la séparation des chromatides et à la division du noyau, et la cytotédière, qui consiste en la division du cytoplasme en deux et à l'individualisation des membranes plasmiques.

La mitose comporte plusieurs étapes : la prophase, la métaphase, l'anaphase, la télophase.

Une fois la mitose achevée, la phase M se termine par la cytotédière qui permet la division des deux cellules par extension de la membrane plasmique.

.3.1.2 Les protéines régulatrices du cycle cellulaire

La progression des cellules dans le cycle cellulaire est régulée principalement par deux classes de protéines : les CDK (Cycline Dependant Kinases), qui sont des protéines sérine/thréonine kinases, et les cyclines. Leur découverte a valu le prix Nobel de physiologie et de médecine à Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt, et Paul M. Nurse en 2001.

L'association des CDK aux cyclines induit l'activation des CDK qui vont alors phosphoryler et donc réguler d'autres protéines permettant la poursuite du cycle cellulaire (Figure 20).

Le couple CDK-cycline est spécifique à chaque phase du cycle cellulaire. Ainsi durant,

- la phase G1, interviennent successivement les couples : CDK4/cycline D et CDK6/cycline D,
- la transition entre la phase G1 et la phase S fait intervenir le couple CDK2/cycline E,
- la phase S, fait intervenir le couple CDK2/cycline A,
- la transition entre la phase S et la phase G2 fait intervenir le couple CDK1/cycline A,
- le couple CDK4/cycline D3, participe à la phase S,
- la transition entre la phase G2 et la phase M fait intervenir le couple CDK1/cycline B.

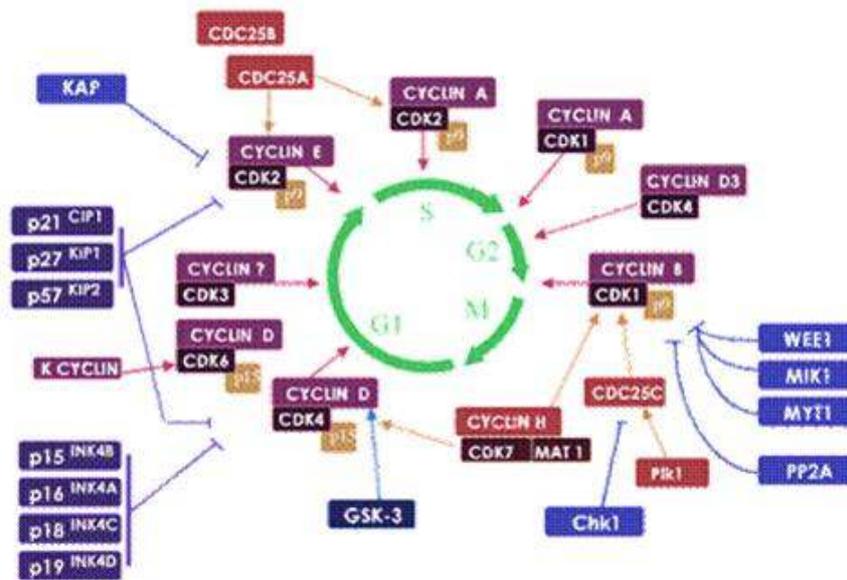


Figure 21 : protéines régulant les CDK et des cyclines au cours du cycle cellulaire

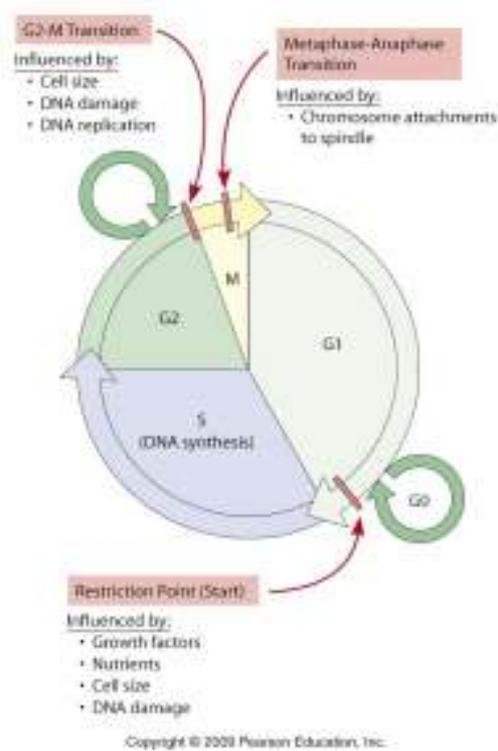


Figure 22 : points de contrôle du cycle cellulaire

D'autres protéines phosphatases ou kinases peuvent réprimer ou activer les couples CDK/cyclines comme : p27^{KIP}, WEE1, PP2a ; CDC25a/b (...) (Figure 21).

.3.1.3 Les points de contrôle « checkpoint » du cycle cellulaire

Comme nous venons de l'évoquer, le déroulement du cycle cellulaire est hautement contrôlé par les CDK et les cyclines. Or, des erreurs survenues pendant la réplication de l'ADN ou la mitose pourraient rapidement être transmises aux cellules filles si le cycle cellulaire ne pouvait être stoppé en cas de mutation ou de mauvaise répartition des chromosomes. C'est pour cela que les étapes clés du cycle cellulaire contiennent des points de contrôle faisant intervenir des protéines régulant l'interaction des CDK aux cyclines ce qui permet la progression ou non du cycle cellulaire à l'étape suivante (Figure 22).

Le premier point de contrôle a lieu durant la phase G1 juste avant l'entrée en phase S. Il consiste à vérifier que la cellule contient toutes les protéines nécessaires à la réplication et que l'environnement cellulaire permet la division complète de la cellule. La principale protéine impliquée dans ce point de contrôle est CDKI-p16 (Cycline Dependent Kinase Inhibitor p16) qui inhibe le couple CDK4/6 cycline D, puis une cascade de signalisation passant par RB (protéine du Rétinoblastome) et E2F, qui stimule l'expression de la cycline E et la poursuite du cycle cellulaire en phase S.

Le deuxième point de contrôle intervient à la fin de la phase S et avant la phase M. Il permet de vérifier qu'il n'y a pas eu de dommage durant la réplication et que la cellule contient toutes les protéines nécessaires à la mitose. Ce point de contrôle fait intervenir une phosphatase activatrice : CDC25 qui active le couple CDK1/cycline B.

Le dernier point de contrôle principal du cycle cellulaire a lieu pendant la mitose, en métaphase. Ce point de contrôle permet de vérifier que les chromosomes sont correctement alignés sur la plaque équatoriale et passe par la dégradation de la cycline D (qui inhibait le passage en anaphase).

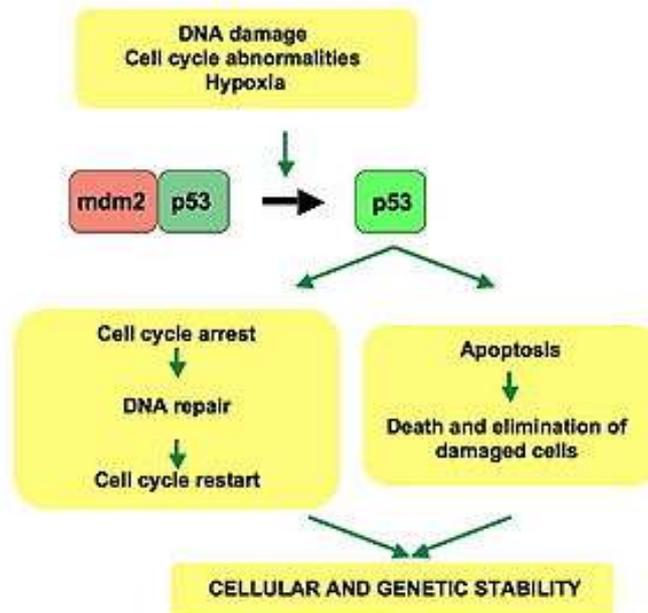


Figure 23 : implication de p53 dans le cycle cellulaire et l'apoptose

Outre les cyclines et les CDK, une protéine majeure intervient dans le contrôle du cycle cellulaire : P53.

P53 est un facteur de transcription codé par le gène *TP53* situé sur le chromosome 17. P53 joue un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse lors de dommage à l'ADN, c'est le « Gardien du génome » (Figure 23). En effet, lors de remaniements du génome, la protéine P53 est activée (il y a levée de l'inhibition de MDM2) et peut induire l'expression de protéines de réparation de l'ADN, l'arrêt le cycle cellulaire en G1/S pour permettre aux systèmes de réparation d'intervenir et l'apoptose dans les cas où une réparation de l'ADN n'est pas possible.

Lorsque la protéine P53 est activée, elle engendre l'expression de nombreux gènes parmi lesquels *P21*, dont la protéine se lie à CDK2 et inhibe son activité. Or CDK2 permet l'entrée des cellules en phase S par sa liaison successive avec la cycline E puis avec la cycline A. La liaison de P21 à CDK2 bloque donc le cycle en G1.

.3.1.4 Cycle cellulaire et cancers

Dans certains cas, des dommages à l'ADN induisent des mutations de protéines contrôlant le cycle cellulaire. Ces mutations peuvent toucher les CDK, les cyclines mais aussi toutes leurs protéines régulatrices. Ces altérations conduisent soit à une perte d'expression, soit à un gain d'expression, soit à l'expression de formes protéiques tronquées ou altérées. Dans tous ces cas, ces protéines ne peuvent plus jouer leur rôle de régulateur du cycle cellulaire ce qui engendre une division cellulaire excessive à l'origine des cancers. Sans régulation du cycle cellulaire, les cellules accumulent les mutations car l'absence de points de contrôle empêche l'activation de P53, qui en temps normal déclenche l'arrêt du cycle pour permettre la réparation de l'ADN ou à défaut l'apoptose quand les mutations ne peuvent être réparées (Figure 23).

De plus, de nombreux cancers sont caractérisés par une mutation de P53 qui l'empêche de se lier à l'ADN et donc d'activer l'expression de ses gènes cibles notamment *P21*. P53 n'est plus capable d'arrêter le cycle cellulaire et la cellule accumule les mutations et prolifère de façon anarchique.

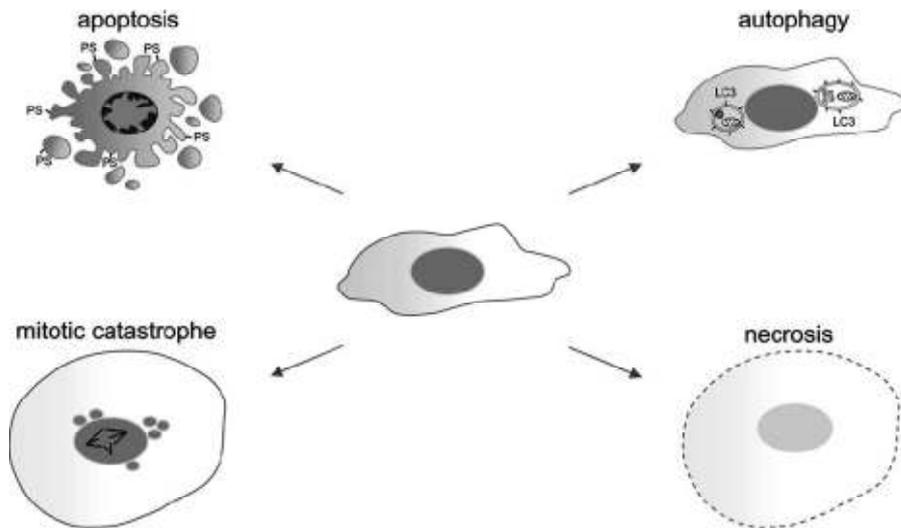


Figure 24 : caractéristiques morphologiques des différentes morts cellulaires (de Bruin and Medema, 2008)

.3.2 La mort cellulaire

La croissance et la survie d'un organisme pluricellulaire dépendent d'un équilibre entre la prolifération cellulaire et la mort.

Il existe plusieurs types de mort cellulaire : la nécrose, l'apoptose, l'autophagie et l'anoïkis (Figure 24, Figure 25).

.3.2.1 *Nécrose, autophagie, anoïkis...*

La **nécrose** correspond à une **mort accidentelle**, qui survient généralement après un stress extracellulaire ou un dommage physique de la cellule. La nécrose se caractérise par une vacuolisation cytoplasmique et une perméabilité de la membrane plasmique induisant une perte du contenu intracellulaire. Il y a également un changement de la morphologie du noyau mais pas de condensation ni de fragmentation de l'ADN. La cellule éclate littéralement, ce qui déclenche une inflammation et la mise en jeu du système immunitaire (Kroemer et al., 2005).

L'**autophagie** est un **mécanisme de survie**, qui dans certaines conditions peut induire la mort cellulaire. Cette mort cellulaire est caractérisée par une absence de condensation de la chromatine et par la formation d'une vacuole cytosolique appelée l'autophagosome qui internalise les organelles cytoplasmiques, comme le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie. La fusion de cet autophagosome avec des lysosomes permet la dégradation et le recyclage des composants protéiques des organelles intracellulaires (Kroemer et al., 2005), (Glick et al., 2010).

La **catastrophe mitotique**, intervient suite à un défaut de mitose aboutissant à une mauvaise répartition des chromosomes dans les deux cellules filles. Les cellules sont notamment caractérisées par une condensation imparfaite des chromosomes et la présence de micronoyaux. La survenue de cet événement déclenche la mort cellulaire par apoptose ou par autophagie. La catastrophe mitotique survient en réponse à des dommages à l'ADN (agents alkylants : cisplatine, ... ou des irradiations), une inhibition des protéines impliquées dans la mitose (exemple l'Hesperadin qui bloque Aurora kinase) ou des poisons du fuseau (taxanes, vinca-alcanoïdes...) (Kroemer et al., 2005), (Vakifahmetoglu et al., 2008)...

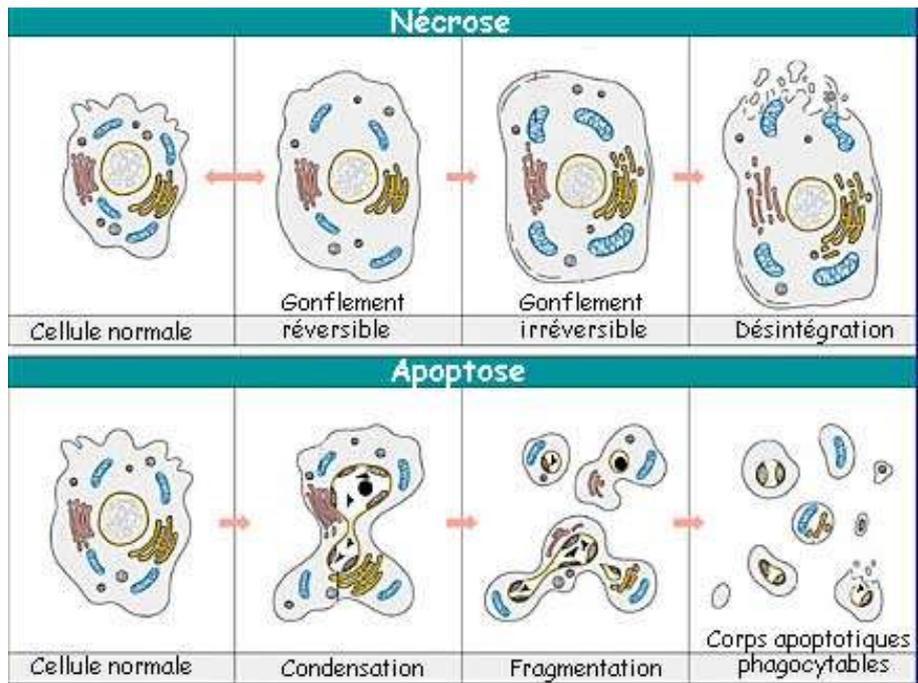


Figure 25 : schéma comparant les différentes phases de la nécrose et de l'apoptose

L'**anoïkis** est induite lors d'une perte d'adhérence des cellules avec la matrice extracellulaire ou avec d'autres cellules (Kroemer et al., 2005). Son dérèglement est notamment impliqué dans l'oncogenèse lors de l'invasion cellulaire, la migration et la formation de métastases (Chiarugi and Giannoni, 2008).

.3.2.2 L'apoptose

.3.2.2.1 Description générale

A la différence de la nécrose, **l'apoptose est une mort programmée**, qui pourrait s'apparenter à un suicide cellulaire. L'apoptose est la plus étudiée des morts cellulaires programmées. C'est un processus contrôlé au cours duquel des cellules sont éliminées de l'organisme (Figure 25).

Le terme apoptose, venant du grec « apoptosis » qui désignait la chute des feuilles des arbres, a été introduit en 1972 par Kerr *et al.*, (Kerr et al., 1972) pour nommer un nouveau type de mort cellulaire. Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont très différentes de celles de la nécrose. En effet, l'apoptose se caractérise par un bourgeonnement de la membrane plasmique, une diminution du volume cellulaire, une condensation de la chromatine suivie par une fragmentation de l'ADN, une exposition de phosphatylsérine (= phospholipide anionique) sur la face externe de la membrane plasmique (normalement présent sur la face interne), la sphingomyéline se déplace en sens opposé et devient accessible aux sphingomyélinases qui la dégradent et pour finir une dégradation protéique et la formation de corps apoptotiques (fragments de cellules entourés de membrane plasmique) qui seront phagocytés par les macrophages ou les cellules voisines, sans qu'il y ait d'inflammation tissulaire.

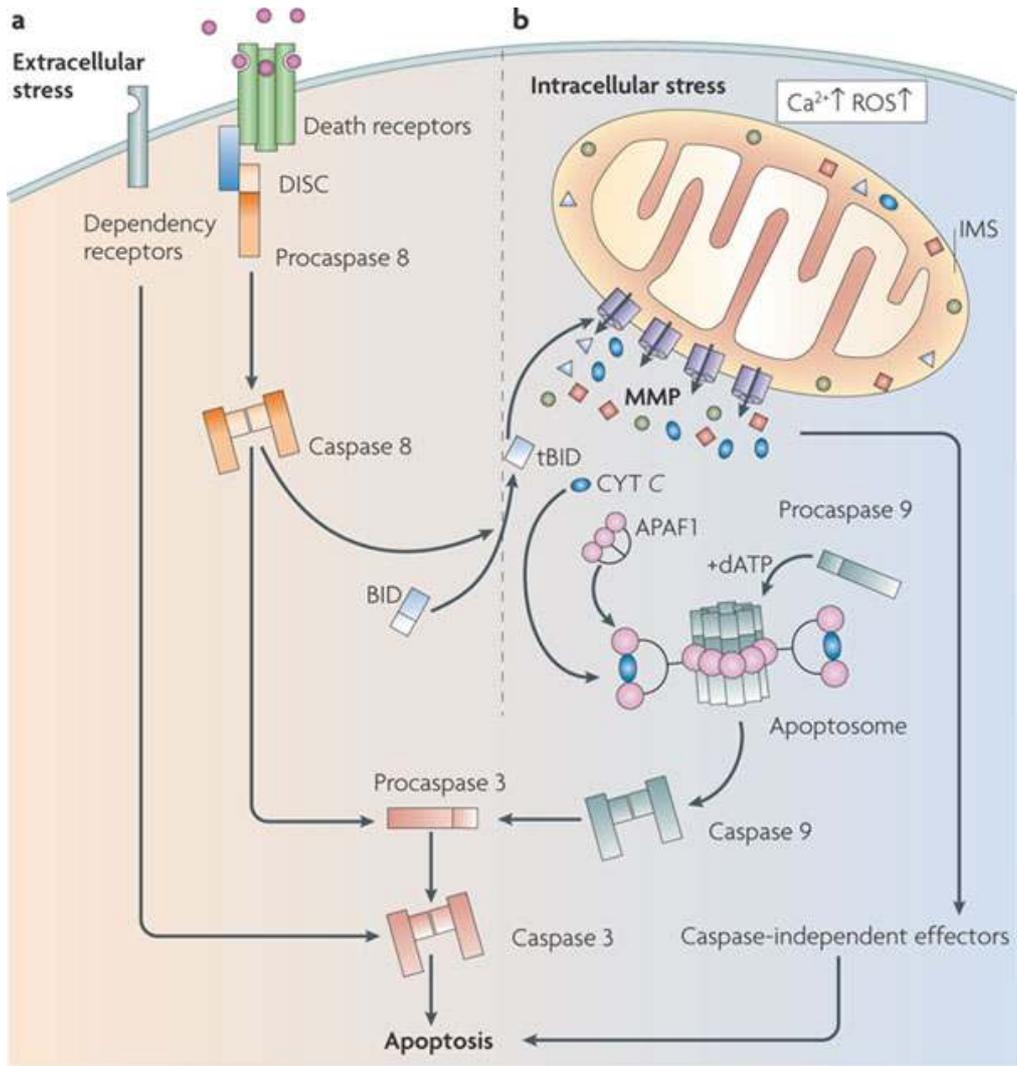


Figure 26 : schéma des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose (Galluzzi et al., 2009)

.3.2.2.2 Circonstances du déclenchement de l'apoptose

L'apoptose est un mécanisme physiologique mis en jeu tout au long de la vie. Il y a apoptose lors du développement embryonnaire lors de la disparition de l'appendice caudal chez le fœtus humain, pour l'individualisation des doigts (palmés dans la première partie de leur développement), ou la régression du bourgeonnement caudal (Horvitz and Sternberg, 1991). Il y a également apoptose lors de la cicatrisation ou à la fin de l'allaitement, ou encore pour permettre le maintien de l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules défectueuses (Vaux and Korsmeyer, 1999).

Plusieurs stimuli peuvent déclencher l'apoptose : des stimuli externes comme l'exposition à des pathogènes (pollution, UV, hypoxie, privation en facteurs de croissances...), mais également à des stimuli internes (mutations, cassures de l'ADN, accumulation de protéines mal conformées...). Selon la nature du stress, interne ou externe, deux voies de signalisation pourront être mises en jeu pour aboutir à l'apoptose (Figure 26).

.3.2.2.3 Les caspases : acteurs principaux de l'apoptose

Quelle soit d'origine intrinsèque ou extrinsèque, l'apoptose met en jeu le même type de protéines effectrices : les caspases pour « cysteinyl **asp**artate protease » (Alnemri et al., 1996). Les caspases sont des protéases ayant un domaine catalytique de type : QACXG (où X peut être un R, un Q ou un G) ce qui permet une spécificité de reconnaissance et de clivage de motif peptidique propre à chaque caspase mais contenant toujours un glutamate (E) en deuxième acide aminé et un aspartate (D) comme résidu final (Thornberry, 1998).

Les caspases sont exprimés de façon constitutive et ubiquitaire dans les cellules sous forme zymogène inactives, appelées pro-caspases, et sont constituées de trois domaines : un pro-domaine en N-terminal, une grande sous-unité nommée p20 (qui contient le site catalytique) et une petite sous-unité nommée p10. Le passage de pro-caspase inactive en caspase active se fait par clivage entre les deux sous-unités p20 et p10 et après élimination du pro-domaine inactif (Boatright and Salvesen, 2003). Les deux sous-unités p20 et p10 vont ensuite s'hétérodimériser. L'hétérodimère obtenu va se dimériser pour former une caspase active

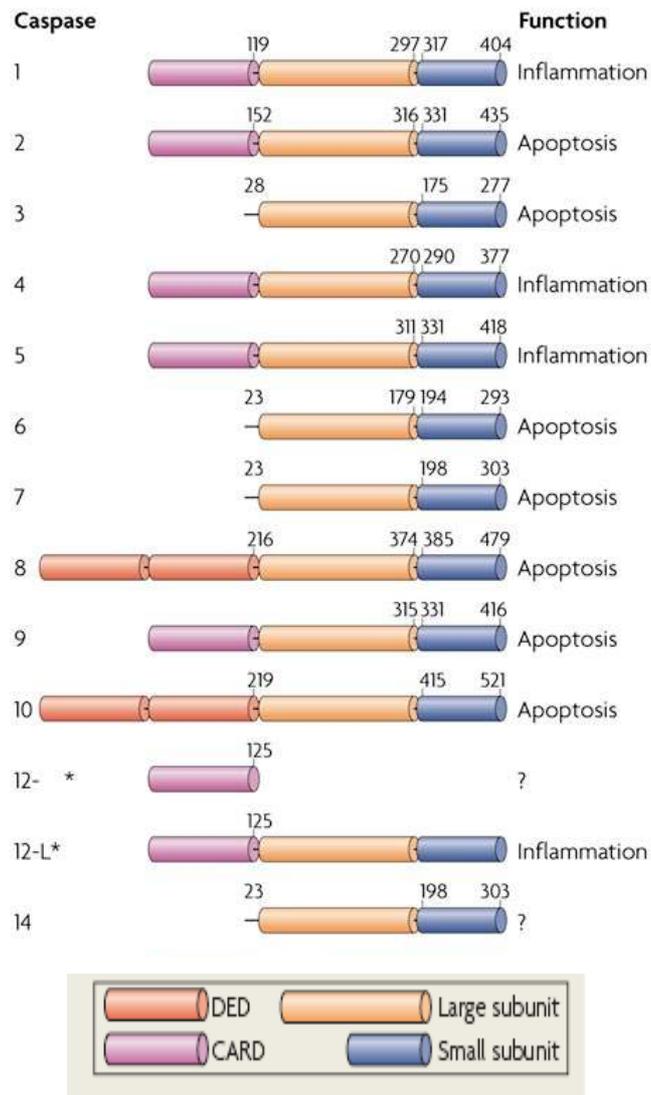


Figure 27 : structure des différentes caspases humaines impliquées soit, dans l'apoptose, soit dans l'inflammation (activation des cytokines) (Taylor et al., 2008)

contenant deux sous-unités p20 et deux p10. La caspase active a donc deux domaines catalytiques indépendants (Rotonda et al., 1996), (Wilson et al., 1994).

Il existe une quinzaine de caspases chez les mammifères parmi lesquelles on distingue **les caspases effectrices** qui clivent les protéines cibles, et **les caspases initiatrices** qui clivent et activent les caspases effectrices.

En effet, les caspases doivent être clivées par d'autres caspases ou d'autres protéines à activité protéolytique pour être actives, ceci aboutit à un mécanisme en cascade permettant l'amplification du signal initial et ainsi le déclenchement rapide de l'apoptose.

Il existe plusieurs membres de la famille des caspases initiatrices parmi lesquelles les caspases 2, 8, 9 et 10 qui, en plus des sous-unités p10 et p20 ont un domaine d'interaction protéine-protéine de type DED (Death Effector Domain) ou CARD (CASPase Recruitment Domain). Elles sont capables de s'auto-activer et clivent les caspases effectrices. Les caspases effectrices comme les caspases 3, 6 et 7 qui ne contiennent que les sous-unités p10 et p20, clivent les protéines du cytosquelette par exemple et qui sont responsable notamment des changements morphologiques observés au cours de l'apoptose (Figure 27).

Pourtant le clivage des pro-caspases en caspases n'aboutit pas automatiquement à la mort de la cellule. En effet, les protéines de la famille des IAP (pour Inhibitor of Apoptosis Protein) parmi lesquelles XIAP, la survivine (...) peuvent lier le site catalytique des caspases et inhiber leur action protéolytique. La régulation du niveau d'expression de ces IAP ou de leur localisation permet de moduler l'apoptose et représente un dernier rempart à la mort cellulaire programmée.

Les caspases mises en jeu peuvent varier selon qu'il y a déclenchement de la voie intrinsèque ou de la voie extrinsèque.

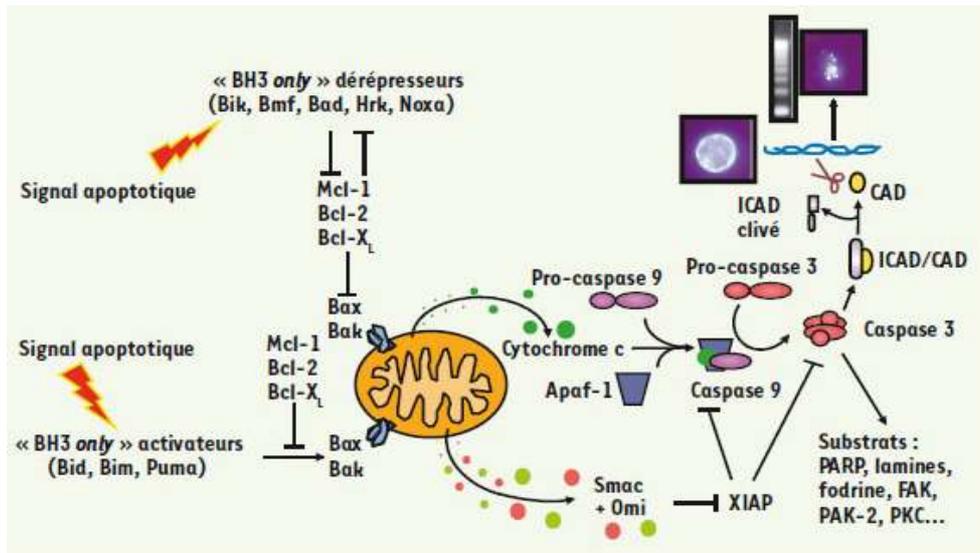


Figure 28 : voie intrinsèque de l'apoptose (Castanier and Arnoult, 2010)

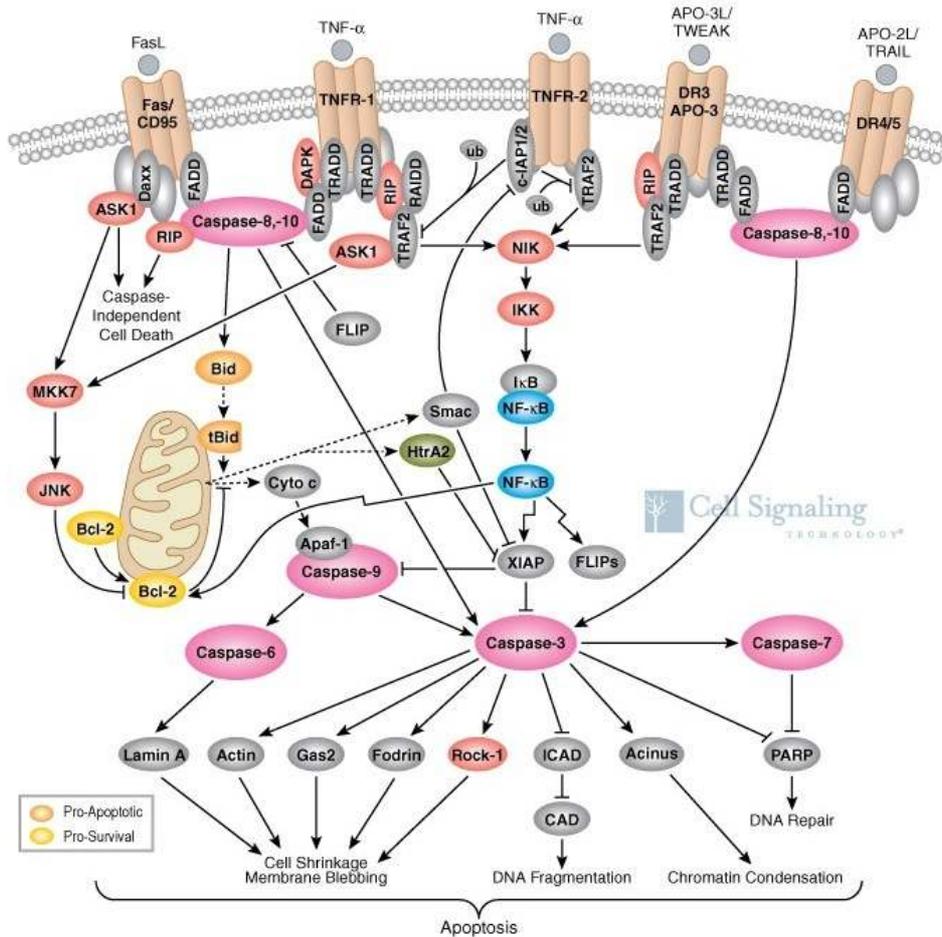


Figure 29 : différents types de récepteurs de mort mis en jeu lors de l'apoptose extrinsèque

.3.2.2.4 La voie intrinsèque ou mitochondriale

La **voie intrinsèque** de l'apoptose est déclenchée à la suite d'un **stress intracellulaire** et met en jeu la mitochondrie. En effet, la mitochondrie est un organite indispensable à la production d'énergie mais est également un acteur clé de l'apoptose (Figure 28).

Ainsi, à la suite d'un dommage à l'ADN (par exemple) il y a activation de P53 qui déclenche une cascade de signalisation faisant intervenir notamment les protéines PUMA, NOXA et BAX. Ces protéines engendrent plusieurs modifications majeures dont une **diminution du potentiel membranaire** et une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Cette perméabilisation permet le relargage de petites protéines solubles comme le **cytochrome c** de l'espace inter-membranaire mitochondriale vers le cytosol. Le cytochrome c qui peut alors se lier à la protéine APAF1 pour former un complexe multiprotéique de haut poids moléculaire : l'**apoptosome**. La formation de l'apoptosome entraîne le recrutement de la pro-caspase 9 via le domaine d'interaction CARD d'APAF1. Cette dimerisation entraîne l'activation de la caspase 9 qui ensuite pourra activer à son tour les caspases effectrices 3, 6 et 7 qui dégraderont les protéines cibles et déclencheront les phases morphologiquement observables de l'apoptose (Kluck et al., 1997), (Yang et al., 1997).

.3.2.2.5 La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

La **voie extrinsèque** est déclenchée à la suite d'un **stress extracellulaire**, qui va se traduire par la liaison d'un ligand sur les récepteurs de mort (Figure 29).

Les **récepteurs de mort** sont des récepteurs transmembranaires ayant deux à quatre domaines riches en cystéine : CRD (Cystein Rich Domain) dans la partie extracellulaire et un domaine de mort : Death Domain (DD) impliqué dans la transduction du signal apoptotique en intracellulaire. Il existe plusieurs types de récepteurs de mort : les récepteurs FAS (CD95) qui lient le FASLigand (FasL / CD95L) et les récepteurs TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) qui lient le TNF α et les récepteurs DR3, 4, 5 et 6 qui peuvent lier TRAIL (Schulze-Osthoff et al., 1998). L'interaction ligand-récepteur entraîne la trimerisation du récepteur et donc son activation. Une fois le récepteur activé, celui-ci va interagir via son domaine DD avec FADD, via TRADD (pour TRAIL) ou directement (pour Fas). FADD interagit avec la pro-caspase 8 (Medema et al., 1997), (Muzio et al., 1996), par le biais de son domaine DED ;

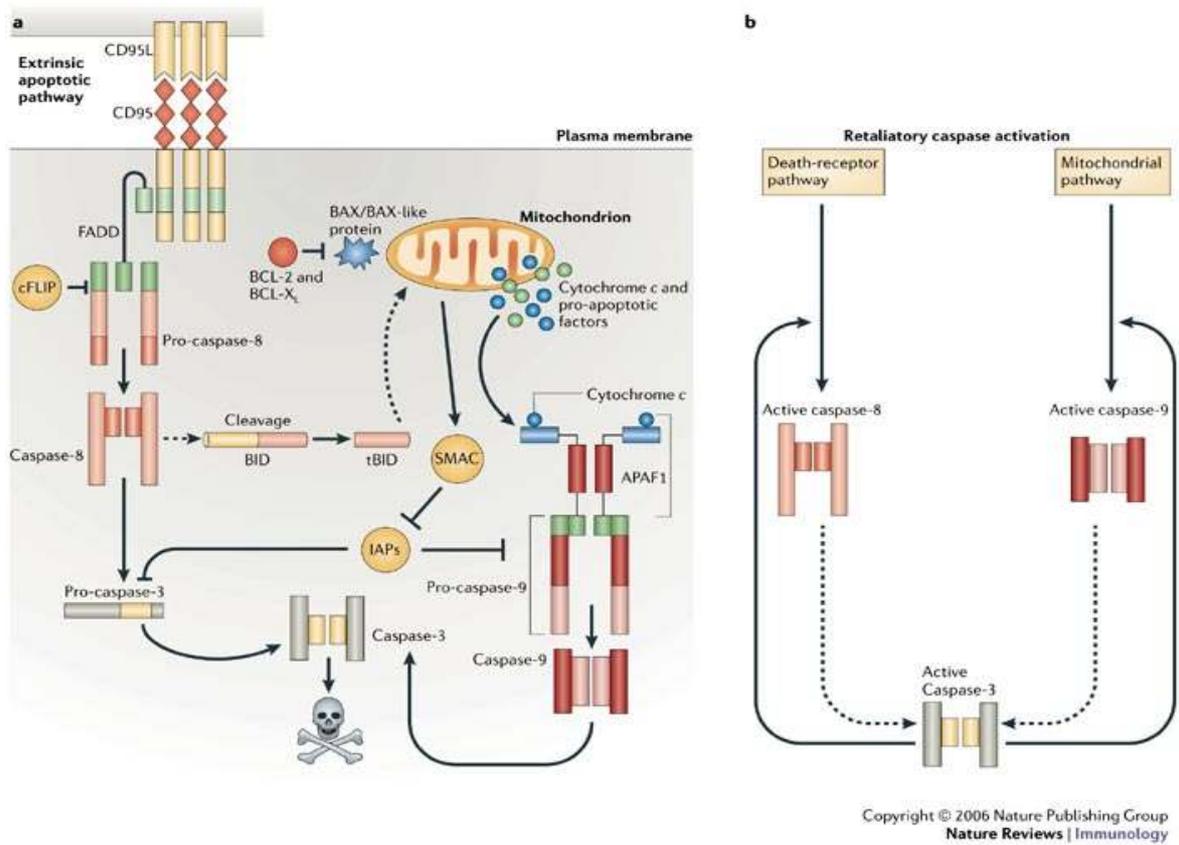


Figure 30 : boucle d'amplification de l'apoptose extrinsèque (Hotchkiss and Nicholson, 2006)

quant à TRADD (en cas d'activation du TNFR), il se lie à la pro-caspase 2 via les protéines RIP et RAID : ce complexe multiprotéique est appelé DISC pour Death Inducing Signalling Complex (Kischkel et al., 1995). La formation du DISC engendre l'activation des caspases 2 et 8 (Salvesen and Dixit, 1999).

Deux mécanismes pro-apoptotiques peuvent alors être déclenchés. Dans les cellules de type I, la caspase 8 active les caspases effectrices 3, 6 et 9. Dans les cellules de type II, la caspase 8 activée n'est pas en quantité suffisante pour activer les caspases effectrices, elle va alors cliver la protéine cytosolique BID (Li et al., 1998), en t-BID pour truncated Bid. t-BID se relocalise alors à la membrane externe mitochondriale et permettrait le déclenchement de la voie intrinsèque via une interaction avec BAX, l'activation des caspases effectrices se fait alors secondairement via la voie intrinsèque et la caspase 9 (Desagher et al., 1999), (Eskes et al., 2000). Ce dernier mécanisme permet également une amplification du signal pro-apoptotique des récepteurs de mort (Figure 30).

.3.2.3 Apoptose et cancer

Lorsque des dérèglements de ce processus surviennent cela aboutit à l'apparition de certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, la chorée de Huntington, (augmentation de l'apoptose) (Yuan and Yankner, 2000) ou des maladies auto-immunes et le cancer (diminution de l'apoptose) (Hanahan and Weinberg, 2000).

.4 PLAGL1 (pleiomorphic adenoma gene like 1)

.4.1 Circonstances de la découverte de ZAC1/LOT1/PLAGL1

En 1997, Abdollahi identifie une nouvelle protéine : LOT1 (Lost on transformation 1). Dans ce travail, il utilise des cellules ovariennes de rat (cellules ROSE) qui deviennent spontanément tumorales sous l'effet d'un stress. L'expression génétique des cellules malignes ainsi formées est comparée aux cellules ROSE d'origine. Ceci a permis de découvrir un gène exprimé dans les ROSE initiales mais dont l'expression est perdue dans les cellules transformées : *Lot1* (Abdollahi A et al., 1997).

La même année, en recherchant les gènes impliqués dans la régulation de l'expression du récepteur PAC1 au PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide), Spengler *et al.*, ont cloné un nouveau gène codant pour une protéine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose, nommée *Zac1* pour **Zinc-finger gene involved in Apoptosis and Cell-cycle control 1 gene** (Spengler et al., 1997) ; (Hoffmann et al., 1998). Le gène *Zac1* découvert lors de cette étude chez la souris code pour un facteur de transcription qui possède notamment **sept motifs doigts de zinc** formant un **domaine de liaison à l'ADN**, et un domaine riche en proline, acide glutamique et glutamine identifié comme un site potentiel d'interaction protéine-protéine.

Zac1 est l'orthologue murin de *Lot1* chez le rat. L'orthologue humain de *Zac1/Lot1* ayant une grande homologie de séquence avec les gènes de la famille *PLAG* pour pleiomorphic adenoma gene (*PLAG1* : PLeiomorphic Adenoma gene 1 et *PLAGL2* : PLeiomorphic Adenoma Gene Like 2), a été nommé **PLAGL1** pour **PLeiomorphic Adenoma Gene Like 1**. Spengler *et al.*, ont pu mettre en évidence que PLAGL1 possédait des caractéristiques fonctionnelles proches de celles de **P53** (Spengler et al., 1997). En effet, tout comme **P53**, **PLAGL1** est capable d'induire un arrêt de la division cellulaire ainsi que l'apoptose de plusieurs lignées

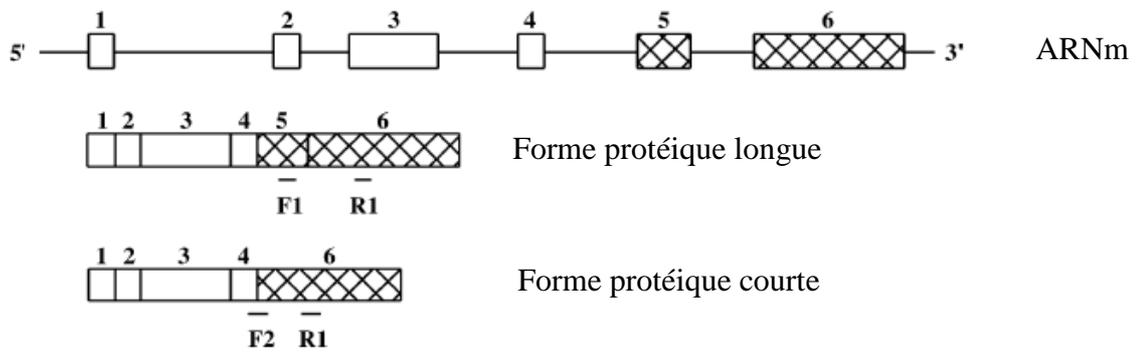


Figure 31 : comparaison des deux isoformes protéiques de PLAGL1 par rapport aux exons de l'ARNm (Poulin and Labelle, 2005)



Figure 32 : représentation schématique de PLAGL1: Zinc finger region [(C2H2)₇], linker région (*linker*); Pro/Gln/Glu-riche région (*PQE*), et COOH terminaison (*C-ter*), Nucléotides (Nt)

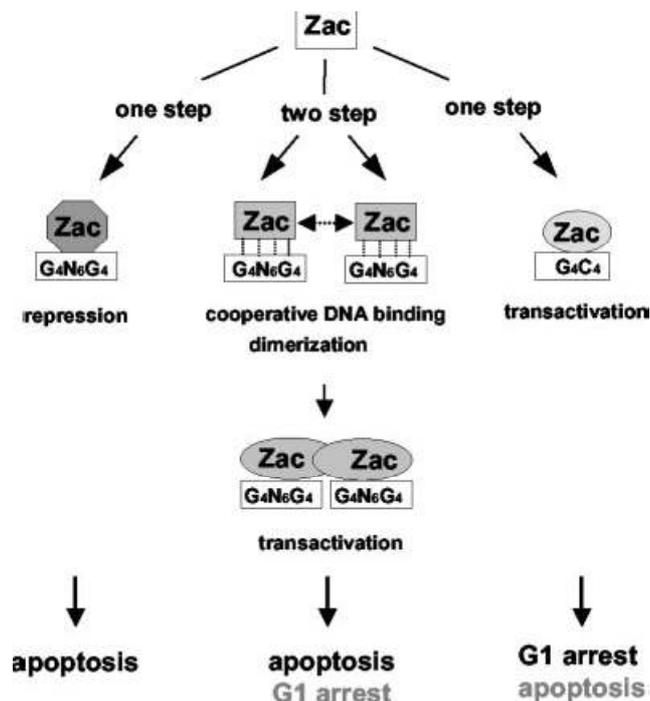


Figure 33 : mode d'action de PLAGL1 (ZAC) selon son site de fixation sur les promoteurs (Hoffmann et al., 2003)

cellulaires tumorales *in vitro*. *In vivo*, **il empêche la formation de tumeur chez les souris « nude » xénogreffées.**

Le gène *Tp53* étant jusqu'alors le seul connu à réunir ces deux activités, *PLAGL1* a donc été pressenti comme un nouveau gène candidat dans la formation de certains types de tumeurs dans le cas où il serait inactivé par mutation ou délété.

.4.2 Expression et caractéristiques de ZAC1/LOT1/PLAGL1

Contrairement à *Zac1* de souris, exprimé exclusivement dans l'hypophyse et certaines régions cérébrales, et à *Lot1* chez le rat qui est essentiellement exprimé dans l'utérus, les testicules, les ovaires et le pancréas (Van Dyck et al., 2007) ; l'ARNm de *PLAGL1* est exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus normaux comme la rate, le poumon, le système lymphatique, le placenta, le pancréas (Kas et al., 1998), (Varrault et al., 1998), (Bilanges et al., 1999), (Abdollahi et al., 1997).

Chez l'Homme, l'ARNm de *PLAGL1* subit un épissage alternatif qui donne naissance à 8 isoformes d'ARNm. Ces isoformes d'ARNm une fois traduites permettent la formation de 2 protéines, l'une de 46kDa et l'autre de 51kDa (Figure 31) (Bilanges et al., 2001). Ainsi *PLAGL1* code pour un facteur de transcription à 7 doigts de zinc de type C2H2 de 463 acides aminés pour la forme longue et 406 pour la forme courte, capable de se lier à un motif G4C4 de l'ADN (Figure 32, Figure 33). La protéine correspondante se lie à l'ADN et a une activité transcriptionnelle (Hoffmann et al., 2003).

En 2001, Bilanges *et al.*, mettent en évidence et étudient ces deux isoformes. Ils montrent, par de multiples expériences sur des lignées de cancer du sein et des lignées épithéliales de rein, que les deux protéines ont la même capacité à réprimer la formation de colonies, mais un rôle différent dans l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. En effet, la forme courte de *PLAGL1* est plus efficace pour induire l'arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 tandis que la forme longue est plus prompte à induire l'apoptose. La forme courte de la protéine est délétée des deux premiers motifs à doigt de zinc mais a toujours une localisation nucléaire et les mêmes capacités de liaison à l'ADN que la forme longue suggérant que le domaine de liaison à l'ADN se situerait dans les doigts de zinc 3 à 7 (Bilanges et al., 2001).

Bilanges *et al.*, montrent également une expression ubiquitaire de ces deux isoformes, mais un ratio différent en fonction des individus et du tissu considéré.

.4.3 Voies de signalisation impliquant ZAC1/LOT1/PLAGL1

En 1999, Ciani *et al.*, étudient le rôle de ZAC1 et P53 dans l'activation de PAC1R ainsi que leur effet sur l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. Dans ce travail, ils montrent que l'effet de PLAGL1 et P53 sur l'**apoptose** et le **cycle cellulaire** est dépendant du niveau d'expression de ces deux protéines (qui conditionnent l'expression de PAC1R). Ainsi une faible expression de PLAGL1 et P53 induirait plutôt un arrêt du cycle alors qu'une expression forte induirait l'apoptose (Ciani et al., 1999).

PLAGL1 et P53 ont des fonctions antiprolifératives très similaires, et leurs interactions possibles ont été très étudiées. Ainsi, en 2001, Huang *et al.*, démontrent que P53 peut réguler l'expression de *Zac1* et inversement, ZAC1 peut stimuler l'expression de *Tp53*. Dans cette étude faite chez la souris, un plasmide rapporteur est utilisé et contient 13 fois la séquence de liaison de P53 en amont de la luciférase. La transfection de ce plasmide, dans des cellules HCT116, et d'un plasmide codant pour ZAC1 entraîne une potentialisation de l'induction de la luciférase en présence de P53 et ZAC1 par rapport à P53 seul. Ceci montre que ZAC1 agit comme un co-activateur pour p53. Des expériences de GST pull-down ont aussi permis de mettre en évidence une interaction directe entre P53 et ZAC1 murins (Huang et al., 2001). L'action co-activatrice de ZAC1 vis-à-vis de P53 a également été mise en évidence pour l'induction de *P21^{waf}* un gène cible de P53 (Huang et al., 2001), (Liu et al., 2008).

D'autre part, des expériences de gène rapporteur utilisant la luciférase en amont de laquelle le promoteur d'*Apaf-1* (un gène impliqué dans la formation de l'apoptosome lors de la mise en jeu de la voie intrinsèque de l'apoptose) a été cloné, montrent que ZAC1 agit comme un co-activateur de P53 pour stimuler l'expression d'*Apaf-1*. De plus, le promoteur de *Zac1* contient des séquences de liaison de P53, des expériences de retard sur gel ont donc été réalisées et ont permis de montrer que P53 pouvait se lier au promoteur de *Zac1* (Huang et al., 2001), (Rozenfeld-Granot et al., 2002).

PLAGL1 peut interagir avec P53 mais également avec P73 l'homologue de P53 et ce pour stimuler, avec P300 et PCAF, l'expression du gène cible de *Tp53*: *P21^{CIP1/KIP1}* (ou *Cdkn1a*) (Anke and Dietmar, 2008).

De façon très intéressante, l'expression de *PLAGL1*/*LOT1* est régulée négativement par l'**Epidermal Growth Factor** (EGF) suggérant qu'il pourrait être impliqué dans le rétrocontrôle de la prolifération cellulaire activée par les mitogènes (Abdollahi et al., 2003).

Dans les cellules hypophysaires tumorales, l'inhibition de l'expression de *PLAGL1* par les siRNA augmente la prolifération et inversement, l'octréotide (un analogue de la somatostatine) inhibe leur prolifération en induisant l'expression de *PLAGL1* via l'activation de la GSK3 β et ce, de façon P53 dépendante (Theodoropoulou et al., 2009). Enfin, ZAC1 en coopération ou non avec P53 pourrait réguler l'expression du gène *PPARG* (Barz et al., 2006).

PLAGL1 régule différents gènes soumis à l'empreinte parentale comme *IGF2*, *H19* et *DLK1* qui sont tous impliqués dans la tumorigenèse et dans le développement aux stades précoces (Varrault et al., 2006). *PLAGL1*, *P57^{kip2}* (*Cdkn1c*) et *LIT1* (*Kcnq1ot1*) forme un réseau de gènes soumis à l'empreinte parentale qui sont susceptibles de jouer un rôle dans le syndrome Beckwith-Wiedemann (Arima et al., 2005).

.4.4 Localisation chromosomique de *PLAGL1*

De façon remarquable, *PLAGL1* se situe sur le chromosome 6q24-q25, une région **fréquemment délétée** dans beaucoup de tumeurs et soupçonnée de contenir un gène **suppresseur de tumeur**. En effet, la perte d'hétérozygotie au niveau de 6q24-q25 est rencontrée dans les cancers du sein et de l'ovaire, les mélanomes, les astrocytomes et les carcinomes du rein (Bilanges et al., 1999), (Casorzo et al., 2005), (Basyuk et al., 2005). De même, il a été récemment montré que le 6q était très remanié dans les sarcomes et les lymphomes B, puisque des délétions, mais aussi des amplifications du bras long du chromosome 6 ont pu être constatées dans ces tumeurs (Wallrapp et al., 1997), (Chibon et al., 2004), (Simons et al., 2000). De nombreuses études ont pu relier ces remaniements (surtout les délétions) du 6q avec une progression tumorale accrue et une grande agressivité tumorale (Miyakawa et al., 2000), (Acevedo et al., 2002), (Hansen et al., 2002), (Healy et al., 1998). De plus, une étude visant à rechercher des délétions chromosomiques de la région du 6q dans du tissu péri-tumoral de tumeurs épithéliales ovariennes, a permis de mettre en évidence une délétion du 6q24-27 dans les tumeurs mais également dans le tissu péri-tumoral laissant

suggérer que cette délétion conduirait à la **perte d'un gène suppresseur** de tumeur impliqué dans les phases précoces de la **tumorigenèse** (Tibiletti et al., 2001).

Aussi, les propriétés fonctionnelles de PLAGL1 et la localisation chromosomique de son gène en font un bon candidat pour être le gène suppresseur de tumeur de la région 6q24-q25.

.4.5 Dérégulation de l'expression de PLAGL1 dans diverses pathologies

.4.5.1 Expression de PLAGL1 dans les cancers

Des études effectuées par RT-PCR en temps réel, des PCR sur microsatellites et Northern blot sur des lignées cellulaires ou des échantillonnages restreints de tumeurs (inférieurs à 30 échantillons), ont montré que la **perte ou la sous-expression de PLAGL1** était observée dans une large proportion de tumeurs.

Des délétions de la région chromosomique contenant le gène *PLAGL1* ont été identifiées dans de nombreux cancers comme le phéochromocytome, l'hémangioblastome capillaire, les cancers du sein, de l'ovaire, du pancréas, ou encore dans les adénomes hypophysaires non sécrétants (Bilanges et al., 1999), (Lemeta et al., 2007), (Lemeta et al., 2006).

A ce jour, les causes connues de cette sous-expression de *PLAGL1* sont la **méthylation de son promoteur** et la **perte d'hétérozygotie**. En revanche, **aucune mutation** de *PLAGL1* n'a encore été décrite (Abdollahi et al., 1999), (Abdollahi et al., 2003), (Bilanges et al., 1999). Tout ceci suggère un rôle de *PLAGL1* dans le développement tumoral.

Une étude publiée en 2005 par H. Poulin, montre l'implication de *PLAGL1* dans le chondrosarcome myxoïde extrasquelettique (EMC) (Poulin and Labelle, 2005). Ce type de tumeur est caractérisé par une translocation t(9 ; 22) qui donne naissance à une protéine de fusion EWS/NOR1. Dans ce travail, les auteurs ont transformé des chondrocytes primaires en modèle d'EMC en faisant des clones stables exprimant la protéine de fusion EWS/NOR1. Ils ont ensuite comparé le niveau d'expression des ARNm des clones transformés par rapport aux cellules normales. Ceci a permis de mettre en évidence une perte d'expression de *PLAGL1* dans le clone exprimant EWS/NOR1, alors que l'ARNm de *PLAGL1* est fortement exprimé dans les chondrocytes normaux. Ceci laisse penser que *PLAGL1* a un rôle prédominant dans la transformation maligne des cellules à l'origine des EMC (Poulin and Labelle, 2005).

L'ensemble de ces études tend à démontrer un rôle précoce de *PLAGL1* dans l'étiologie de certains cancers.

*.4.5.2 Expression de *PLAGL1* dans d'autres pathologies*

L'expression de *PLAGL1* a également été reliée à d'autres pathologies que des tumeurs, comme un retard de croissance et le TNDM (Transient Neonatal Diabetes Mellitus) (Varrault et al., 2001), (Kamiya et al., 2000).

Le TNDM est une pathologie rare qui se caractérise par un retard de croissance *in utero*, une macroglossie, une hernie ombilicale, une déshydratation, une hyperglycémie et une absence de cétose due à un défaut de sécrétion d'insuline. Le traitement consiste en l'injection régulière d'insuline. Ce type de diabète se manifeste dans les premières semaines de vie et dure en général jusqu'à l'âge de 18 mois, mais des rechutes temporaires peuvent survenir au cours de l'adolescence. Les femmes atteintes de TNDM ont un plus fort risque de diabète gestationnel que la normale.

Le TNDM est une pathologie liée à l'empreinte parentale d'un gène du chromosome 6 (Temple et al., 1996), (Gardner et al., 1999). C'est en 2000 que l'un des principaux gènes responsables de cette pathologie a pu être identifié : *PLAGL1* (Arima et al., 2001), (Kamiya et al., 2000). En effet, chez les patients atteints de TNDM, on peut noter **une surexpression de *PLAGL1*** pouvant expliquer les altérations du fonctionnement du pancréas et de l'hypophyse observés dans le TNDM. Dans ces deux organes, il a été montré que *PLAGL1* pouvait réguler l'expression du récepteur du PACAP, impliqué dans la sécrétion de l'insuline par *PLAGL1* (Ma et al., 2004). Cette surexpression peut être due à une **unidisomie du chromosome 6, une duplication de l'allèle paternel ou une déméthylation de l'allèle maternel.**

Une surexpression de *PLAGL1* par hypométhylation de son promoteur a également été montrée dans le syndrome Beckwith-Wiedemann (Bliek et al., 2009).

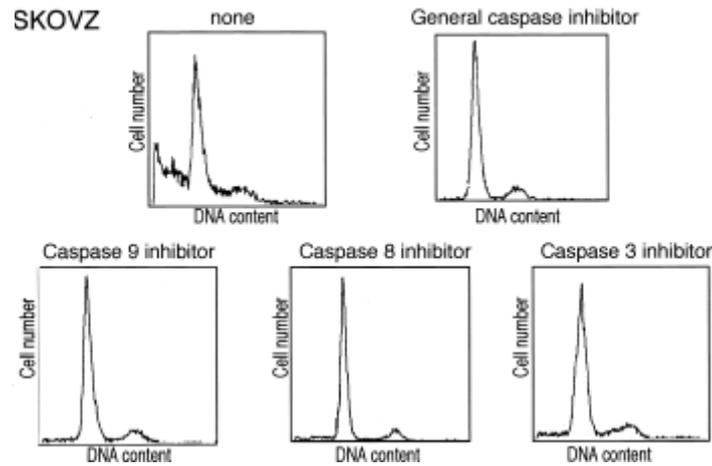


Figure 34 : inhibition de l'apoptose induite par PLAGL1 avec les inhibiteurs de caspases dans des cellules SKOVZ (cellules SKOV, issues de d'une tumeur ovarienne exprimant PLAGL1) d'après Kamikihara *et al.*, (Kamikihara et al., 2005)

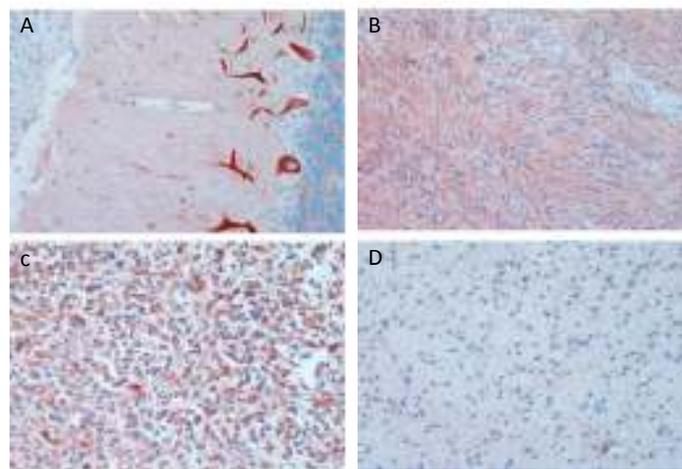


Figure 35 : immunohistochimie, expression de PLAGL1 dans les cellules de Purkinje (A), un méningiome (B), un GBM (C) et un astrocytome de bas grade (D) (Lemeta et al., 2007)

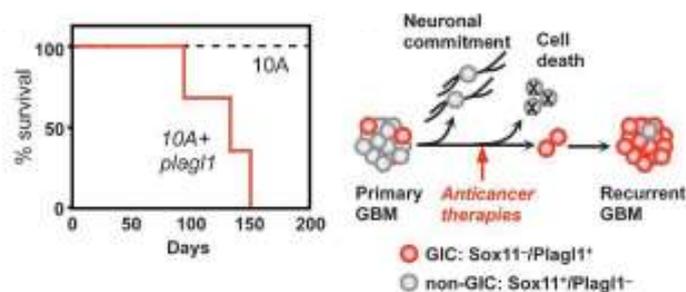


Figure 36 : implication de PLAGL1 dans la tumorigenèse. Diminution de la survie de souris xenogreffées avec des cellules 10A transfectées avec un plasmide vide (pointillé) (Hide et al., 2009)

.4.6 Fonctions de la protéine ZAC1/LOT1/PLAGL1

Comme son homologue de souris, PLAGL1 humain possède un rôle antiprolifératif en induisant l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, chez la souris la perte d'expression de PLAGL1 au cours du développement de la rétine induit une diminution de la mort cellulaire et une augmentation de la prolifération cellulaire (Ma et al., 2007). Dans les cellules humaines l'exprimant après transfection, PLAGL1 induit un arrêt de la prolifération et l'apoptose (Spengler et al., 1997). En 2005, Kamikihara *et al.*, montrent que l'apoptose induite par PLAGL1 provoque une activation des caspases 3, 8 et 9 indiquant une possible mise en jeu de la **voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose** (Kamikihara et al., 2005) et que le déclenchement de cette voie de signalisation est **indépendante de P53** car PLAGL1 est capable d'induire l'apoptose même dans les cellules déficientes pour P53 (Figure 34).

Cependant, l'article de Lemeta *et al.*, paru en 2007 montre par immunohistochimie une surexpression de PLAGL1 dans les GBM alors que PLAGL1 n'est pas exprimé dans les astrocytomes de bas grade ; une expression de PLAGL1 est retrouvée dans les cellules de Purkinje et dans les méningiomes (Lemeta et al., 2007). Les auteurs n'expliquent pas cette **surexpression dans les tumeurs cérébrales** (Figure 35).

Mais, dans un article publié en 2009, Hide *et al.*, montrent que le gène *SOX11*, qui est exprimé au cours du développement dans les cellules précurseurs neuronales, induit la différenciation neuronale et inhibe la prolifération cellulaire (Hide et al., 2009). *SOX11* est également capable de réprimer l'expression de *PLAGL1*. Or, l'expression de *SOX11* est perdue dans les glioblastomes multiformes (GBM) entraînant une surexpression de *PLAGL1*. De façon surprenante, les auteurs montrent que les patients qui surexpriment *PLAGL1* ont une survie plus courte que les patients n'exprimant pas *PLAGL1*. Ces observations ont été confirmées par des études *in vivo* chez la souris nude xénotreffée avec des cellules souches cancéreuses neuronales exprimant ou non *PLAGL1* (Figure 36). Dans cette étude, les auteurs concluent que *PLAGL1*, bien qu'initialement qualifié de tumeur suppresseur, pourrait avoir un rôle différent selon le tissu dans lequel il s'exprime. Ils rappellent, à ce propos, que *PLAGL1* est exprimé dans de nombreuses structures cérébrales caractérisées par une prolifération importante, comme les zones ventriculaires et sous-ventriculaires qui présentent peu de cellules apoptotiques (Spengler et al., 1997), (Valente et al., 2005), (Valente and Auladell, 2001).

Dans ces articles, pour la première fois le rôle de *PLAGL1* comme **suppresseur de tumeur** est **remis en cause** et semble dépendre du tissu considéré, ainsi, **dans le cerveau**, *PLAGL1* aurait plutôt un rôle d'**oncogène**.

.4.7 Régulation de l'expression de PLAGL1 par méthylation de son promoteur

Il est établi que *PLAGL1* est un gène soumis à l'**empreinte parentale**. Comme cité plus haut (paragraphe .1.3, page 77), l'empreinte parentale est un mécanisme de régulation de l'expression des gènes qui repose sur des **modifications épigénétiques** telles que la **méthylation de l'ADN** ou les **modifications post-traductionnelles d'histones**. *PLAGL1* subit une empreinte maternelle qui induit une **expression monoallélique paternelle**. Dans les cellules saines, l'allèle maternel de *PLAGL1* est méthylé donc réprimé contrairement à l'allèle paternel qui s'exprime.

Jusqu'à récemment, un seul promoteur de *PLAGL1* était connu, ce promoteur P1 contient un îlot CpG. La répression monoallélique de *PLAGL1* dans les cellules saines se fait par méthylation des 118 dinucléotides CpG que compte cet îlot. L'expression monoallélique de *PLAGL1* a lieu dans la quasi-totalité des tissus humains (peau, placenta, tissus fœtaux...) mais récemment une expression biallélique de *PLAGL1* a été mise en évidence dans les cellules sanguines. Ceci suggère l'existence d'un deuxième promoteur.

Ainsi, en 2007, Valleley *et al.*, montrent l'existence d'un deuxième promoteur de *PLAGL1* appelé P2 qui, bien qu'ayant également un îlot de 113 dinucléotides CpG, n'ai pas soumis à l'empreinte parentale (Valleley *et al.*, 2007). Donc le promoteur P1 soumis à l'empreinte permettrait l'expression des deux isoformes protéiques PLAGL1 dans la quasi-totalité des tissus humains alors que le promoteur P2 permettrait une expression bi-allélique des deux isoformes de la protéine PLAGL1 dans les leucocytes.

Ainsi, hormis dans les leucocytes, le promoteur P1 de *PLAGL1* est hémiméthylé dans les cellules saines, mais son profil de méthylation est altéré dans certaines pathologies comme le TNDM, le syndrome Beckwith-Weidemann et de nombreux cancers (Blik *et al.*, 2009).

Gene	Location	CpG island size (bp)	No. CpG	% CpG	No. GpC	% GpC	% C+G	Obs/Exp CpG*	CpG/GpC ratio
SMAP1	6q12-q13	793	95	24.0	113	28.5	73.9	0.88	0.84
TTK	6q13-q21	419	39	18.6	44	21.0	63.2	0.94	0.89
RRAGD	6q15-q16	1,469	169	23.0	177	24.1	74.1	0.85	0.95
MAP3K7	6q16.1-q16.3	723	67	18.5	58	16.0	64.0	0.91	1.16
AIM1	6q21	1,221	119	19.5	142	23.3	69.1	0.82	0.84
CCNC	6q21	706	61	17.3	59	16.7	62.7	0.88	1.03
CDC40	6q21	941	104	22.1	112	23.8	70.1	0.91	0.93
NR2E1	6q21	4,868	328	13.5	465	19.1	60.6	0.74	0.71
REV3L	6q21	1,952	224	23.0	255	26.1	70.1	0.94	0.88
PEX7	6q21-q22.2	810	91	22.5	97	24.0	68.6	0.96	0.94
KIAA1919	6q22	524	51	19.5	67	25.6	67.9	0.85	0.76
MYB	6q22-q23	2,257	212	18.8	275	24.4	65.8	0.87	0.77
TBPL1	6q22.1-q22.3	1,534	116	15.1	119	15.5	60.6	0.83	0.97
PTPRK	6q22.2-23.1	1,968	173	17.6	207	21.0	65.5	0.82	0.84
MAP3K5	6q22.33	1,69	187	22.1	236	27.9	70.5	0.90	0.79
TNFAIP3	6q23	1,316	121	18.4	149	22.6	65.4	0.86	0.81
CTGF	6q23.1	740	103	27.8	114	30.8	75.1	1.01	0.90
IL20RA	6q23.3	827	104	25.2	128	31.0	75.7	0.88	0.81
PEX3	6q23-q24	474	47	19.8	54	22.8	64.8	0.95	0.87
TCF21	6q23-q24	579	51	17.6	69	23.8	68.0	0.76	0.74
PERP	6q24	628	87	27.7	99	31.5	74.7	1.00	0.88
FUCA2	6q24	554	55	19.9	69	24.9	68.8	0.84	0.80
GPR126	6q24.1	870	91	20.9	113	26.0	72.2	0.80	0.81
AIG1	6q24.2	474	52	21.9	54	22.8	70.5	0.90	0.96
RAB32	6q24.3	945	106	22.4	127	26.9	73.7	0.83	0.83
SASH1	6q24.3	1,044	103	19.7	118	22.6	65.2	0.93	0.87
PLAGL1	6q24-q25	931	118	25.3	138	29.6	74.0	0.93	0.86
LATS1	6q24-q25.1	776	84	21.6	106	27.3	72.6	0.83	0.79
SYNE1	6q25	662	74	22.4	90	27.2	74.3	0.82	0.82
AKAP12	6q25.1	1,267	132	20.8	172	27.2	69.8	0.86	0.77
MTHFD1L	6q25.1	1,365	173	25.3	206	30.2	76.2	0.87	0.84
RBM16	6q25.1-q25.3	1,217	140	23.0	162	26.6	73.0	0.86	0.86
CNKSR3	6q25.2	1,441	141	19.6	171	23.7	69.5	0.82	0.82
PNLDC1	6q25.3	347	37	21.3	46	26.5	68.9	0.93	0.80
SOD2	6q25.3	1,306	135	20.7	182	27.9	71.3	0.82	0.74
SYNJ2	6q25.3	1,372	156	22.7	183	26.7	72.5	0.87	0.85
SYTL3	6q25.3	603	73	24.2	83	27.5	74.5	0.87	0.88
ACAT2	6q25.3-q26	1,341	125	18.6	153	22.8	66.0	0.86	0.82
WTAP	6q25-q27	1,336	149	22.3	175	26.2	71.0	0.89	0.85
MAP3K4	6q26	1,187	143	24.1	149	25.1	66.6	1.12	0.96
DACT2	6q27	814	91	22.4	114	28.0	71.0	0.90	0.80
PDCD2	6q27	639	77	24.1	105	32.9	74.2	0.88	0.73
PHF10	6q27	1,615	255	31.6	279	34.6	80.7	1.00	0.91

Tableau 3 : gènes du 6q ayant un îlot CpG susceptible d'être méthylé (Tessema et al., 2008)

Plusieurs cancers, tels que les cancers du sein ou de l'ovaire, sont caractérisés par une **hyperméthylation du promoteur de *PLAGLI*** due soit à une méthylation de l'allèle paternel (plus aucun allèle ne s'exprime), soit à une perte d'hétérozygotie (perte de l'allèle paternel) (Bilanges et al., 1999).

Cette **hyperméthylation** du promoteur de *PLAGLI* provoque sa **perte d'expression**, ce qui a pour conséquence une **diminution de l'apoptose** favorisant ainsi la prolifération cellulaire et donc la **progression tumorale**. Ainsi, le traitement de plusieurs lignées cellulaires à la 5-azacytidine et/ou à la TSA permet de démétyler le promoteur de *PLAGLI* et de réexprimer son gène (Bilanges et al., 1999) ; (Kamikihara et al., 2005).

De plus, *PLAGLI* est localisé en 6q24-25 une région appartenant à un groupe de gènes soumis à l'empreinte parentale. Or, il a été montré dans le cancer du poumon qu'une partie des gènes du 6q23-25 arborent un défaut de méthylation de leur promoteur, suggérant une **régulation commune de tout ou partie de ce cluster de gènes**, par ailleurs régulés par la méthylation de leur propre îlot CpG. De cette façon, un deuxième niveau de régulation de l'expression de *PLAGLI* pourrait s'opérer (Tessema et al., 2008) (Tableau 3).

.4.8 Conclusion

PLAGLI est un gène découvert récemment qui présente une expression ubiquitaire chez l'Homme. La présence de **deux promoteurs** permet son expression de façon tissu-spécifique. Ainsi, le promoteur P2 conditionne l'expression de *PLAGLI* dans les leucocytes, alors que le promoteur P1 permet l'expression de *PLAGLI* dans les autres tissus de l'organisme.

Bien que la régulation de l'expression de *PLAGLI* par **méthylation de l'ADN** ait été largement étudiée, son mode d'action reste encore à élucider. Le gène *PLAGLI* code pour un facteur de transcription à doigts de zinc décrit initialement comme un **suppresseur de tumeur** puisqu'il est capable d'induire l'arrêt du **cycle cellulaire** et l'**apoptose**, mais plusieurs articles récents suggèrent un **rôle oncogénique** de *PLAGLI* dans certains tissus, cérébraux notamment. La fonction de *PLAGLI* laisse supposer que ce gène ait un rôle dans la tumorigenèse, mais à ce jour, peu d'études cliniques ont été effectuées et elles ne concernent qu'un faible nombre d'échantillons.

.5 Modèle d'étude : les sarcomes des tissus mous

Les tissus mous relient, soutiennent et entourent les organes du corps humain. Ils se trouvent entre la peau et les organes internes. Ils comprennent différents tissus tels que les muscles, les tendons, les tissus adipeux et fibreux ainsi que les structures articulaires ou le tissu nerveux. Les **sarcomes des tissus mous** (STS) sont des tumeurs malignes se développant au dépend de ces tissus de soutien.

Les STS sont des cancers très **rare**s, puisqu'ils représentent environ 0,5 à 1 % de tous les cancers diagnostiqués. En France, il y a environ 1000 nouveaux cas par an.

Les sarcomes touchent légèrement plus les hommes que les femmes et les sujets de plus de 60 ans excepté les rhabdomyosarcomes touchant plus particulièrement les enfants. Il n'existe pas de dominance géographique ou ethnique. Les sarcomes concernent préférentiellement les membres inférieurs (40 % des cas), les membres supérieurs (15 % des cas), le tronc ou abdomen (30 % des cas) et la tête et le cou dans 15 % des cas.

.5.1 Facteurs de risque

Des études ont montré que des expositions à de l'acide phénoxyacétique contenu dans des herbicides, au chlorophénol utilisé dans la conservation du bois ou à des hautes doses de radiation (médicales ou accidentelles) augmentaient le risque de développer un STS. Certaines maladies génétiques peuvent, dans de rares cas, engendrer l'apparition de sarcomes, c'est le cas pour la neurofibromatose de type I, le syndrome de Li-Fraumeni, le syndrome de Gardner et le syndrome de Werner. Certaines infections virales peuvent également causer des sarcomes, comme le virus Epstein-Barr (EBV) ou le VIH, impliqués dans la survenue de sarcomes de Kaposi.

.5.2 Récidive

Les sarcomes peuvent envahir les tissus et les organes voisins en formant des tumeurs secondaires (métastases). Le taux de survie des patients dépend notamment de la taille de la tumeur primaire et de la présence de métastases. En effet, le pronostic de survie à 5 ans est de 80 %

pour les tumeurs de 5 cm (grade T1) et tombe à 40 % pour les tumeurs de plus de 15 cm (grade T2). Mais le facteur pronostique le plus important est le grade de différenciation, coté de I à III en fonction de :

- l'index mitotique,
- la différenciation cellulaire,
- la présence de nécrose.

D'autres facteurs sont également à prendre en compte comme par exemple le grade histologique, la qualité de l'exérèse chirurgicale, la taille et la profondeur de la tumeur primaire, la dissémination locorégionale de cellules tumorales.

Les STS récidivent localement dans 20 à 30 % des cas. Le taux de récurrence locale dépend du type d'exérèse chirurgicale réalisée, avec un taux de récurrence de l'ordre de 40 à 100 % en cas d'énucléation (ablation de la tumeur) et de 10 à 20 % en cas de compartimentectomie (ablation du compartiment entier). Les métastases surviennent le plus souvent dans les deux ans qui suivent le diagnostic, mais certaines tumeurs donnent des métastases plus tardivement. Ces métastases sont principalement pulmonaires (30 à 50 % des cas), mais celles-ci peuvent également être osseuses (5 %) ou dans les tissus mous (10 %). Les métastases par voie lymphatique sont rares et si une atteinte ganglionnaire régionale (adénopathie) est observée dans 5 % des cas, elle est habituellement tardive.

.5.3 Les types de sarcomes

Le STS est une tumeur maligne envahissant les tissus conjonctifs. **Le nom de la tumeur dépend du tissu conjonctif envahi.** La classification d'Enzinger distingue 15 groupes et 58 sous-groupes de STS. Les groupes sont différenciés en fonction de la localisation de la tumeur, de sa morphologie et de la ligne de différenciation des cellules tumorales. On distingue alors les **leiomyosarcomes** ayant des caractéristiques musculaires lisses, les **liposarcomes** présentant une expression de protéines typiques des cellules adipocytaires. Les sarcomes ne présentant pas de ligne de différenciation sont appelés **sarcomes indifférenciés**.

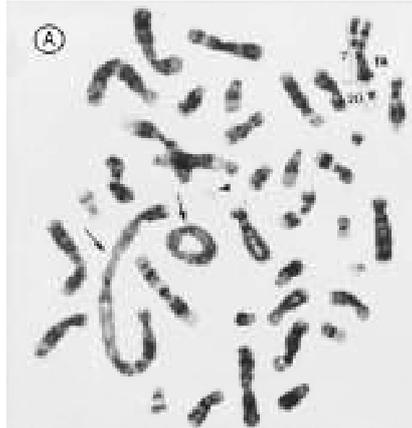


Figure 37 : caryotype de LPS différencié avec des chromosomes en anneau, des chromosomes géants et des associations de télomères (Sandberg, 2004)

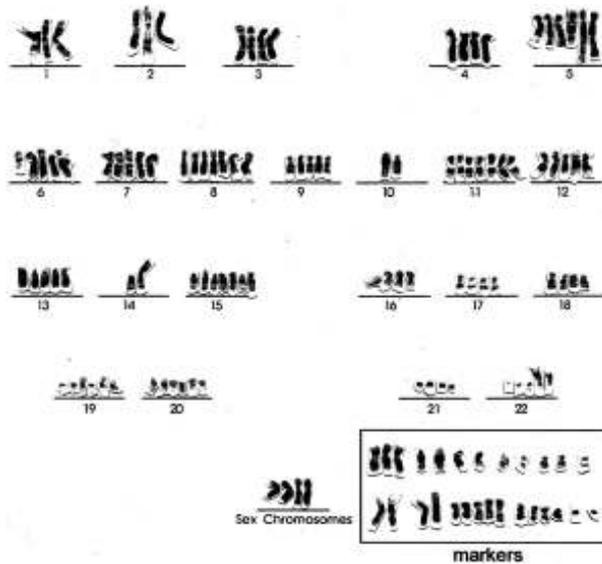


Figure 38 : caryotype de MFH caractérisé par une polyploïdie d'après Soft Tissue Sarcomas: Lessons from the Past, Challenges for the Future Presented at the 90th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology, Atlanta, March 6, 2001. Sharon W Weiss M.D

Parmi les sarcomes que nous avons étudiés, on distingue :

- Le liposarcome, qui apparaît souvent en profondeur dans les tissus adipeux. On le trouve souvent dans la cuisse (au moins 50 %), derrière le genou (creux poplité), à l'aîne, sur le fessier ou derrière la cavité abdominale (rétropéritone 30 % des cas). Rarement, on rapporte des cas de la bouche, de l'orbite, de la joue, du cou et des membres supérieurs. Des travaux indiquent que la mutation ou l'altération d'un gène de la beta-catenine pourrait jouer un rôle dans la formation et la progression de ce sarcome. Ce type de sarcome est caractérisé par des remaniements génomiques importants. On peut ainsi noter la présence de chromosomes en anneau ou géant (Figure 37). Au microscope, on distingue des liposarcomes à forme :
 - Différenciée (50 % des liposarcomes. Typiquement de bas grade)
 - Dédifférenciée (Typiquement de haut grade)
 - Myxoïde (Typiquement de grade intermédiaire)
 - Pléomorphe (5 à 10 % des liposarcomes, typiquement de haut grade).

- Le sarcome indifférencié (US) regroupe les myxofibrosarcomes et les histiocytofibrome malin (MFH).
 - Le MFH est le plus communément diagnostiqué chez les patients âgés de 50 à 70 ans (il représente 40 % des diagnostics). Il est deux fois plus fréquent chez les hommes que chez les femmes. Les enfants sont rarement touchés. Cette tumeur cancéreuse est riche en histiocytes et en fibroblastes, mais les cellules d'origine de ce sarcome ne sont pas clairement identifiées. Le MFH peut apparaître n'importe où dans le corps, mais il est plus fréquent dans les membres inférieurs, plus particulièrement dans la cuisse. D'autres localisations fréquentes sont les membres supérieurs et le rétropéritone. Les MFH présentent de nombreux chromosomes surnuméraires (Figure 38). Il existe quatre variantes :
 - Pléomorphe (de haut grade),
 - Myxoïde (de haut grade),
 - A cellules géantes (de bas grade),
 - Inflammatoire (de bas grade).

Le terme MFH regroupe des sarcomes peu différenciés et résulte d'un diagnostic d'exclusion. Depuis quelques années, le développement de nouvelles approches



Figure 39 : exemple de caryotype de LMS ; A: LMS prostatique, caryotype de la tumeur primaire sans remaniement majeur sauf le chromosome en anneau (9) (haut), B: LMS rare avec un événement génétique (translocation 18,20) (haut) et de multiples délétions (2, 4, 9, 11, 18, 22) (bas) ; C : LMS présentant une triploïdie pour un grande nombre de chromosome voire une quadruploïdie (Sandberg, 2005)



Figure 40 : caryotype typique d'un GIST avec une délétion du chromosome 14 et du 1p (Sandberg and Bridge, 2002)

notamment la CGH array, a permis de reclasser environ 20 % des MFH diagnostiqués en liposarcomes indifférenciés (Chibon et al., 2003), (Chibon et al., 2002), (Coindre et al., 2003).

- Le myxofibrosarcome représente 5 % des STS, il est plus fréquent chez les patients de 50 à 70 ans. Il est principalement localisé dans les membres (80 %) est récidives localement dans 40 % des cas, alors que 20 % des patients présentent des métastases. Les tumeurs sont caractérisées par la présence de cellules indifférenciées et par une grande proportion d'acide hyaluronique.

- Le léiomyosarcome ou LMS est une tumeur présentant une différenciation musculaire lisse qui apparaît généralement dans l'utérus ou dans l'appareil gastro-intestinal : 61 % dans l'estomac, 29 % dans l'intestin grêle et 10 % dans le colon. Les cellules composant ce type de tumeur ont généralement un cytoplasme éosinophile organisé en faisceaux, le noyau est allongé et parfois plurilobé et souvent hyperchromatique. En immunohistochimie, ces cellules expriment la desmine, l'actine musculaire lisse et la h-caldesme. Ce type de sarcomes est globalement plus agressif que les autres sarcomes (notamment les liposarcomes) mais il existe des différences au sein de ce sous-type puisque les LMS du rétropéritoine sont plus agressifs que les LMS des autres localisations. Les LMS peuvent présenter plusieurs caryotypes différents caractérisés par de multiples anomalies : chromosomes surnuméraires, chromosomes en anneaux, chromosomes tronqués de grand fragments voire de bras entiers (Figure 39).

- Gastro Intestinal Stromal Tumor : GIST, peut apparaître n'importe où dans l'épaisseur de la paroi du tube digestif. Il dérive des cellules interstitielles de Cajal qui sont les cellules nerveuses musculaires impliquées dans la régulation de la motilité intestinale. Les sites de prédilection d'une tumeur primitive sont l'estomac (55 %), le duodénum et l'intestin grêle (30 %), l'œsophage (5 %), le rectum (5 %), le colon (2 %). Les métastases se développent souvent dans le foie. Cependant, elles peuvent aussi apparaître occasionnellement dans l'abdomen et les poumons. La diffusion aux ganglions lymphatiques est rare. Longtemps, les GIST ont été regroupés dans le sous groupe des leiomyosarcomes du tube digestif. Mais en 2003 et 2004, des études ont montré une expression différentielle de certaines protéines permettant de distinguer les

- GIST des LMS. En effet, les GIST expriment KIT et CD34 tandis que les LMS expriment la desmine et l'actine musculaire lisse et présentent une différenciation musculaire lisse observable en microscopie.

Les GIST sont (comme les liposarcomes) peu agressifs comparés aux LMS ou aux sarcomes indifférenciés tels que les MFH.

La majorité des GIST survient suite à une mutation spécifique du gène *c-Kit* qui conduit à son activation constitutive. Le gène *Kit* code pour un récepteur à activité tyrosine kinase stimulant la prolifération et la survie cellulaire via les voies MAPK et PI3K (Miettinen and Lasota, 2001).

.5.4 Traitement :

.5.4.1 La chirurgie :

La chirurgie reste le traitement incontournable des STS. Il existe plusieurs types d'exérèse donnant des taux de rechute variable.

- L'exérèse radiale ou extra-compartimentale consiste en l'ablation de tout le compartiment musculaire d'insertion tendineuse (proximale) à insertion tendineuse (distale). Peu conservatrice, cette technique offre pourtant le taux de récurrence locale le plus bas (5 % en moyenne).
- L'exérèse large doit enlever la tumeur et une couche de tissu sain d'environ 2 cm, cette méthode, parce qu'elle peut laisser des cellules tumorales périphériques non visibles macroscopiquement, augmente le risque de récurrence locale (15-30 %).
- L'exérèse marginale permet uniquement l'ablation de la capsule tumorale, ce type d'exérèse est indiqué pour conserver des éléments vasculo-nerveux importants, mais le taux de rechute est très important (50-80 % localement).

La chirurgie est primordiale dans le traitement des STS mais elle est désormais associée à d'autres traitements plus généraux comme la chimiothérapie et/ou la radiothérapie.

.5.4.2 La chimiothérapie

.5.4.2.1 Chimiothérapie adjuvante (après chirurgie)

Ce type de traitement a pour objectif de diminuer le risque de récurrence locale en induisant la mort des cellules tumorales restantes malgré l'exérèse chirurgicale de la tumeur principale. Les principaux agents chimiothérapeutiques utilisés seuls ou associés sont : la doxorubicine (anthracycline), l'ifosfamide, le dédicène et le cyclophosphamide (agents alkylants), la vincristine (vinca-alcaloïde).

.5.4.2.2 Chimiothérapie néo-adjuvante (avant chirurgie)

Les patients présentant un sarcome de 8 à 10 cm ou moins mais associé à un envahissement des structures nerveuses, vasculaires, articulaires ou osseuses et / ou à une inflammation cutanée, sont de bons candidats à la chimiothérapie néo-adjuvante car elle permet une diminution de la taille de la tumeur favorisant une chirurgie conservatrice.

De nouvelles approches sont en cours d'essai : la perfusion du membre isolé, qui permet la délivrance d'agents chimiothérapeutiques type : TNF (anti-angiogénique) et Melphalan (agent alkylant bifonctionnel) en intra-artériel du membre atteint. Ceci limite les effets indésirables et diminue de 75 % l'indication d'amputation, surtout lorsque cette perfusion locorégionale est couplée à une légère hyperthermie (38-39°C).

Il y a également l'association d'une chimiothérapie classique avec la thermothérapie c'est-à-dire l'augmentation de la température du corps jusqu'à 42°C le temps de l'administration des agents chimiothérapeutiques et une heure après celle-ci. Cette élévation importante de la température permettrait une meilleure pénétration intracellulaire des drogues utilisées classiquement (en cours d'étude, coordonnée par le groupe sarcome de l'EORTC).

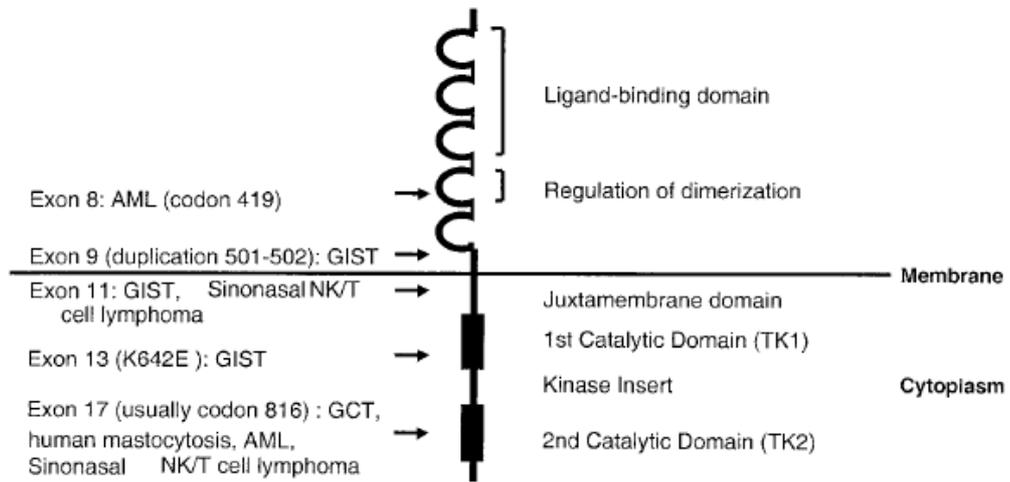


Figure 41 : mutations de KIT associées à différents types de cancers

.5.4.3 La radiothérapie

Les STS sont en règle générale faiblement radiosensibles. La radiothérapie est donc toujours associée, dans une thérapeutique multidisciplinaire. La radiothérapie est surtout post-opératoire et permet d'obtenir un taux de récurrence locale, dans le cas d'une exérèse large, comparable à celui observé pour une chirurgie radiale ou compartimentale.

.5.4.4 Les thérapies ciblées

A ce jour, **les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) sont les seuls sarcomes à bénéficier d'une thérapie ciblée** car, dans les autres types de sarcomes, peu, voire aucune, cibles thérapeutiques ont été mises en évidence. Dans les GIST, on peut noter une surexpression de KIT dans 85 % des cas et de PDGFR α dans 20 % des cas. Les gènes *Kit* et *PDGFRA* codent pour des récepteurs à activité tyrosine kinase induisant des voies de signalisation prolifératrices via l'activation des MAPK et de la voie PI3K. 50 à 70 % des GIST présentant une activation de KIT ont une mutation de l'exon 11 du récepteur qui code pour un domaine juxtamembranaire anti-dimerisation permettant une régulation de la dimerisation et donc de l'activation de KIT. 3 à 13 % des GIST ont une mutation de l'exon 9 du récepteur tyrosine kinase qui code pour un domaine extracellulaire (Figure 41).

Alors que ces tumeurs étaient résistantes aux drogues cytotoxiques classiques et à la radiothérapie, l'imatinib mesylate (GlivecTM ou STI-571) inhibiteur de l'activité tyrosine kinase et donc de KIT et PDGFR α , a bouleversé le pronostic de ces patients avec des médianes de survie globale de l'ordre de 5 ans dans les dernières études de phase III publiées, bien supérieure à celle obtenue avec des traitements classiques.

Mais cet inhibiteur de tyrosine kinase n'est efficace que chez les patients ayant une mutation de l'exon 11. L'imatinib donne un taux de réponse important : 50 % et beaucoup de stabilisations parmi les patients ne présentant pas de réponse totale (Heinrich et al., 2002).

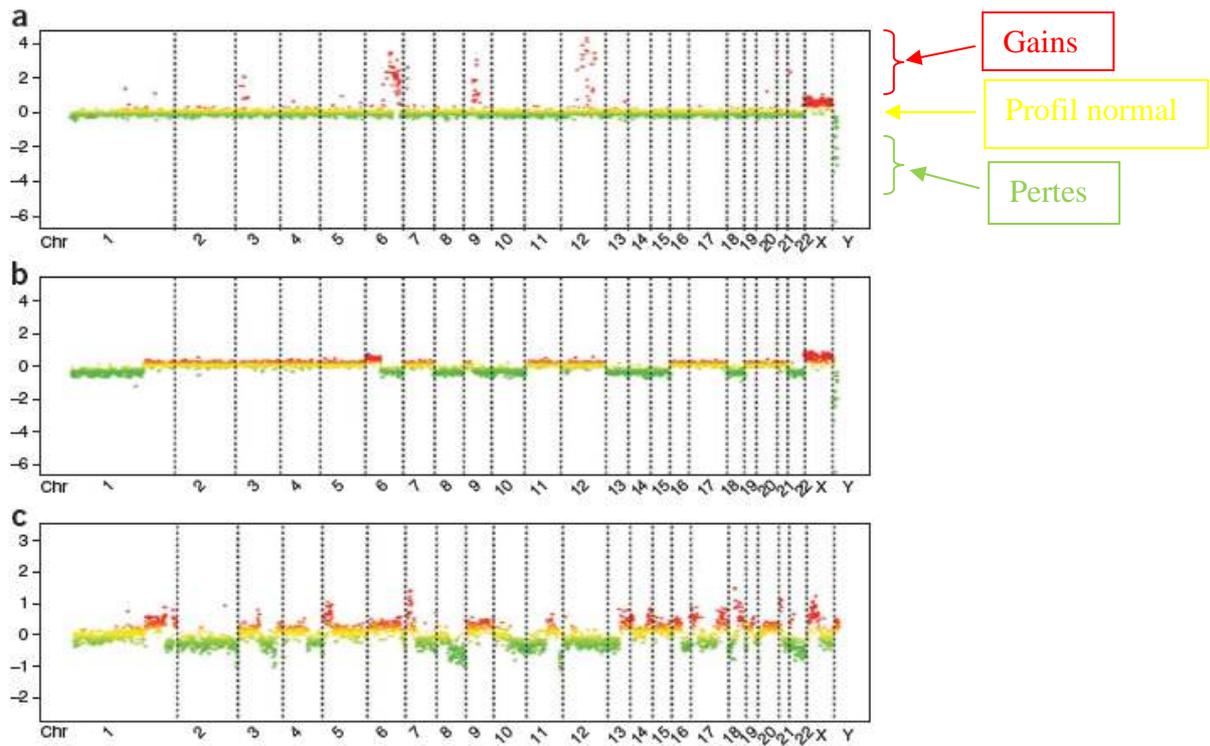


Figure 42 : profils génomiques des sarcomes (Chibon et al., 2010) a : profil à amplifications, b : profil à bras ou chromosomes entiers, c : profil complexe

.5.5 La génétique des sarcomes

Le diagnostic et l'identification d'un type de sarcome parmi les 50 sous-groupes répertoriés reposaient principalement sur des caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques. Mais au sein d'un sous-type, une hétérogénéité du pronostic métastatique et évolutif, pouvait être observé. Depuis quelques années des équipes tentent de proposer une classification plus fine en fonction des caractéristiques génétiques des tumeurs.

Ainsi, dans certains sarcomes, comme dans les sarcomes d'Ewing ou les synovialosarcomes, il a pu être mis en évidence des translocations caractéristiques, comme la translocation t(11 ;22) dans les sarcomes d'Ewing. D'autres types de sarcomes ne présentent peu ou pas de translocation spécifique mais arborent un **profil génétique complexe**, c'est le cas des leiomyosarcomes et des MFH (Helman and Meltzer, 2003).

Ainsi, trois profils géniques ont récemment pu être mis en évidence par des analyses de CGH array regroupent la plupart des STS (Figure 42) :

- Un profil dit à amplification(s) qui présente un faible nombre de remaniements et concerne presque exclusivement les liposarcomes dédifférenciés,
- Un profil comportant peu d'altérations (moins de 30) et présentant des gains et des pertes de bras de chromosomes ou de chromosomes entiers,
- Un profil dit complexe qui comporte un nombre important d'altérations (de 30 à 85) sur l'ensemble des chromosomes. Ce profil génomique est principalement retrouvé pour les MFH et les LMS.

De plus certains remaniements plus ou moins spécifiques de sous-type de sarcomes ont pu être mis en évidence. Ainsi, 33 à 75 % des LMS sont caractérisés par une perte de la région 10q23-25 (El-Rifai et al., 1998), région associée à un mauvais pronostic (Hu et al., 2001) et contenant *PTEN* (le deuxième gène le plus muté dans les cancers après *TP53*). Mais globalement le profil génomique est différent en fonction de la localisation de la tumeur (Svarvar et al., 2006).

Les LMS et les MFH présentent une surexpression des gènes impliqués dans la voie PI3K / AKT (78 % des LMS et 90 % des MFH). Bien que les MFH soient beaucoup plus

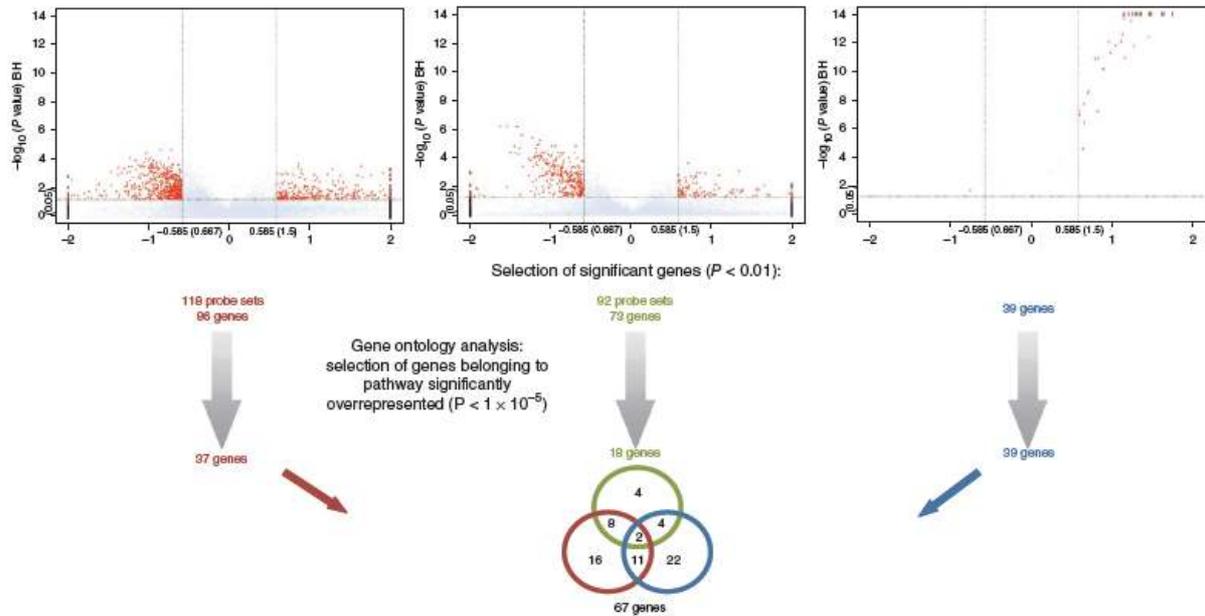


Figure 43 : mode de sélection des gènes de CINSARC

les profils d'expression ont été comparés par un test de Welch après regroupement des tumeurs selon le nombre d'altérations chromosomiques par CGH array (gauche), le grade selon FNCLCC (milieu), la signature CIN70 de Carter (droite). Ensuite les gènes ont été sélectionnés d'après les voies de signalisation dans lesquelles ils étaient impliqués (mitose, réarrangement chromosomique) (Chibon et al., 2010)

remaniés que les LMS. Les MFH sont aneuploïdes et ont une grande instabilité génomique, avec de nombreux remaniements segmentaires (gain du 1p, 5p, 7q... ; perte du 13q, 2p, 11q...) (Larramendy et al., 1997), (Mairal et al., 1999).

.5.6 Signatures prédictives dans les sarcomes

.5.6.1 Exemple d'une signature transcriptomique : CINSARC

Une nouvelle signature prédictive de la survenue de métastase dans les sarcomes a été découverte au laboratoire, par Frédéric Chibon. Cette signature nommée CINSARC pour Complexity INdex in SARComas comporte 67 gènes impliqués dans deux processus fondamentaux de la transformation maligne des cellules : la mitose et les réarrangements chromosomiques (Chibon et al., 2010).

Les profils génomiques établis à l'Institut Bergonié par CGH array ont permis de mettre en évidence une corrélation entre le nombre d'altérations et le grade histologique, mais le grade n'est qu'un des éléments à considérer dans la définition de l'agressivité tumorale des sarcomes. La signature CINSARC a été établie en croisant les données de CGH array sur près de 200 sarcomes et les analyses transcriptomiques réalisées sur ces mêmes tumeurs par puces Affymetrix (Figure 43).

La sélection des gènes de la signature s'est faite sur trois critères :

- Les gènes différentiellement exprimés dans les tumeurs incluses dans l'étude après regroupement de ces tumeurs selon leurs profils génomiques établis par CGH array (deux groupes : moins de 20 et plus de 35 altérations)
- Les gènes différentiellement exprimés dans les tumeurs incluses dans l'étude selon les grades définis par la FNCLCC (Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer) deux groupes : grade 2 versus grade 3
- Les gènes différentiellement exprimés dans les tumeurs incluses dans l'étude et appartenant à la signature de 70 gènes de Carter, signature reliant l'instabilité chromosomique et l'expression de certains gènes dans plusieurs types de cancer (sein, poumon, lymphome, gliome...) (Carter et al., 2006).

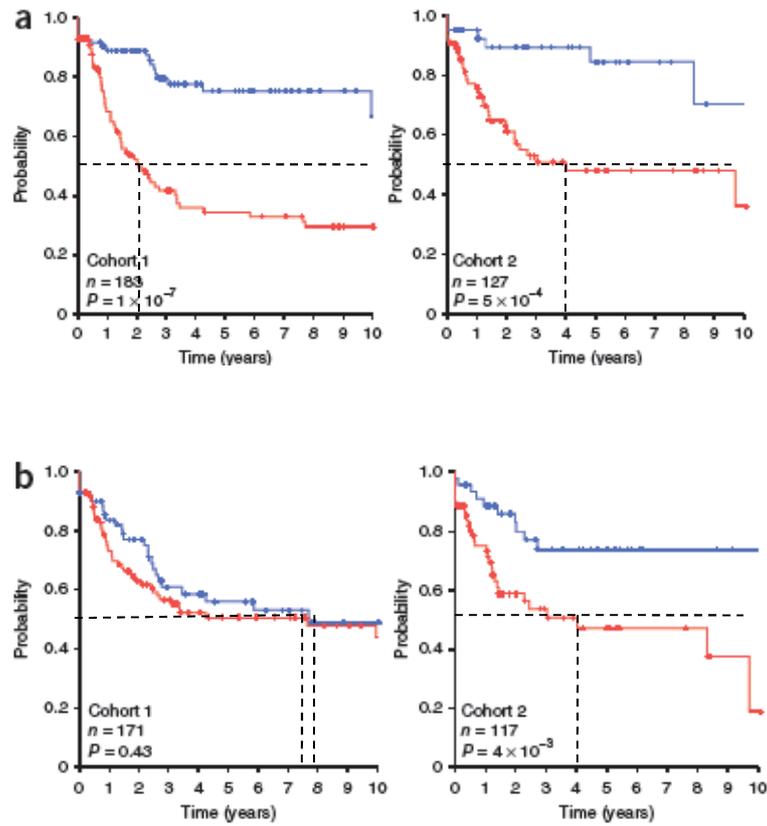


Figure 44 : Kaplan-Meier représentant la survie sans métastase dans deux séries de sarcomes selon a : la signature CINSARC et b : le grade défini par la FNCLCC. (Chibon et al., 2010)
 Les médaines de survie sont matérialisées par des traits en pointillés

Ces trois niveaux d'analyse ont permis de mettre en évidence, respectivement 86, 73 et 39 gènes différentiellement exprimés. Une analyse à l'aide de GO (Gene Ontology) a permis de définir un nouveau filtre de sélection. En effet, n'ont été retenus que les gènes appartenant aux voies de signalisation les plus représentées, à savoir la mitose et les réarrangements chromosomiques, ceci a permis de réduire la signature à 67 gènes. Cette signature a également été validée sur un deuxième groupe de sarcome et sur d'autres types tumoraux (tumeurs mammaires, lymphomes, GIST). La signature CINSARC permet de discriminer les tumeurs selon leur agressivité et leur capacité à métastaser. Cette signature : a une meilleure significativité que les signatures existantes dans les GIST (Miettinen), est la première signature pronostique découverte dans les STS, mais pouvant également être appliquée dans d'autres cancers comme les lymphomes ou les glioblastomes (Figure 44). Le fait que la signature CINSARC puisse être appliquée à plusieurs types de cancers d'origines très variées, montre l'importance de ces gènes dans l'oncogénèse.

.5.6.2 Exemple d'une signature microRNA

En 1998 Subramanian *et al.*, publient dans *Oncogene* la mise en évidence d'une signature microRNA dans les sarcomes (Subramanian et al., 2008). Dans cette étude, ils comparent les profils microRNA de 27 sarcomes appartenant à différents sous types (rhabdomyosarcomes, léiomyosarcomes, GIST, synoviosarcomes...) et deux échantillons de tissus musculaires lisses sains et cinq de tissus musculaires striés. Les profils microRNA ont été établis par microarray et ont permis de mettre en évidence une signature microRNA spécifique à chaque type de sarcome. En effet, les microRNA 133a et b sont sous-exprimés dans les GIST mais surexprimés dans les LMS, les microRNA 15a, 15b et 16 sont sous-exprimés dans les LMS lorsqu'ils sont comparés aux autres types de sarcomes, etc.

Ce travail a permis de montrer que les microRNA pouvaient avoir un rôle dans la tumorigénèse des sarcomes car le profil d'expression de certains d'entre eux pouvait être associé aux types de sarcomes. Ainsi, **les microRNA pourraient être utilisés comme marqueurs diagnostiques mais aussi comme cibles thérapeutiques dans les sarcomes.**

.5.7 Conclusion

Les STS sont des tumeurs rares regroupant un grand nombre de sous-types. La classification des sous-types de sarcomes est floue et repose principalement sur des caractéristiques histologiques, peu de marqueurs étiologiques ont pu être mis en évidence jusqu'à présent. Le seul traitement réellement efficace pour les STS reste la chirurgie, puisque la chimiothérapie et la radiothérapie sont très peu efficaces, à l'exception des GIST, seuls sarcomes à pouvoir bénéficier d'une thérapie ciblée. La majeure partie des études effectuée sur les STS tentent de clarifier la classification des STS et de découvrir des marqueurs diagnostiques et pronostiques de ce type de cancer.

Objectifs du travail

Les **sarcomes des tissus mous** (STS) représentent un **groupe hétérogène de tumeurs rares** développées à partir des tissus de soutien. Etant donné la complexité de la classification et du diagnostic des STS, la majeure partie des études effectuées à ce jour recherchait des marqueurs protéiques ou transcriptomiques permettant d'établir un diagnostic certain. Peu d'études ont été effectuées pour découvrir les gènes impliqués dans l'oncogenèse des sarcomes, sauf dans les GIST où la surexpression et l'activation constitutive de KIT a pu être mise en évidence. Etant donné la faible efficacité des traitements actuels, la découverte de gènes impliqués dans l'étiologie des sarcomes est un enjeu important car cela permettrait de définir de nouvelles cibles thérapeutiques en vue du développement de thérapie ciblée.

Il est bien établi que *PLAGL1* est un gène soumis à **l'empreinte parentale**, qui code pour un facteur de transcription à 7 doigts de zinc impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. *PLAGL1* est exprimé au cours du développement embryonnaire mais est sujet à des modifications de l'expression dans plusieurs pathologies. Les modifications de l'expression de *PLAGL1* sont dues à des altérations de l'empreinte parentale également appelées **épimutations**, qui conduisent soit à sa surexpression (TNDM, Transient Neonatal Diabetes Mellitus) soit à sa sous expression (cancers). La dérégulation de l'expression de *PLAGL1* a essentiellement été étudiée dans les cancers d'origine épithéliale où *PLAGL1* agit comme un suppresseur de tumeur. Mais des études récentes dans les tumeurs cérébrales suggèrent que *PLAGL1* pourrait agir comme un oncogène.

PLAGL1 est un gène d'empreinte situé en 6q24-25, une **région fréquemment remaniée dans les STS**.

Par ailleurs, l'expression des gènes d'empreinte est souvent modifiée dans les cancers et cette catégorie de gènes est souvent considérée comme des marqueurs précoces de malignité. En effet, on considère que les modifications épigénétiques seraient parmi les toutes premières altérations induisant le développement tumoral.

Le but de notre travail a donc été de déterminer si *PLAGL1* pouvait avoir un rôle dans l'oncogenèse des sarcomes et pouvait représenter une cible d'intérêt dans ce type de tumeurs.

Pour cela, nous nous sommes proposés :

- 1) d'étudier l'expression de *PLAGL1* dans différents types de sarcomes,
- 2) de déterminer si cette expression était associée à des facteurs cliniques et pouvait avoir une valeur diagnostique ou pronostique dans ce type tumoral,

- 3) d'étudier la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de *PLAGLI* dans les sarcomes.

PLAGLI étant régulé de façon physiologique par **méthylation de son promoteur**, nous avons, dans un premier temps, recherché si ce type de mécanisme était impliqué dans la régulation de *PLAGLI* dans les STS. Pour cela nous avons mis au point la technique de pyroséquençage, permettant une étude exhaustive de l'îlot CpG de *PLAGLI* dans les sarcomes. Nous avons également recherché si la méthylation de *PLAGLI* pouvait être reliée à des facteurs cliniques et si le niveau de méthylation du promoteur de *PLAGLI* pouvait être un **nouvel outil diagnostique ou pronostique**.

Puis dans un deuxième temps, nous avons recherché si d'autres mécanismes épigénétiques pouvaient réguler l'expression de *PLAGLI*. Pour la première fois, nous avons étudié la régulation de l'expression de *PLAGLI* par des **microRNA**. Puis nous avons regardé si ce mode de régulation existait dans certains types de sarcomes.

L'implication de *PLAGLI* n'ayant jamais été étudiée dans ce type tumoral, nous avons donc choisi d'étudier **le profil génomique, transcriptomique et protéique de *PLAGLI*** dans ce type de cancer afin de caractériser tout ou partie des mécanismes épigénétiques de régulation de son expression : que se soit la **méthylation de son promoteur** ou la régulation par des **microRNA**.

Matériel et Méthodes

.1 Culture cellulaire

Quatre lignées cellulaires de sarcomes, établies à l'Institut Curie ont été utilisées pour ce travail :

- trois lignées issues de liposarcome : les lignées MFH128, LPS78 et LPS80,
- une lignée de léiomyosarcome : la lignée MFH148.

Ces quatre lignées sont cultivées en milieu RPMI contenant du GlutaMAX™ I (L-Alanyl-L-Glutamine) supplémenté avec 10 % de SVF dans une atmosphère humide à 37°C et 5 % de CO₂.

Une lignée cellulaire de cancer du col de l'utérus : la lignée HeLa a également été utilisée. Ces cellules proviennent d'un prélèvement de métastases effectué en 1951 sur Henrietta Lacks. Cette lignée cellulaire est cultivée en DMEM contenant du GlutaMAX™ I, 4,5 g/L de D-glucose et 110 mg/l de pyruvate de sodium et 10 % de SVF, à 37°C en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

Le milieu de culture des cellules est changé deux fois par semaine. Les cellules sont repiquées par trypsinisation lorsque la confluence atteint 70 à 80 % c'est-à-dire deux fois par semaine pour les cellules HeLa et MFH148, une fois par semaine pour les cellules LPS78 et LPS80 et une fois toutes des deux ou trois semaines pour les cellules MFH128.

.2 Clonage

.2.1 Culture bactérienne

Toutes les souches bactériennes ont été cultivées en milieu LB (Milieu de Luria et Bertani modifié) : 1 % bactotryptone (Sigma) ; 0,5 % extrait de levure (Sigma); 1 % NaCl (Sigma) à 37°C (pour les souches TOP10F' ou XL1-Gold) ou 30°C (pour la souche STBL2). En fonction de l'étape d'amplification plasmidique ou de clonage considérée, la culture bactérienne est faite soit, en milieu liquide dans du LB à température indiquée, sous agitation pendant 16 heures dans un erlenmeyer d'une capacité au moins 5 fois supérieure au volume

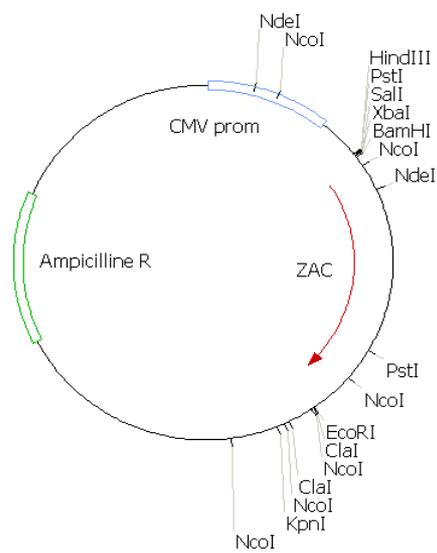


Figure 45: carte du pRK7-ZAC

de LB pour permettre une bonne oxygénation ; soit en milieu solide sur du LB-Agar (milieu LB classique + 1,5 % d'agar) à la température optimale de la souche bactérienne utilisée.

Ces milieux sont utilisés avec un antibiotique de sélection : soit l'ampicilline (Sigma) à une concentration finale de 100 µg/ml, soit la kanamycine à une concentration finale de 30 µg/ml. Seules les bactéries ayant intégré un plasmide qui leur confère une résistance à l'antibiotique pourront se développer sur ces milieux sélectifs.

.2.2 Souches bactériennes

Plusieurs souches bactériennes ont été utilisées pour réaliser les clonages et mutagenèses :

- TOP10F' : F' $\{\text{lacIq Tn10 (TetR)}\}$ mcrA $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$ $\Phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ ΔlacX74 recA1 araD139 $\Delta(\text{ara-leu})7697$ galU galK rpsL endA1 nupG. Cette souche a été utilisée dans les étapes de clonage.
- XL10-Gold : Tetr, $\Delta(\text{mcrA})183$, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173$, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac Hte, [F', proAB, lacIqZ Δ M15, Tn10(tetr) Amy Camr]a (Stratagene). Cette souche a été utilisée dans les étapes d'amplification de vecteurs issus de mutagenèse dirigée.
- STBL2 : F- mcrA $\Delta(\text{mcrBC-hsdRMS-mrr})$ recA1 endA1lon gyrA96 thi supE44 relA1 λ - $\Delta(\text{lac-proAB})$ (Invitrogen). Cette souche a été utilisée dans les étapes de clonage de séquences instables afin d'éviter les recombinaisons.

.2.3 Vecteurs plasmidiques

Plusieurs plasmides ont été utilisés au cours de cette étude :

- pRK7-ZAC nous a été donné par Laurent Journot et contient la séquence codante de la forme longue de l'ADNc de *PLAGL1* humain placée sous le contrôle d'un promoteur fort (promoteur CMV pour CytoMegalovirus) (Figure 45).

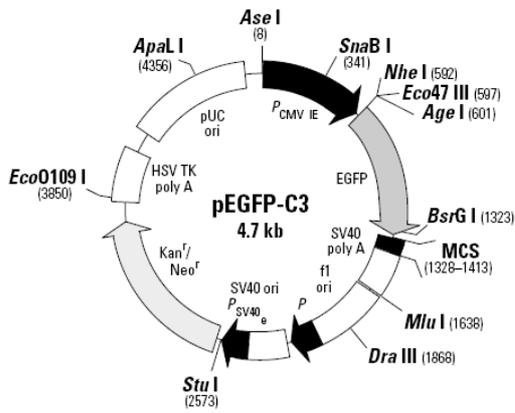


Figure 46 : carte du pEGFP-C3

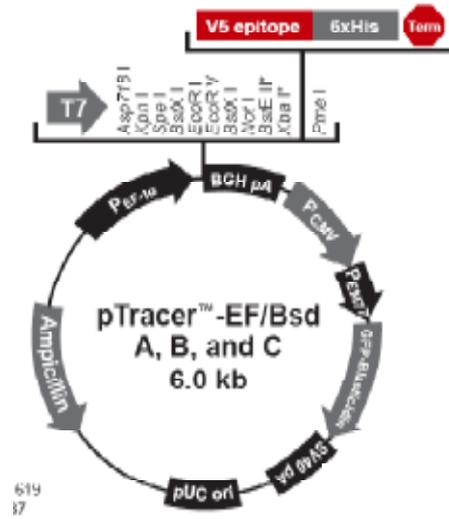


Figure 47 : carte du pTRACER

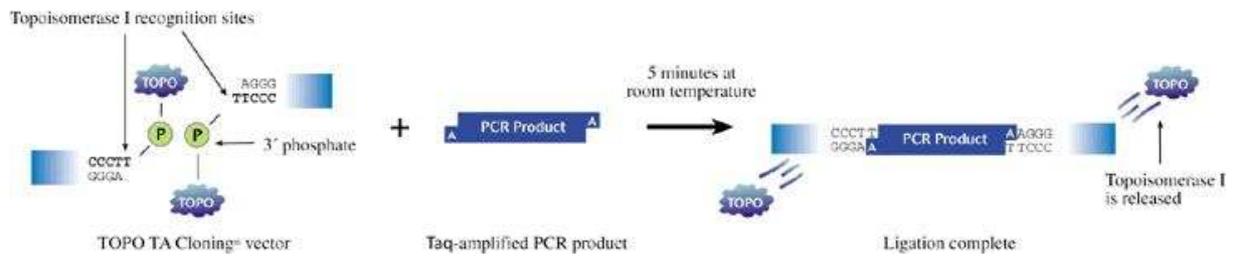


Figure 48 : Technique de clonage par TOPO TA invitrogen

pEGFP-C3 a été utilisé pour cloner la région 3'UTR de *PLAGL1* en vue de l'étude sur les microRNA et a également servi à mettre au point les conditions de transfections dans les lignées étudiées. Ce plasmide contient la séquence codante de la protéine EGFP (Enhanced Green Fluorescent protein) sous le contrôle du promoteur CMV et un multisite de clonage en C-terminale de l'EGFP pour permettre la réalisation d'une protéine de fusion (Figure 46).

- pTRACER est un plasmide à double promoteur, le premier promoteur est un promoteur CMV qui permet une forte expression du gène de la GFP fusionné au gène de résistance à la blasticidine (Figure 47). Le gène d'intérêt est sous contrôle d'un deuxième promoteur fort : promoteur EF-1. Ce plasmide permet donc l'expression simultanée mais indépendante de la GFP et de la protéine d'intérêt. Ce plasmide a été utilisé en cytométrie pour étudier l'effet de l'expression de la protéine *PLAGL1* sur l'apoptose et le cycle cellulaire en ne prenant en compte que les cellules transfectées (fluorescentes dans le vert) mais sans passer par une protéine de fusion qui pourrait modifier l'action de *PLAGL1*. Ce plasmide a été utilisé pour cloner la forme courte et la forme longue de *PLAGL1* afin d'étudier séparément l'effet de ces deux isoformes sur le cycle cellulaire et l'apoptose.

.2.4 Clonage en TOPO TA : utilisation d'IPTG, X gal

La technique de clonage Topo-TA (Invitrogen) est une méthode qui permet le clonage rapide de produit de PCR avant le sous-clonage dans un vecteur d'expression, tout en facilitant les étapes ultérieures de sous-clonage (Figure 48).

Le vecteur de destination : pCR2.1 est ouvert et ses deux extrémités 3' sont liées chacune à une topoisomérase I alors que les extrémités 5' sont obligatoirement constituées d'une thymidine sortante.

La Taq polymérase utilisée lors de la PCR a une activité terminale transférase indépendante de la matrice. Cette enzyme ajoute une deoxyadénosine en 3' du produit PCR. La topoisomérase issue du virus Vaccinia se lie aux duplex d'ADN en un site spécifique et clive la liaison phosphodiester après le site 5'CCTT (Shuman, 1991). L'énergie libérée est

nom	séquence	L total	longueur	%GC	Tm logiciel	hairpin	dimer	Tm formule
clonage PLAGL1 rv	CAA TTA TCT GAA TGC ATG ATG G	22	22	36	59,3°C	29,5	1	55
clonage PLAGL1 fw	GTT AAT CTT GTC TCT TCT CAC	21	21	38,1	58,3°C	7,6	4,85	53,3
3'UTR PLAGL1 bamHI rv	C GGG ATC CTT GCA AGA TTT GAA AAG TTT ATT ATA TG	36	28	33,3	50°C	33,4	14,13	45
XhoI 3'UTR PLAGL1 Fw	CCG CTC GAG TAG TTG ATT TTT AAA GTG TAT TTT TCG	36	24	36,4	47°C	32	10	42

Tableau 4 : amorces utilisées pour le clonage de la phase codante de PLAGL1 (clon PLAGL1 rv2 fw2) et de la région 3'UTR de PLAGL1 (UTR PLAGL1 rv fw)

conservée par la formation d'une liaison covalente entre l'extrémité 3' phosphate formée et la tyrosine 274 de la topoisomérase I. La ligation du produit PCR à ce vecteur linéarisé se fait par complémentarité de bases entre les (A) du produit PCR et les (T) du vecteur, ce qui provoque la libération des topoisomérases. Le site d'insertion du produit PCR se situe entre le promoteur et la phase codante du gène *Lac Z* codant pour la β -galactosidase.

Après transformation des bactéries avec les produits de ligation vecteur - PCR, les bactéries sont étalées sur boîtes LB-Agar après étalement de l'X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) et de IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) qui sont les deux substrats de la β -galactosidase. Si le vecteur n'a pas intégré le produit PCR alors il y aura expression de la β -galactosidase et utilisation de l'X-gal et de l'IPTG, ce qui conduit à la production d'un composé bleu (le 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo). En revanche, si le vecteur a intégré le produit PCR, alors la distance entre le promoteur de *Lac Z* et sa phase codante sont séparé par l'insert ce qui empêche l'expression de la protéine β -galactosidase, il n'y a donc pas de production de composé bleu. La coloration bleue ou non des colonies obtenues permet de discriminer les clones ayant l'insert, la présence d'un antibiotique permet quant à elle de sélectionner les bactéries ayant intégré le vecteur.

Le clonage en TOPO-TA a été utilisé lors du clonage de la phase codante de *PLAGL1* dans les différentes lignées cellulaires utilisées en vue de séquençage et comme étape intermédiaire lors du clonage de la région 3'UTR en aval de l'EGFP dans le plasmide pEGFP-C3. Les amorces utilisées sont répertoriées dans le Tableau 4.

.2.5 Sous-clonage classique par PCR ou digestion

Le clonage d'une séquence d'intérêt dans un vecteur d'expression peut se faire de deux façons :

- par PCR : amplification du fragment d'intérêt avant le clonage
- par digestion : coupure du fragment d'intérêt par digestion enzymatique d'un autre vecteur qui contient la séquence à cloner.

	Concentration initiale	Concentration finale	volume
Matrice	75 ng/μl	75 ng/μl	1 μl
Tampon 10x		1 x	5 μl
MgSO4	50 mM	2 mM	2 μl
dNTPs	10 mM	200 μM	1 μl
Amorce SENS	10 μM	200 nM	1 μl
Amorce ANTISENS	10 μM	200 nM	1 μl
Taq Polymerase High fidelity (Invitrogen)	5 U/μl	1 unité	0.2 μl
eau			Qsp 50 μl soit 38.8 μl

Tableau 5: réactifs nécessaire à la réaction de PCR pour le clonage

Dans le cas d'un clonage par PCR, la séquence d'intérêt peut être amplifiée par PCR en prenant des amorces spécifiques de la séquence, auxquelles nous rajoutons en 5' de l'amorce sens et en 3' de l'amorce anti-sens, un site de coupure spécifique d'une enzyme de restriction. Les amorces sont choisies manuellement puis elles sont analysées sur le site IDT (Integrate DNA technologies : <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>). Ce site permet de calculer la température théorique d'hybridation (en fonction du pourcentage de GC/AT, de la longueur de l'amorce et de la concentration en ions), la température de formation d'hairpin (ou épingle à cheveux) c'est-à-dire la température à laquelle l'amorce peut s'hybrider sur elle-même (qui diminue l'efficacité de la PCR par inhibition de l'hybridation des amorces à la matrice) et l'énergie suffisante à la formation de dimère d'amorces (diminuant également l'efficacité de la PCR). Les amorces sont donc choisies avec un pourcentage en GC au moins égal à 50 %, une température d'hybridation théorique entre 55-60°C et une température de formation d'hairpin inférieure d'au moins 15°C avec la température d'hybridation théorique.

La réaction de PCR se déroule de la façon suivante : une incubation de 2 min à 94°C qui permet d'activer la Taq polymérase (libération de l'anticorps empêchant son activation), puis 35 cycles des étapes suivantes : dénaturation de l'ADN 30 sec à 94°C, hybridation des amorces à la matrice 30 sec à une température spécifique du couple d'amorces utilisées et une extension à 72°C pendant un temps équivalent à 1 min par kb. A la fin des 35 cycles une extension de 5 min à 72°C est effectuée, puis le produit de PCR est conservé à 4°C (Tableau 5).

Avant la ligation du produit d'amplification dans le vecteur de clonage, des étapes de digestion enzymatique et purification des produits PCR, sont nécessaires.

.2.6 Purification du produit PCR

Après avoir effectué la PCR, il est nécessaire de purifier le produit obtenu pour éliminer les différents réactifs de la PCR (les sels, les amorces, le tampon de la PCR...) qui pourraient inhiber la digestion enzymatique.

Pour cela une purification sur colonne est réalisé à l'aide du kit Qiagen « Qiaquick purification kit », selon les recommandations du fabricant.

.2.7 Digestion enzymatique

Une fois le produit de PCR purifié, l'amplicon et le vecteur sont digérés par deux enzymes de restriction aboutissant à la formation d'extrémités cohésives et compatibles. La digestion enzymatique peut être faite avec les deux enzymes simultanément si leurs tampons sont compatibles, sinon consécutivement.

La totalité du produit PCR et 8 µg de vecteur sont digérés pendant une heure à une température spécifique aux enzymes utilisées (en général 37°C) dans un milieu réactionnel composé d'un tampon spécifique aux enzymes, de SAB (sérum albumine bovine), d'eau et des enzymes dont le volume ne doit pas dépasser 5 % du volume total (les enzymes étant conservées dans du glycérol, un volume trop important inhiberait la digestion).

.2.8 Séparation et purification de fragments d'intérêt

Après digestion, le produit PCR est purifié à l'aide du kit Qiagen « Qiaquick purification kit », selon les recommandations du fabricant. Le vecteur est quant à lui purifié sur gel d'agarose. La totalité du produit de digestion est mis à migrer sur gel d'agarose 1 %. Puis, la bande de gel contenant le vecteur clivé est découpée sous UV. Le fragment de gel est ensuite purifié sur colonne, après dissolution du gel à 56°C dans un tampon adéquat, à l'aide du kit Qiagen « Qiaquick gel extraction kit », selon les recommandations du fabricant.

La purification de l'amplicon permet d'éliminer le fragment de quelques bases coupées et les réactifs de la digestion qui pourraient diminuer l'efficacité de ligation. Le vecteur est purifié pour éliminer le fragment de vecteur clivé et ainsi éviter qu'il se relige au vecteur pendant l'étape de ligation. Le vecteur linéarisé et le produit PCR digéré sont ensuite utilisables pour la ligation.

Dans le cas d'un sous-clonage par digestion, l'insert déjà contenu dans un plasmide et le vecteur de destination sont tous deux digérés et purifiés sur gel comme décrit plus haut pour le vecteur dans le cas du sous-clonage par PCR.

	Rapport vecteur/insert 1 :0	Rapport vecteur/insert 1 :2	Rapport vecteur/insert 1 :8
Vecteur	100 ng	100 ng	100 ng
PCR	0	X ng	X ng
Ligase buffer	1 µl	1 µl	1 µl
ligase	1 µl	1 µl	1 µl
Eau	Qsp 10 µl	Qsp 10 µl	Qsp 10 µl
Volume total	10 µl	10 µl	10 µl

Tableau 6: descriptif des réactifs nécessaire à la réaction de ligation

.2.9 Ligation

L'insertion du fragment d'intérêt dans un vecteur est catalysée par la ligase du phage T4 (NEB) et requiert l'ajout d'ATP. Les ADN de l'insert et du vecteur sont au préalable dosés au Nanodrop. La stœchiométrie relative entre le fragment à insérer et le vecteur est déterminante pour la ligation. La pureté, la qualité du fragment digéré purifié et du vecteur linéarisé sont également à considérer ; on teste donc systématiquement plusieurs rapports stœchiométriques entre le vecteur plasmidique linéarisé et l'insert (1 : 1 ; 1 : 2, 1 : 8). Parallèlement, on réalise un témoin de ligation : un témoin contenant uniquement du vecteur linéarisé et de la ligase (rapport 1 : 0). La ligation est effectuée pendant 16 heures à 16°C (Tableau 6).

.2.10 Transformation bactérienne

Cette technique a été utilisée pour l'amplification des produits de clonages. En présence de certains cations métalliques tels que le Mn^{2+} , Ca^{2+} et de certaines molécules organiques telles que le DMSO et le PEG, les parois et les membranes bactériennes deviennent perméables par la formation de pores autorisant la pénétration de l'ADN.

Lors de la transformation bactérienne, environ 10 ng de plasmide sont ajoutés à 100 μ l de bactéries. Après avoir laissé sur glace 30 min, un choc thermique est réalisé pendant 40 sec à 42°C pour permettre l'incorporation du plasmide dans les bactéries chimiocompétentes. Les bactéries sont une nouvelle fois placées sur glace 5 min avant l'ajout de 100 μ l de LB sans antibiotique. Les bactéries transformées sont mises en culture 1 h à 37°C sous agitation (225-250 rpm). Puis elles sont étalées sur boîtes LB-Agar contenant l'antibiotique de sélection, et mises en culture une nuit à 37°C.

Ensuite, une colonie bactérienne individualisée est prélevée et cultivée en milieu LB liquide supplémenté avec l'antibiotique de sélection une nuit à 37°C sous agitation (250-270 rpm).

.2.11 Extraction plasmidique

.2.11.1 Minipreps avec kit promega

Les colonies obtenues suite à un clonage sont cultivées en milieu LB liquide en vue d'une extraction plasmidique. Une digestion enzymatique et / ou un séquençage permettront de vérifier la présence de l'insert dans le vecteur. L'extraction plasmidique de ces minipreps est réalisée avec le kit Promega « Wizard Plus SV minipreps » selon le protocole décrit et permet d'extraire jusqu'à 5 µg d'ADN à partir de 4 ml de culture bactérienne.

.2.11.2 Midipreps avec le kit Qiagen

Les midipreps d'ADN plasmidique sont réalisées avec le kit Qiagen « Qiafilter plasmid purification kit » qui permettent d'obtenir entre 100-300 µg d'ADN à partir d'une culture bactérienne de 100 ml. Après avoir centrifugé les 100 ml de culture bactérienne, le culot est resuspendu dans un tampon adéquat. Les bactéries sont ensuite lysées. Le lysat bactérien (paroi, protéines, ARN, ADN plasmidique) est mis sur une colonne pourvu d'une résine échangeuse d'anions. L'ADN plasmidique est purifié par lavages successifs avec des tampons contenant de l'éthanol et par centrifugations. Pour finir, l'ADN est élué dans 200 µl d'eau (pour ne pas interférer avec les agents de transfections type Exgen ou Lipofectamine).

.2.12 Vérification des clones obtenus par digestion enzymatique et/ou séquençage

Une fois le plasmide d'intérêt obtenu, la présence de l'insert est contrôlée par digestion enzymatique, clivant différenciellement le plasmide source et le plasmide final. Une fois la digestion effectuée, un contrôle sur gel d'agarose est réalisé. Après ce premier contrôle, le plasmide est séquencé par la société Cogenics pour vérifier l'absence de mutation qui aurait pu avoir lieu lors de la PCR.

nom	séquence	L total	longueur	%GC	Tm logiciel	hairpin	dimer	Tm formule
utrzac mir1 fw	GTCATAACCAACATCCAAAATGACGTATATAAGTGTGGTTCATATGG	47	47	34	69,3	46,4	7,82	64,3
utrzac mir1 rv	CCATATGACAAAACACTTATATACGTCATTTGGATGTTGGTTATGAC	47	47	34	69,3	47,5	7,82	64,3
utrzac mir2 fw	GTCTAGCTTAAACTACTACTCAAAGTTCTTAAGTATTGTTG	43	43	30,2	66,1	32,2	8,05	61,1
utrzac mir2 rv	CAAACAATACTTAAGAACCTTTGAGTAGTAGTTTAAGCTAGAC	43	43	30,2	66,1	31,7	8,05	61,1

Tableau 7 : amorces utilisées pour la mutagenèse des sites de fixation des microRNA sur le 3'UTR de PLAGL1

« Longueur » exprimée en nucléotides, « TM logiciel » et « Hairpin » en degrés Celsius, « dimer » en Kcal/mole

	Quantité ou volume
ADN matrice	50-80 ng
Primers sens et antisens	125 ng pour chaque primer
dNTP	1 µl
Quick solution	3 µl
Trampon de l'enzyme 10X	5 µl
Pfu High fidelity polymerase	2,5 U
eau	Qsp 50µl

Tableau 8 : mélange réactionnel utilisé pour la mutagenèse dirigée

Etape	Temps	Température
Activation de l'enzyme	3 minutes	95°C
Dénaturation des brins d'ADN	60 secondes	95°C
hybridation des amorces sur l'ADN	60 secondes	56°C
Élongation	1 minute/Kb	68°C
Élongation finale	7 minutes	68°C

} X 18 cycles

Tableau 9 : étapes de la PCR servant pour la mutagenèse dirigée

PLAQUE	6	12	96
ADN (µg)	1	0,5	0,1
EXGEN (µl)	8	4,5	0,8
Volume des tubes (qsp NaCl en µl)	50	28	5
Volume total (tube 1+2 en µg)	100	56	10
Volume de milieu à remettre	1,5ml	1ml	100µl

Tableau 10 : volumes de réactifs nécessaire à la transfection par Exgen de cellules en fonction du type de plaques de culture utilisées

.2.13 Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée par PCR est réalisée avec le kit Stratagene QuikChange® II XL (pfu Ultra et XL10 Gold). Une PCR est réalisée sur le fragment à modifier avec un couple d'oligonucléotides complémentaires, comprenant le ou les nucléotides à modifier. Les oligonucléotides de mutagenèse sont des 40-mers avec un minimum de 10 bases s'appariant strictement à la matrice de part et d'autre de la mutation et un Tm idéal supérieur à 78°C (<http://www.stratagene.com/QPCR/tmCalc.aspx>).

Le protocole de mutagenèse a dû être modifié pour la mutagenèse des sites de fixation des microRNA de la région 3'UTR clonées en aval de l'EGFP dans le plasmide pEGFPC3 en raison de la forte proportion de A et de T qui induisait des recombinaisons. Les amorces choisies sont répertoriées dans le tableau 7. La PCR est réalisée en utilisant le plasmide natif comme matrice. Les amorces choisies, qui sont dépourvues des bases à déléter, permettent l'élongation du plasmide selon un protocole décrit dans les tableau 8 et Tableau 9. Une fois la PCR effectuée, le plasmide natif (méthylé) est éliminé par digestion enzymatique grâce à l'enzyme DpnI qui ne dégrade que l'ADN méthylé. Puis la transformation bactérienne est réalisée avec les plasmides néosynthétisés. La vérification de la mutation ou de la délétion se fait par séquençage.

.3 Transfection

Les lignées de sarcomes ne sont pas d'utilisation courante, c'est pourquoi il a fallu que nous mettions au point la transfection de ces cellules.

Après avoir testé plusieurs agents de transfection, nous avons observé que les meilleurs taux de transfection dans les lignées MFH148, LPS78 et LPS80 étaient obtenus avec les agents de transfusions : Exgen 500 (Euromedex, pour les lignée MFH148 et LPS78) et Lipofectamine (Invitrogen, pour la lignée LPS80).

Exgen 500 est un agent de transfection de type polyéthylèneimine linéaire, il se comporte comme une éponge à protons et induit la rupture des endosomes par gonflement osmotique,

Plaque pour culture	Surface par puit	Volume de milieu pour la culture	Volume de milieu pour les dilutions	Quantité d'ADN	Volume de lipofectamine
96 puits	0,3 cm ²	100 µl	2 x 25 µl	0,2 µg	0,5 µl
24 puits	2 cm ²	500 µl	2 x 50 µl	0,8 µg	2,0 µl
12 puits	4 cm ²	1 ml	2 x 100 µl	1,6 µg	4,0 µl
6 puits	10 cm ²	2 ml	2 x 250 µl	4,0 µg	10 µl
60 mm	20 cm ²	5 ml	2 x 500 µl	8,0 µg	20 µl
10 cm	60 cm ²	15 ml	2 x 1,5 ml	24 µg	60 µl

Tableau 11 : volumes de réactifs nécessaire à la transfection par lipofectamine de cellules en fonction du type de plaques de culture utilisées

provoquant le largage rapide de l'ADN dans le cytoplasme tout en le protégeant des nucléases cytoplasmiques.

La transfection se fait sur des cellules à 70 % de confluence environ. Deux mélanges sont préparés, l'un contenant le volume adéquat d'Exgen et l'autre contenant l'ADN, tous deux dilués dans du NaCl à 150 mM. Le mélange contenant l'agent de transfection est ajouté goutte à goutte tout en vortexant dans le mélange contenant l'ADN, puis incubé 10 min à température ambiante pour permettre la formation des complexes Exgen/ADN. Le tout est ensuite ajouté goutte à goutte sur les cellules après avoir changé leur milieu de culture. Les cellules sont ensuite incubées 24 h à 48 h à 37°C et 5 % de CO₂ (Tableau 10).

La Lipofectamine est un agent de transfection de type liposome cationique, qui fournit une bonne efficacité de transfection et un haut niveau d'expression dans de nombreuses lignées.

La transfection se fait sur cellules à 90-95 % de confluence. Pour cet agent de transfection, l'ADN et la Lipofectamine sont dilués séparément dans de l'OptiMEM sans sérum. Chaque mix est incubé 5 min à température ambiante. Les deux mélanges sont réunis et incubés une nouvelle fois 20 min à température ambiante. Le tout est ensuite ajouté goutte à goutte sur les cellules après avoir changé leur milieu de culture. Les cellules sont ensuite incubées 24 h à 48 h à 37°C et 5 % de CO₂ (Tableau 11).

.4 Quantification de l'expression d'ARNm et microRNA par qRT-PCR

.4.1 Extraction des ARN

.4.1.1 Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est effectuée à l'aide du kit « RNeasy minikit » de Qiagen, selon les recommandations du fournisseur. Une quantité appropriée de cellules (en général 1×10^6 cellules) est lysée puis homogénéisée par passage répété (5-10 fois) du lysat au travers d'une seringue et d'une aiguille 20 G. Une fois le lysat homogène, les ARN sont purifiés sur colonne de silice par lavages successifs, puis élués dans 40 µl d'eau exempte de RNase.

Les ARN extraits sont conservés à -80°C.

.4.1.2 Extraction des microRNA

Le kit utilisé pour extraire les ARN totaux ne permet pas de récupérer les petits ARN inférieurs à 200 pb. Pour extraire les microRNA, il est donc nécessaire d'utiliser un kit spécifique : « miRNeasy mini kit » de Qiagen.

Ce kit combine une lyse par phénol/guanidine et une purification sur membrane de silice.

Les microRNA ainsi que tous les ARN sont extraits à partir de 10^6 cellules. La lyse des cellules et l'homogénéisation du lysat se fait à l'aide d'un tampon spécifique (QIAzol Lysis Reagent) qui est une solution monophasique de phénol et de guanidine thiocyanate qui facilite la lyse, inhibe les RNases et sépare la majorité de l'ADN et des protéines cellulaires du lysat par extraction organique. L'ajout de chloroforme permet la séparation du lysat en deux phases après centrifugation : la phase supérieure aqueuse contenant l'ARN et la phase inférieure organique contient les protéines et l'ADN quant à lui se retrouve à l'interface. La phase aqueuse est placée sur colonne de silice et les ARN sont purifiés par lavages et centrifugations successifs. Pour finir tous les ARN, y compris les microRNA, sont élués dans de l'eau exempte de RNase. Les ARN extraits sont conservés à -80°C.

.4.2 Dosage des ARN totaux et des microRNA

Une lecture de l'absorbance à 260 nm au Nanodrop (Labtech) permet de déterminer la quantité des ARN ; 1 DO (à 260 nm) = 44 ng/ μ l d'ARN. Le rapport des absorbances à 260/280 nm permet de connaître la pureté des ARN, ce ratio doit être compris entre 1,9 et 2,1 (ce qui signifie qu'il n'y a pas de contamination par des protéines). L'intégrité des ARN est estimée par observation du profil de migration des ARN sur gel d'agarose, où l'on doit voir clairement deux bandes correspondant aux ARN ribosomiaux 28S et 18S, la bande du 28S devant être deux fois plus intense que celle du 18S.

5X VILO reaction mix	4 μ l
10X SuperScript Enzyme mix	2 μ l
ARN	X μ l
Eau sans RNase	Qsp 20 μ l

Tableau 12: préparation de la réaction de transcription inverse pour les ARNm

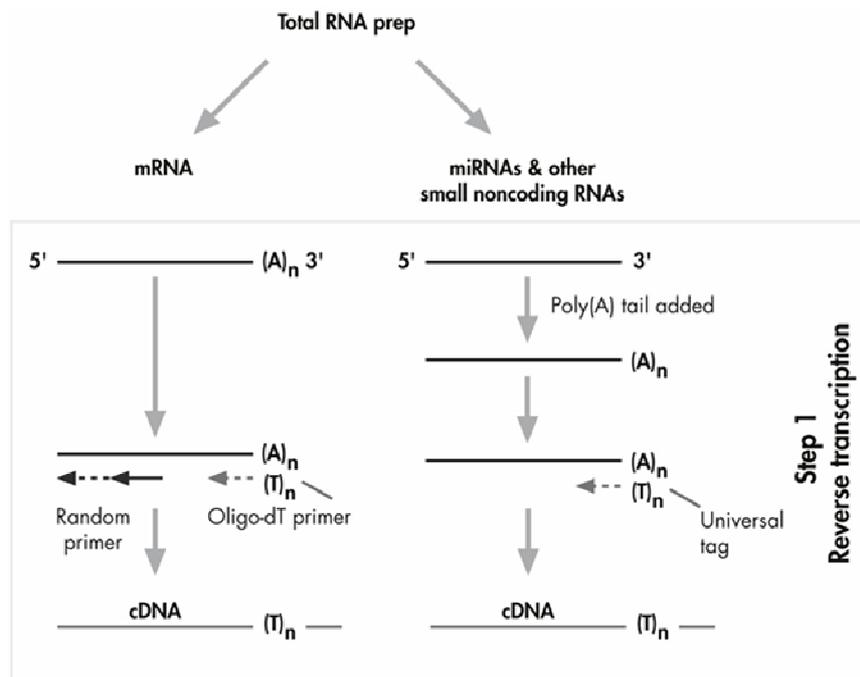


Figure 49 : principe de la transcription inverse des ARNm et des microRNA par le système miScript Qiagen

miScript RT Buffer, 5x	4 μ l
1x miScript Reverse Transcriptase Mix	1 μ l
ARN	X μ l
Eau sans RNase	Qsp 20 μ l

Tableau 13: préparation de la réaction de transcription inverse pour les microRNA

.4.3 Transcription inverse

.4.3.1 Rétro-transcription des ARNm

La rétro-transcription des ARN totaux se fait à l'aide du kit « SuperScript VILO cDNA synthesis kit » d'Invitrogen selon les recommandations du fournisseur. La rétro-transcription de l'ARN en ADNc se fait par utilisation d'amorces aléatoires, d'oligo (dT) et d'une enzyme à activité ADN polymérase ARN dépendante : la SuperScript reverse transcriptase III qui dérive de l'enzyme de même activité M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (Tableau 12).

La réaction comporte 3 étapes : 10 min à 25°C, suivie de la transcription inverse à proprement parler à 42°C pendant une heure. Pour finir l'enzyme est inactivée 5 min à 85°C.

Les ADNc sont conservés à -20°C. La retro-transcription peut être faite sur une gamme de 100 ng à 2,5µg d'ARN totaux.

.4.3.2 Rétro-transcription des microRNA

La rétro-transcription des microRNA et des ARN totaux se fait à l'aide du kit « miScript reverse transcriptase kit » de Qiagen et comporte plusieurs étapes (Figure 49). Tout d'abord il y a ajout d'une queue poly(A) sur tous les ARN (car les microRNA ne sont pas polyadénylés), cet ajout permet la synthèse d'ADNc à partir d'une amorce oligo (dT) pour les ARNm et les microRNA. Cette amorce oligo (dT) est fusionnée à une étiquette qui servira lors de la qRT-PCR. La synthèse d'ADNc se fait aussi par élongation à partir d'amorces aléatoires, qui permettent la rétro-transcription des ARNm, et autres grands ARN (Tableau 13).

La réaction de transcription inverse est effectuée pendant une heure à 37°C puis l'enzyme est inactivée à 95°C pendant 5 min.

Les ADNc sont ensuite conservés à -20°C. La retro-transcription peut être faite sur une gamme de 100 ng à 1 µg d'ARN totaux.

Nom de l'amorce	Séquence 5'-3'	Longueur	% en GC	Température d'hybridation théorique	Température réelle
PLAGL1 qPCR FW	GCC TCA GTC ACC TCA AAA GC	20	55	62°C	55°C
PLAGL1 qPCR RV	CTT AAC CTG TGG GGC AAA GA	20	50	60°C	55°C
GAPDH qPCR FW	GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT	20	50	60°C	55°C
GAPDH qPCR RV	TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG	20	45	58°C	55°C
β actine qPCR FW	GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG	20	55	62°C	55°C
β actine qPCR RV	AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG	20	55	62°C	55°C
P21 qPCR FW	ATG AAA TTC ACC CCC TTT CC	20	45	58	55°C
P21 qPCR RV	CCC TAG CCT GTG CTC ACT TC	20	60	64	55°C
PPARG qPCR FW	GCT GTG CAG GAG ATC ACA GA	20	55	62	55°C
PPARG qPCR RV	GGG CTC CAT AAA GTC ACC AA	20	50	60	55°C
APAF1 qPCR FW	TTC TGA TGC TTC GCA AAC AC	20	45	58	55°C
APAF1 qPCR RV	CTG GCA AAT CTG CCT TCT TC	20	50	60	55°C

Tableau 14 : récapitulatif des amorces utilisées pour les qRT-PCR servant à quantifier les ARNm

.4.4 PCR quantitative (qPCR)

La PCR en temps réel permet le suivi, cycle par cycle, de la production des amplicons, à l'opposé de la PCR conventionnelle où les amplicons ne sont détectés que dans la phase finale du processus d'amplification. Que ce soit pour quantifier les ARNm ou les microRNA, les qPCR ont été réalisées en utilisant du SYBR Green I comme agent fluorescent qui se fixe dans le grand sillon de l'ADN double brin.

.4.4.1 Quantification des ARNm

Pour les expériences de quantification d'ARNm par qRT-PCR, les amorces d'oligonucléotides ont été définies à l'aide du logiciel Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Elles ont été choisies de manière à avoir une taille d'environ 20 pb, une température d'hybridation de 55°C, un pourcentage de GC de 50% et permettre l'amplification d'un produit de PCR de 200 pb environ. Les séquences des amorces utilisées sont rapportées dans le Tableau 14. Les oligonucléotides ont été synthétisés par la société Eurogentec. Ils sont reçus en suspension dans de l'eau, à une concentration stock de 100 µM puis conservés à -20°C. La concentration utilisée pour les qPCR est de 10 µM.

Afin de réaliser une quantification comparative des transcrits, nous avons ajouté au milieu réactionnel de PCR classique (Taq polymérase, MgCl₂, dNTPs, eau, amorces, tampon de l'enzyme) du SYBR Green I au 1/25000 et 10 ng d'ADNc.

L'appareil de PCR quantitative en temps réel que nous utilisons est un Rotorgene 3000 (Corbett Life Science).

Pour chaque couple d'amorces utilisé, et afin de quantifier les ARNm, une première PCR classique est effectuée pour mettre au point les conditions de PCR (gamme de température d'hybridation et gamme de concentration de MgCl₂). Puis les produits d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose à 2 %. Sur ce même gel, le marqueur de taille : le Smart DNA Ladder (Invitrogen) est déposé comme un marqueur quantitatif. Ce marqueur permet, après une coloration du gel par du BET, de déterminer la taille des produits de PCR ainsi que la quantité déposée sur le gel. Ainsi, la quantité des produits de PCR pour chaque couple

Etape	Temps	Température
Activation de l'enzyme	15 minutes	95°C
Dénaturation des brins d'ADN	15 secondes	94°C
hybridation des amorces sur l'ADN	30 secondes	55°C
Élongation	30 secondes	70°C
Élongation finale	1 minute	70°C

} X 40 cycles

Tableau 15: cycles de qPCR

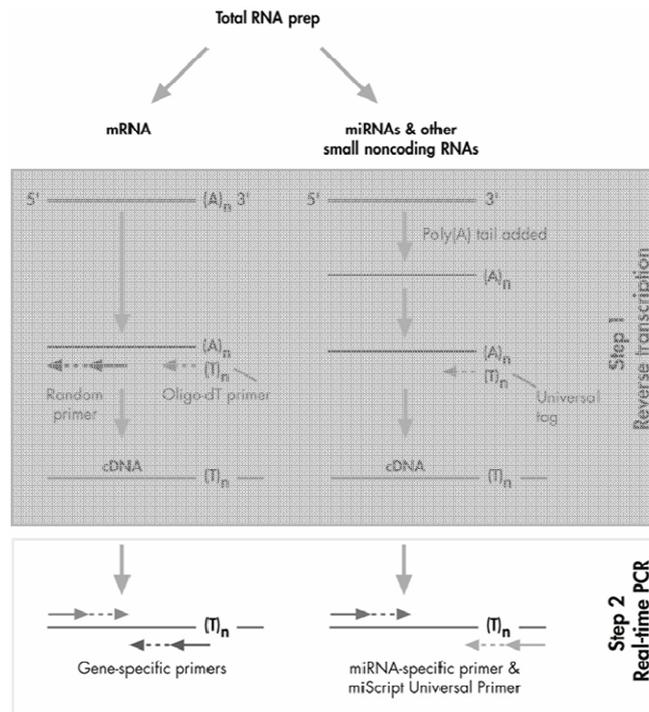


Figure 50 : principe des qRT-PCR réalisées sur ARNm et microRNA grâce au système miScript Qiagen

d'amorce peut être déterminée et les conditions permettant d'obtenir la plus grande quantité de produits PCR et donc d'avoir un meilleur rendement seront utilisées pour les qRT-PCR. Une fois les PCR mises au point pour chaque couple d'amorces, les qPCR peuvent être réalisées.

Pour les expériences de qRT-PCR sur les ARNm, deux gènes de ménage (dont l'expression est théoriquement constante quelque soit la lignée ou la tumeur considérée et quelque soit le traitement effectué) ont été choisis : la GAPDH (GlycérAldéhyde 3 Phosphate DeHydrogenase) et la β -actine (Tableau 15), la quantification a été réalisée sur 10 ng d'ADNc.

.4.4.2 Quantification des microRNA

Les qPCR sur microRNA n'ont pas nécessité de mise au point car les amorces commercialisées par Qiagen étaient déjà optimisées.

Les qPCR sur microRNA ont été effectuées à l'aide du kit « miSCRIPT Sybr Green » de Qiagen selon les recommandations du fournisseur (Figure 50).

Pour chaque microRNA, Qiagen a développé une seule amorce spécifique « miSCRIPT primer assay » qui s'hybride en 5' du microRNA mature, l'amorce qui s'hybride en 3' se lie à l'étiquette universelle rajoutée en 3' de tous les ARN lors de la transcription inverse.

Les qRT-PCR ont été réalisées sur cinq lignées (Hela, MFH 128, MFH 148, LPS 78, LPS 80) avec différentes amorces permettant d'amplifier les microRNA : miR15a, miR15b, miR15b, miR16, miR424. Les microRNA RNU1A et SnoRA73A ont été choisis comme « microRNA de ménage » d'après les recommandations de Qiagen.

Pour chaque amorce, la quantification du microRNA cible dans une condition donnée est réalisée en triplicat. Deux types de contrôles sont également effectués : l'un en faisant la qPCR sur l'ARN extrait qui n'a pas subi de transcription inverse (réaction effectuée mais sans ajout de l'enzyme ADN polymérase ARN dépendante) pour voir s'il y a une contamination par de l'ADN génomique et un contrôle sans matrice pour voir si les réactifs de qPCR et les amorces ne sont pas contaminés. Les quantifications ont été réalisées sur 10 ng d'ADNc.

Une fois les tubes préparés, ils sont placés dans l'appareil PCR Rotorgene 3000 (Corbett Research). La réaction de PCR se déroule en plusieurs étapes décrites dans le Tableau 15.

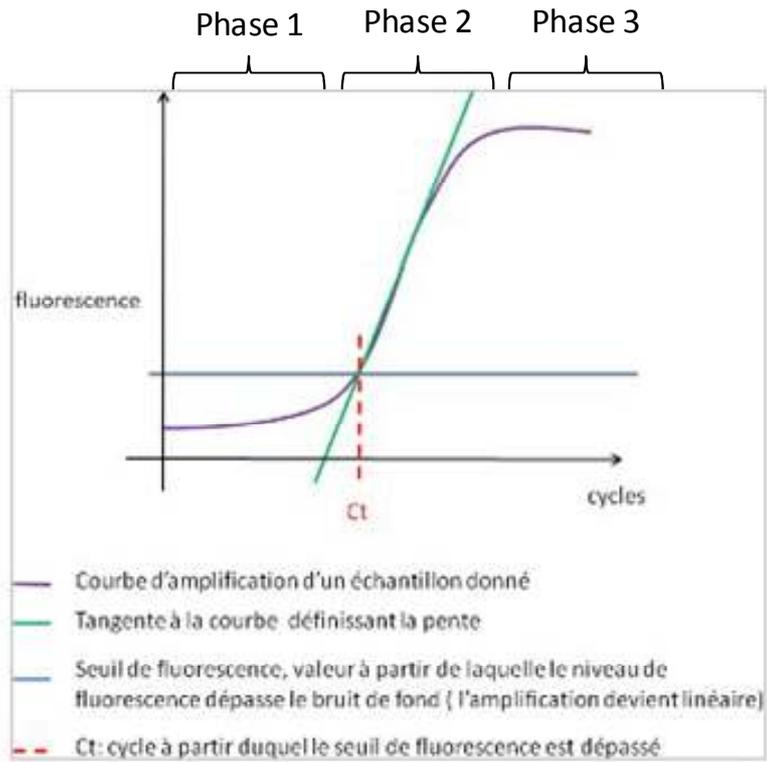


Figure 51 : détermination du C_t ou Take off de la qPCR

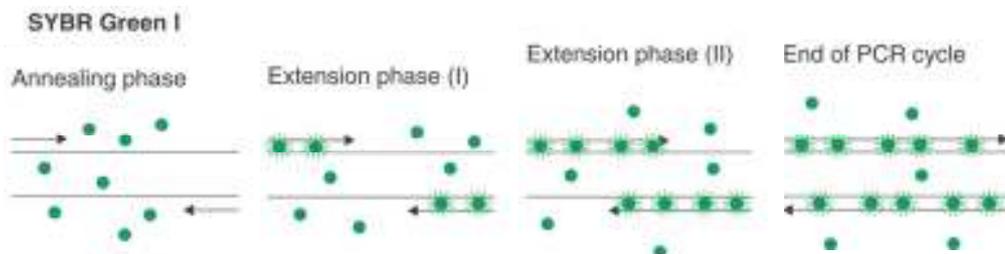


Figure 52 : principe du Sybr Green I

Pour vérifier le bon fonctionnement de la qRT-PCR ainsi réalisée, on effectue une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 4 % des produits de PCR obtenus.

.4.5 Electrophorèse pour vérifier la présence d'une bande unique

Selon la taille des fragments d'ADN à séparer, un gel est préparé à une concentration d'agarose appropriée (ici 3 % car la taille des amplicons est de 100 pb environ) dans du tampon TAE 0,5 X (Tris-acétate 40 mM ; EDTA 1 mM pH 8,0). Le BET est ajouté à une concentration finale de 10 µg/ml. La taille des fragments d'ADN séparés par électrophorèse peut-être déterminée par comparaison avec la position de marqueurs de taille (NEB) soumis simultanément à une électrophorèse sur le même gel. L'ADN est visualisé grâce au BET intercalé entre les bases de l'ADN sous excitation UV.

.4.6 Analyse des résultats obtenus

La PCR quantitative en temps réel permet de suivre la quantité de produit formé en fonction du temps grâce à un agent fluorescent spécifique des doubles brins. La fluorescence est enregistrée à la fin de chaque cycle pour le gène d'intérêt et pour les gènes de ménage (GAPDH, β -actine pour les ARNm, RNU1A1 et snoRNA73a pour les microRNA). La qPCR peut être divisée en trois phases (Figure 51) :

- la phase 1 de « bruit de fond » pendant laquelle la fluorescence acquise est inférieure au seuil de détection,
- la phase 2 exponentielle durant laquelle la fluorescence double à chaque cycle,
- la phase 3 de plateau qui correspond à une stabilisation de la fluorescence et un arrêt de l'amplification.

L'augmentation du signal fluorescent due au SYBR Green I fixé est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR (Figure 52). En évaluant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction de PCR durant le début de la phase exponentielle au cours de laquelle la quantité d'amplicons générés est en relation directe avec la quantité initiale d'ADNc d'intérêt (donc d'ARNm). Le concept du « cycle seuil » (Ct) est à la base d'une quantification précise et reproductible.

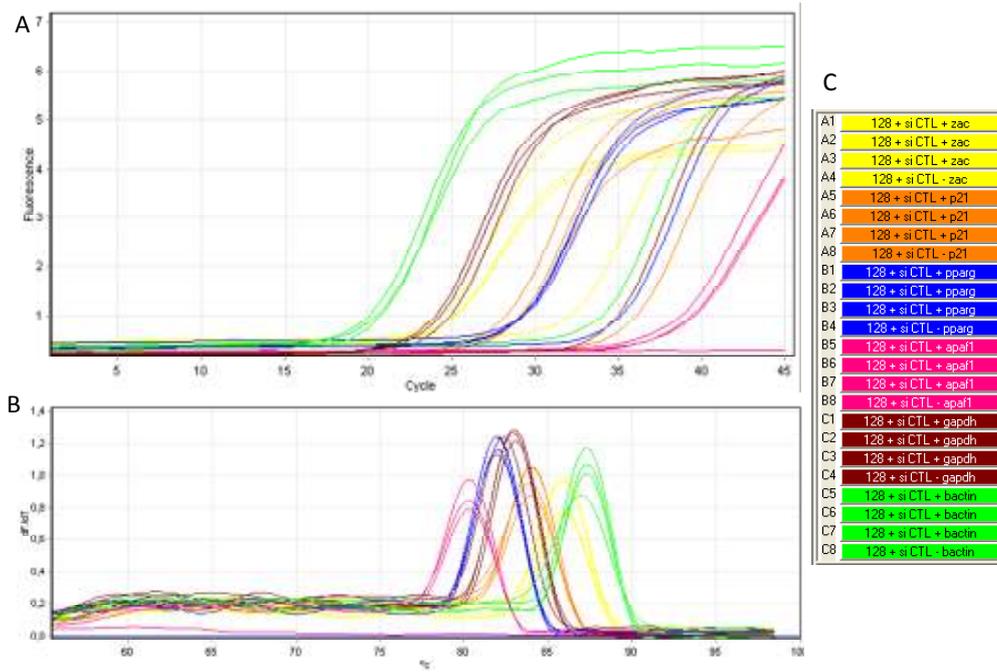


Figure 53 : quantification de la fluorescence émise par le Sybr Green I lors des qRT-PCR sur ARNm.

A : fluorescence en fonction du nombre de cycle servant à calculer le Ct ou « take off », B : température de fusion de chaque échantillon ou « melt », C : conditions testées (lignée / traitement / PCR sur échantillon ayant été rétro-transcrit ou non / amorce utilisée)

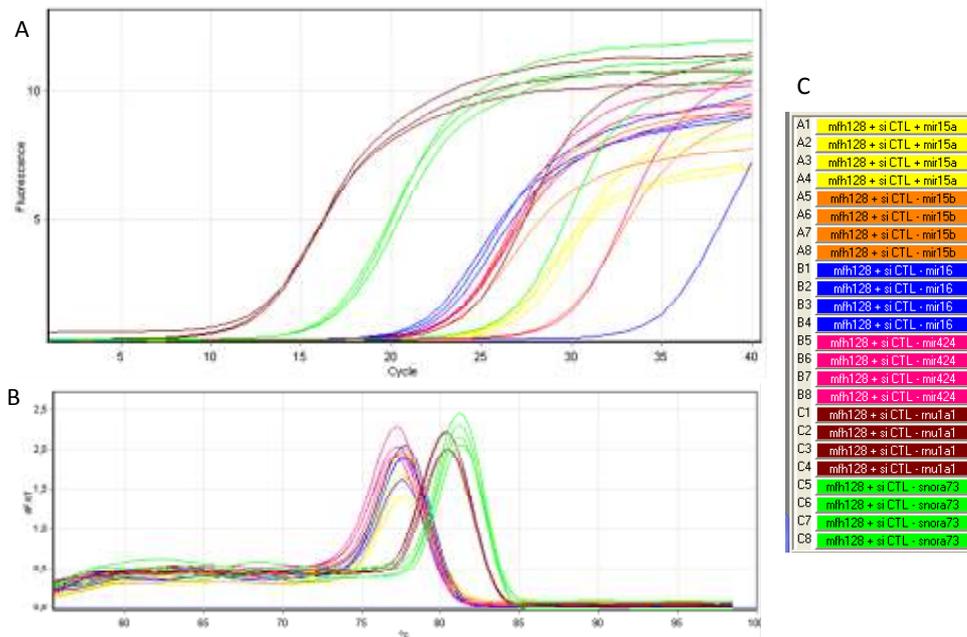


Figure 54 : quantification de la fluorescence émise par le Sybr Green I lors des qRT-PCR sur microRNA

A : fluorescence en fonction du nombre de cycle servant à calculer le Ct ou « take off », B : température de fusion de chaque échantillon ou « melt », C : conditions testées (lignée / traitement / PCR sur échantillon ayant été rétro-transcrit ou non / amorce utilisée)

Cette technique permet de déterminer le « Ct », le « take off », le « melt » et l'amplification. Le « Ct » pour Cycle threshold ou cycle seuil correspond au nombre de cycles à partir duquel le produit de PCR est détectable; la valeur seuil de fluorescence étant fixe pour tous les échantillons. Le cycle seuil est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc cible présent dans l'échantillon avant la PCR. Un Ct précoce correspond à un échantillon contenant beaucoup d'ADNc cible, et un Ct tardif à un échantillon contenant peu d'ADNc d'intérêt.

A la différence du Ct, le « take off », définit le nombre de cycle à partir duquel la valeur seuil de fluorescence est dépassée, mais cette valeur seuil est déterminée indépendamment pour chaque échantillon.

Le « melt » ou température de fusion correspond à la température à laquelle 50 % de l'ADNc est sous forme de simple brin. Cette mesure permet de déterminer la spécificité du produit de PCR formé (Figure 53, Figure 54).

Théoriquement, la quantité de produit formé est doublée à chaque cycle. L'amplification ou l'efficacité de la PCR est donc de 2. Or, dans la pratique, l'amplification n'est que rarement égale à 2, elle est admissible lorsqu'elle avoisine 1,7-1,8.

Un calcul décrit dans l'article de Pfaffl en 2001 permet de faire une quantification relative du niveau d'expression du gène d'intérêt par rapport à celle du gène de ménage (Pfaffl, 2001).

$$ratio\ d'expression = E^{-[\Delta Ct\ (echantillon) - \Delta Ct\ (controle)]}$$

Équation 1 : calcul de la différence d'expression d'un gène donné entre deux conditions, mesuré en qRT-PCR

Le ratio d'expression étant la différence d'expression du gène d'intérêt entre la condition X et la condition Y avec :

$$E = \text{efficacité de la PCR}$$

$$\Delta Ct(\text{échantillon}) = Ct(\text{échantillon condition X}) - Ct(\text{échantillon condition Y})$$

$$\Delta Ct(\text{controle}) = Ct(\text{controle condition X}) - Ct(\text{controle condition Y})$$

anticorps	Origine et spécificité	Fournisseur et référence	Dilution
Anti-zac (anticorps primaire)	Anticorps polyconaux de lapin reconnaissance la région de PLAGL1 comprise entre les résidus 211 et 463 (51kDa)	Santa Cruz (H253)	1/250
Anti-IgG lapin (anticorps secondaire)	Anticorps polyclonale de chèvre reconnaissance le fragment constant des IgG de lapin Couplé à l' Alexa 488 Dye	Invitrogen (11008)	1/400

Tableau 16:Anticorps utilisés pour l'immunocytofluorescence

La PCR permet en théorie de doubler la quantité d'ADNc de départ. Dans les faits, l'efficacité est plutôt voisine de 1,8 mais pour les calculs on accepte l'approximation en calculant le ratio d'expression avec une efficacité de 2.

$$\text{ratio d'expression} = 2^{-[\Delta Ct (\text{echantillon}) - \Delta Ct (\text{controle})]}$$

Équation 2 : calcul de la différence d'expression d'un gène donné entre deux conditions, mesuré en qRT-PCR (la PCR ayant une efficacité de 2)

.5 Immunocytofluorescence

.5.1 Principe

L'immunocytofluorescence permet de localiser spécifiquement une protéine dans des cellules en culture grâce à l'utilisation d'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Cet anticorps primaire sera lui-même détecté grâce à un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. La localisation de la fluorescence observée en microscopie confocale sera donc le reflet de la localisation de la protéine d'intérêt.

.5.2 Mise en pratique

La localisation intracellulaire du facteur de transcription PLAGL1 a été étudiée par immunocytofluorescence sur les lignées HeLa, MFH128, MFH148, LPS78 et LPS80. Les cellules cultivées sur les lamelles de verre, sont lavées au PBS (Phosphate Buffer Saline) avant d'être fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4 % pendant 10 min. Après avoir effectué 3 lavages au PBS, les cellules sont traitées au chlorure d'ammonium à 50 mM pendant 10 min pour éteindre la fluorescence parasite due aux aldéhydes contenus dans la PFA. Après rinçage au PBS, les cellules sont perméabilisées (pour permettre à l'anticorps de rentrer dans les cellules) par une solution de PBS -Triton X100 à 0,2 %-NGS 5 % (Normal Goat Serum, sérum normal de chèvre) pendant 5 min. Les sites aspécifiques sont bloqués en incubant les cellules avec du PBS-NGS 5 % pendant 30 min. L'anticorps primaire dilué dans du PBS-NGS 5% est alors mis à incuber avec les cellules pendant une nuit à 4°C (Tableau 16).

Après incubation avec l'anticorps primaire, les cellules sont lavées 3 fois au PBS, puis incubées avec l'anticorps secondaire dilué au 1 / 400^{ème} dans du PBS-NGS 5 % à température ambiante pendant 1 h 30.

Après un lavage, les noyaux sont marqués au Hoechst 33258 (agent intercalant de l'ADN) à 1 µM pendant 5 min à température ambiante. Les lamelles sont ensuite montées sur lame avec du Fluoromount-G avant d'être observées au microscope confocal.

.6 Immunohistochimie

.6.1 Principe

Cette technique permet de connaître la localisation subcellulaire et / ou tissulaire d'une protéine. L'immunohistochimie repose sur l'utilisation d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt et d'un anticorps secondaire dirigé contre le fragment constant de l'immunoglobuline spécifique de la protéine étudiée. Cet anticorps secondaire est couplé à une peroxydase de Raifort. Cette enzyme réagit en formant un produit coloré lorsqu'on ajoute comme substrat de la diaminobenzidine (DAB), du nickel et de l'eau oxygénée. L'immunohistochimie a été réalisée sur des coupes de tissus inclus en paraffine après fixation en PFA ou en Bouin Hollande (paraformaldéhyde, acide picrique, acide acétique, acétate de cuivre).

.6.2 Mise en pratique

Les immunohistochimies ont été réalisées sur un automate DAKO ou manuellement selon le même protocole et avec les mêmes réactifs.

Les coupes de tissus inclus en paraffine sont déparaffinées dans trois bains successifs de toluène pendant 5 min, puis réhydratées par passages dans plusieurs bains d'éthanol au pourcentage d'alcool décroissant pendant 3 min (deux fois dans de l'éthanol absolu, un bain dans de l'éthanol 90 %, un bain dans de l'éthanol 70 % puis un bain dans de l'éthanol 50 %). Pour finir la réhydratation, les lames sont rincées à l'eau 3 min.

Après avoir réhydraté les coupes de tissus, celles-ci doivent subir un traitement permettant le démasquage des sites antigéniques (masqués par l'inclusion). Les lames sont donc chauffées à 95°C pendant 20 min dans un tampon sodium citrate à 10 mM et à pH 8 (pour un marquage nucléaire et pH 6 pour un marquage cytosolique en général). Les deux tampons ont été testés pour l'anticorps anti-PLAGL1 et un meilleur marquage a été obtenu pour un démasquage en tampon citrate pH 8. Après chauffage, les lames sont laissées pendant 15 min dans le tampon sodium citrate à température ambiante. Les coupes sont ensuite rincées 3 min à l'eau pour enlever le tampon de démasquage qui pourrait bloquer les étapes suivantes.

Les coupes sont ensuite placées dans une chambre humide et une solution de blocage est déposée sur les coupes (DAKO REAL Peroxidase Blocking Solution). Ce tampon sert à bloquer les sites aspécifiques sur lesquels les anticorps pourraient se fixer et à inactiver les peroxydases endogènes. Les lames sont ensuite rincées trois fois à l'eau puis au PBS-Tween20 5 % pour perméabiliser les membranes (DAKO Wash Buffer 1X). Pour finir, les coupes sont mises dans une chambre humide et l'anticorps primaire dilué dans un tampon de dilution (DAKO) est déposé sur les coupes pour une incubation d'une nuit à 4°C.

Une fois l'anticorps hybridé, les lames sont rincées trois fois 2 min au PBS-Tween20 5 % pour éliminer l'excès d'anticorps. La détection de l'anticorps primaire se fait par ajout pendant 30 min à température ambiante d'un tampon contenant à la fois l'anticorps secondaire et la peroxydase (DAKO REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse).

Ce réactif est constitué d'une chaîne de dextrane sur laquelle un grand nombre de peroxydases (HRP) et d'anticorps secondaires sont fixés, ce qui permet une amplification importante du signal. Les lames sont de nouveau rincées trois fois au PBS-Tween20 5 %, avant d'ajouter le substrat des peroxydases pendant 5 min (DiAminoBenzidine, kit EnVision DAKO). Avant de monter les lames avec un milieu permettant la conservation du marquage une contre coloration des noyaux est effectuée à l'hématoxyline.

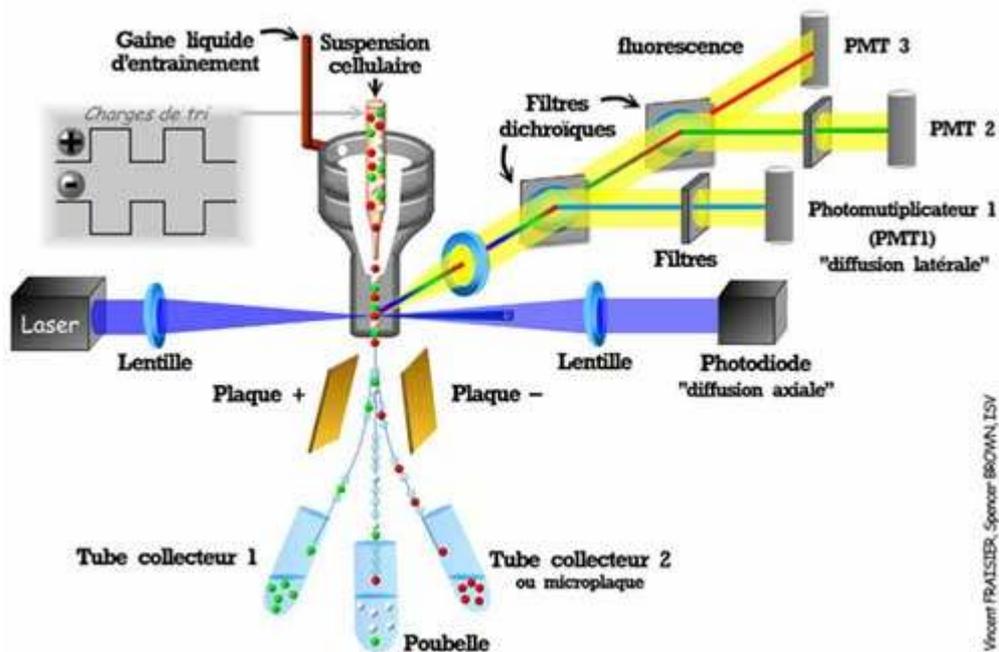


Figure 55: représentation schématique d'un cytomètre en flux

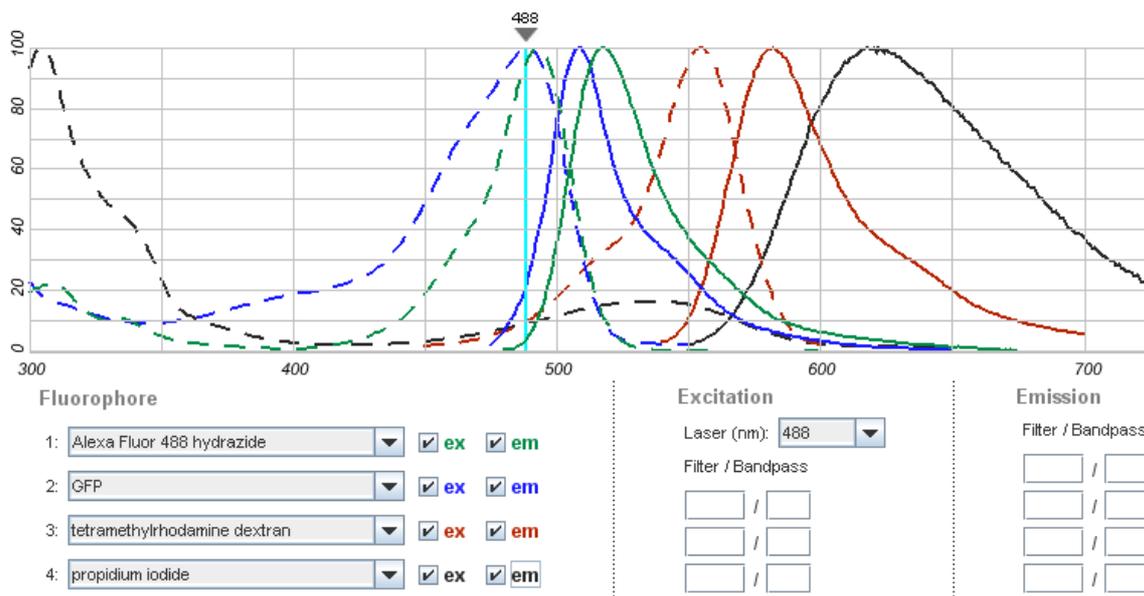


Figure 56 : spectre d'émission et d'excitation des fluorochromes utilisés en cytométrie de flux

.7 Cytométrie

.7.1 Principe

La cytométrie en flux est une technique de mesure qualitative et quantitative de plusieurs signaux lumineux émis par des cellules. Les cellules en suspension sont aspirées et défilent les unes à la suite des autres devant un laser à très grande vitesse (50 à 30000 cellules par seconde). L'excitation laser des cellules permet de recueillir plusieurs signaux optiques qui peuvent être de plusieurs origines : diffraction, réfraction, fluorescence, réflexion et qui permettent de connaître différentes caractéristiques physiques des cellules étudiées (Figure 55).

La lumière diffusée dans l'axe de la lumière incidente est due à la diffraction du faisceau incident provenant d'une photodiode sur la membrane plasmique et renseigne sur la taille de la cellule analysée, ce paramètre est appelé FSC pour Forward angle SCatter.

Une autre partie de la lumière émise par le faisceau incident est réfractée à 90°C lors de son passage au travers de la membrane cellulaire. L'intensité de cette réfraction permet de différencier les cellules selon leur granulosité, leur réfringence et le ratio noyau-cytosol. Ce paramètre est appelé : SSC pour Side angle light scatter.

Ces deux paramètres sont utilisés pour caractériser une population cellulaire ou différencier un type cellulaire parmi une population complexe de cellules en fonction de critères physiques.

L'utilisation principale de la cytométrie de flux est l'analyse quantitative de la fluorescence grâce à une source d'excitation laser et à différents filtres permettant de récupérer la lumière émise via un photomultiplicateur.

En effet, l'utilisation de molécules fluorescentes permet de mesurer la survenue de différents mécanismes cellulaires comme l'apoptose ou la progression dans le cycle cellulaire avec des sondes comme le TMRM (Tetramethyl Rhodamine Methylester) ou des agents intercalants fluorescents comme l'iodure de Propidium, mais également l'expression de protéines avec des anticorps couplés à des fluorochromes...

Les mesures en SSC et FSC des cellules à analyser permettent d'individualiser la population cellulaire d'intérêt. La création d'un « gate » (région sélectionnant la population cellulaire

paramètre mesuré	marqueur	nombre d'évènements	pourcentage d'évènements	moyenne de fluorescence	moyenne géométrique de fluorescence	médiane de fluorescence
FL1-H (Log)	All	19915	100.00	162.96	12.69	3.85
FL1-H (Log)	M1	13988	70.24	3.99	3.32	2.97
FL1-H (Log)	M2	5935	29.80	537.45	299.07	449.10

Tableau 17 : statistiques des paramètres mesurés: moyenne, médiane et moyenne géométrique de fluorescence et le pourcentage de cellules fluorescentes

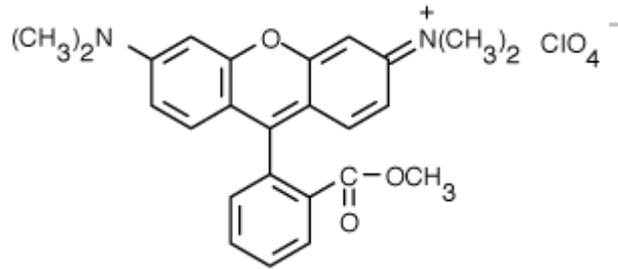


Figure 57 : structure du TMRM ,

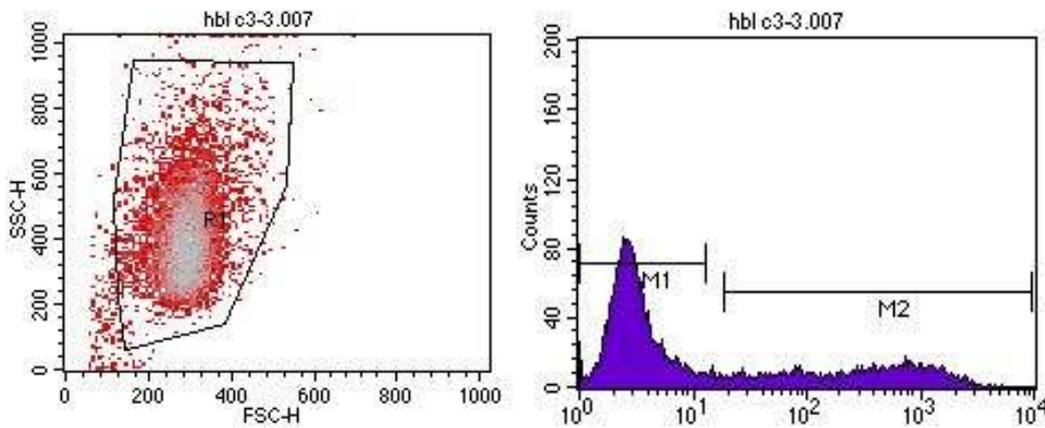


Figure 58 : graphiques représentant les évènements mesurés en fonction de leurs caractéristiques en FFC et SSC et de la fluorescence mesurée en FL1 (pour les cellules exprimant la GFP) ou FL2 (pour les cellules marquées au TMRM pour la mesure de l'apoptose)

d'intérêt) permet de mesurer la fluorescence émise par les cellules de cette région et permet donc d'éliminer les autres cellules, dans le cas d'un échantillon complexe, ou les débris cellulaires.

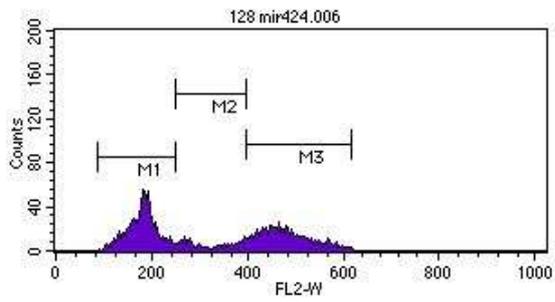
Trois canaux permettent d'acquérir le signal lumineux : FL1, FL2 et FL3 chacun ayant des bandes passantes spécifiques : en FL1 on peut enregistrer la fluorescence émise entre 515 et 545 nm, en FL2 on peut mesurer la fluorescence émise entre 564 et 606 nm et l'acquisition en FL3 permet de visualiser tout signal fluorescent dont la longueur d'onde est supérieure à 630 nm. La mesure de la fluorescence de la GFP ou de l'EGFP sera mesurée en FL1 tandis que le TMRM ou l'iodure de propidium seront mesurés en FL2 (ou en FL3) (Figure 56). Ces expériences permettent de connaître le pourcentage de cellules fluorescentes, la moyenne de fluorescence, la moyenne géométrique de fluorescence ou encore le nombre d'événements fluorescents. Le paramètre pris en compte dépend de l'expérience réalisée (mesure de l'apoptose, du cycle cellulaire...). Un exemple des valeurs quantifiables est donné dans le Tableau 17.

Les expériences de cytométrie ont été réalisées sur un FACS Calibur (BD Biosciences) ayant un module HTS (High Throughput Sampler) permettant l'analyse de cellules cultivées en plaque 96 puits.

.7.2 Mesure de l'apoptose

Le TMRM pour Tetramethyl Rhodamine Methylester est une sonde potentiométrique fluorescente (longueur d'onde d'absorption/émission : 549/573 nm). Cette sonde lipophile cationique s'accumule dans la mitochondrie selon le potentiel membranaire mitochondrial des cellules vivantes. Lors de l'apoptose, il y a dépolarisation de la membrane mitochondriale qui entraîne la libération du TMRM hors de la mitochondrie. La sonde étant lipophile, lors de l'apoptose le TMRM est libéré hors de la cellule. Les cellules non apoptotiques seront donc fluorescentes alors que les cellules apoptotiques seront non fluorescentes (Figure 57).

Les cellules cultivées en plaque 6 puits (passage au cytomètre en tube) ou 96 puits (passage au cytomètre en plaque) sont incubées avec le TMRM (200 nM) et du vérapamil (20 mM) qui inhibe la sortie du TMRM par les pompes mitochondriales MDR (multidrug resistant)



Phase du cycle cellulaire	marqueur	Pourcentage d'évènements
	All	100.00
G0/G1	M1	49.38
S	M2	11.23
G2/M	M3	39.67

Figure 59: graphique représentant les évènements mesurés en fonction de la fluorescence mesurée en FL2-W, représentant les différentes phases du cycle cellulaire (cellules marquées à l'iodure de propidium)

pendant 30 min à 37°C. Le milieu est ensuite ôté et les cellules sont décollées à la trypsine diluée au tiers dans du PBS 1X. Lorsque les cellules sont détachées de leur support, on ajoute une solution saline extracellulaire additionnée de SVF 4 % pour bloquer l'action de la trypsine. La fluorescence des cellules est ensuite mesurée par cytométrie de flux par acquisition de la fluorescence en FL2 grâce au logiciel Cell Quest Pro (pour la mesure en tube) ou Plate Manager (pour la mesure en plaque 96 puits). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules apoptotiques pour une condition donnée.

.7.3 Mesure du cycle cellulaire

Après avoir décollé les cellules à la trypsine (diluée au tiers dans du PBS 1X), les cellules sont centrifugées 5 min à 1000 rpm puis fixées à l'éthanol 70% 2 h à 4°C. Une fois les cellules fixées, une centrifugation est effectuée pour enlever l'éthanol et les cellules sont resuspendues dans une de marquage contenant : 0,1 % de Triton X100, 25 µg/ml de Iodure de Propidium (Sigma), 10 µg/ml de RNase, diluées dans du PBS 1X.

Les échantillons sont ensuite analysés au cytomètre par acquisition de la fluorescence en FL2 ou FL3 à l'aide du logiciel Cell Quest Pro (Figure 59).

.7.4 Immunofluorescence de PLAGL1 sur cellules en suspension pour une analyse en cytométrie de flux

L'analyse d'un marquage immunologique par cytométrie de flux permet de quantifier précisément l'expression d'une protéine à la différence d'une observation par microscopie de fluorescence. Le principe est le même que pour l'immunofluorescence.

Le milieu de culture des cellules cultivées en plaque 24 puits est prélevé, puis deux rinçages au PBS 1X sont réalisés. Les cellules sont ensuite décollées avec de la trypsine, puis fixées à la PFA à une concentration finale de 2 %, et aussitôt transférées en plaque 96 puits. Les étapes suivantes se font donc sur cellules en suspension selon le protocole décrit pour l'immunocytofluorescence classique décrite dans le paragraphe .5.2 page 207, mais en ajoutant des centrifugations après chaque étape réalisée.

Une fois l'immunofluorescence terminée, les cellules sont resuspendues dans du PBS 1X et analysées au cytomètre.

La fluorescence des cellules est lue en FL1 (anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 Invitrogen). Une différence de la moyenne de fluorescence totale en FL1 est le reflet d'une différence d'expression de la protéine d'intérêt.

.8 Western blot

.8.1 Principe

Le western blot, est une technique permettant de détecter la présence d'une protéine donnée dans un échantillon protéique totale, de connaître ou vérifier la taille de cette protéine et d'en mesurer les éventuelles variations d'expression.

.8.2 Extraction des protéines

La technique d'extraction permettant la meilleure détection de PLAGL1 en western blot s'est avérée être l'extraction par le froid ou « Ultimate freeze-thaw lysis for mamalian cells » qui repose sur la lyse des cellules par congélation-décongélation successive dans de l'azote liquide. Les cellules sont cultivées en plaque 6 puits. Le jour de l'extraction, le milieu de culture est retiré puis 1 ml de PBS 1X froid est ajouté par puits, les cellules sont décollées par grattage, puis transférées dans un tube Eppendorf pour être centrifugées 10 min à 1000 rpm. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les cellules sont resuspendues dans un tampon de lyse (600 mM de KCl, 20 mM de tris HCl pH 7,8, 20% de glycerol) auquel on ajoute des inhibiteurs de protéases (PMSF, leupeptine, aprotinine, EGTA, EDTA...). Le tube contenant les cellules est ensuite plongé dans l'azote pendant quelques secondes puis les cellules sont conservées à température ambiante jusqu'à décongélation totale, après homogénéisation au vortex. Le cycle congélation-décongélation est répété au moins trois fois. Les cellules sont ensuite centrifugées de nouveau 10 min à 13000 rpm. Le surnageant est récupéré, puis 1 unité de Benzonase (Merck, 250 U/ μ L) est ajoutée pour digérer l'ADN résiduel. La digestion est effectuée à température ambiante pendant 10 min. Les protéines sont ensuite stockées à -80°C ou utilisées immédiatement.

	Volume pour un gel
Eau	2.85 ml
Acrylamide/bisacrylamide	850 μ l
Tris-HCl 0.5M pH6.8	1,25 ml
SDS 20%	25 μ l
APS	25 μ l
Temed	5 μ l

Tableau 18: composition du gel de concentration à 5 %

	Volume pour un gel
Eau	4,1 ml
Acrylamide/bisacrylamide	3,3 ml
Tris-HCl 1.5M pH8.8	2.5 ml
SDS 20%	50 μ l
APS	50 μ l
Temed	5 μ l

Tableau 19: composition du gel de migration à 10 %

.8.3 Dosage des protéines

La concentration des échantillons protéiques est mesurée en utilisant le kit colorimétrique BioRad qui permet un dosage protéique selon la méthode de Lowry. Basée sur la réaction du biuret, elle utilise la réduction du Cu^{2+} en Cu^+ par les résidus tyrosine, tryptophane et cystéine des protéines. L'ion Cu^+ va ensuite réduire le réactif de Folin (une solution phénolique contenant des composés de tungstène et de molybdène) qui change sa couleur du jaune au bleu.

Les échantillons à doser, ainsi qu'une gamme étalon de SAB (Sérum Albumine Bovine) (comprenant 9 points de 0 mg/ml à 5 mg/ml) sont ajoutés aux réactifs du kit et la densité optique du produit de la réaction colorimétrique est mesurée à 750 nm sur un spectromètre en plaque 96 puits PowerWaveX (Bio-Tek).

.8.4 Réalisation du western blot et anticorps utilisés

Une fois la concentration protéique des échantillons mesurée, une quantité adéquate de protéines est déposée sur un gel de polyacrylamide dénaturant pour être soumis à une électrophorèse.

Le gel de migration des protéines est en fait constitué de deux gels. Le premier gel représente un tiers du gel de migration. Il est constitué d'un gel à 5 % d'acrylamide qui permet la concentration des protéines avant leur séparation selon leur poids moléculaire dans le gel de séparation (Tableau 18). Les deux tiers restants constituent le gel de séparation qui contient 10 % d'acrylamide (Tableau 19). Ce gel contenant du SDS, un agent dénaturant, la migration des protéines se fait selon leur poids moléculaire et non selon leur charge ou leur conformation. La migration des protéines est d'autant plus rapide que leur poids moléculaire est faible.

Les protéines, avant d'être déposées sur gel, sont diluées dans un tampon de charge contenant du bleu de bromophénol (colorant), du SDS et du β -mercaptoéthanol qui permettent de dénaturer les protéines. En plus des échantillons protéiques, un marqueur de taille « Precision Plus Protein » (Biorad) a également été déposé sur gel, ce qui permet de connaître la taille des protéines que l'on souhaite visualiser, mais également de suivre l'avancé de la migration et de vérifier la qualité du transfert. La migration des extraits déposés sur gel de polyacrylamide est réalisée pendant 15 min à 80 V pour permettre la concentration des protéines dans le gel de

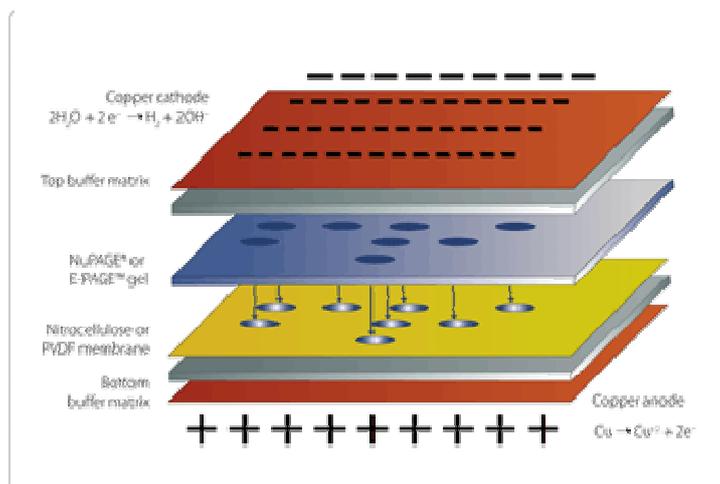


Figure 60: représentation schématique du principe de transfert iBlot

anticorps	Origine et spécificité	Fournisseur (référence)	Dilution utilisée
Anti-ZAC	Anticorps polyclonaux de lapin reconnaissant deux épitopes de la région c-terminale de la protéine PLAGL1 humaine	Euromedex	1/500
Anti-caspase 3	Anticorps polyclonaux de lapin reconnaissant les trois fragments de la caspase 3 (35, 19 et 17kDa)	Cell signaling technology (#9665)	1/1000
Anti-caspase 7	Anticorps polyclonaux de lapin reconnaissant les trois fragments de la caspase 3 (35, 19kDa)	Abcam (#ab1934)	1/500
Anti-actine	Anticorps polyclonaux de lapin reconnaissant l'actine humaine (42kDa)	Sigma (A2066)	1/5000
Anti-IgG lapin	Anticorps polyclonaux d'âne reconnaissant le fragment constant des IgG de lapin	GE Healthcare (NA934)	1/5000

Tableau 20 : liste des anticorps utilisés pour les expériences de Western blot

concentration et pendant 60-90 min à 120 V pour permettre la séparation des protéines selon leur poids moléculaire, dans un tampon Laemmli contenant du Tris pH 8,3 25 mM, de la glycine à 250 mM et 0,1 % de SDS. Une fois la migration achevée, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de PVDF au moyen de l'appareil « iBlot Device with Blotting Roller » (Invitrogen), dont le principe est rappelé sur la Figure 60. Le transfert est réalisé en 7 min à 20 V. La membrane de PVDF contenant donc les protéines est ensuite saturée pendant 2 heures sous agitation dans une solution de PBS-Tween20 à 0,1 % + lait à 5 % pour inhiber la fixation de l'anticorps primaire sur des sites aspécifiques (liste des anticorps utilisés : Tableau 20). Ensuite, la membrane est hybridée avec l'anticorps primaire dans une solution de PBS-Tween20 à 0,1 % + lait à 2,5 % pendant une nuit à 4°C sous agitation.

Une fois l'hybridation effectuée, la membrane est lavée 3 fois 5 min dans du PBS-Tween20 à 0,1 % + lait à 5 % puis 3 fois 5 min avec PBS-Tween20 à 0,1 % pour éliminer l'excès d'anticorps et les immunoglobulines fixées de façon aspécifique.

Après ces lavages la membrane est hybridée pendant 1 h 30 à température ambiante, sous agitation avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué au 1/10000^{ème} dans du PBS-Tween20 à 0,1 % + lait à 2,5 %. L'excès d'anticorps est éliminé par un lavage de 5 min avec du PBS-Tween20 à 0,1 % - lait à 2,5 % puis 3 lavages de 5 min avec PBS-Tween 0,1 % et un dernier lavage dans du PBS. Pour finir la membrane est incubée 5 min avec un substrat de la peroxydase (kit ECLplus Invitrogen). La révélation est réalisée grâce à l'appareil Fusion FX7 (Fisher) qui détecte, par une caméra CCD, la lumière émise par chimiluminescence.

.9 Analyse de la méthylation du promoteur de *PLAGL1*

De précédentes études ont montré une perte d'expression de *PLAGL1* dans de nombreux cancers due à une altération du profil de méthylation du promoteur de *PLAGL1*. Plusieurs techniques permettent d'étudier le statut de méthylation de l'ADN (Tableau 21). Le promoteur de *PLAGL1* est constitué de 118 dinucléotides CpG ; à chacun correspond un degré de méthylation.

Etant donnée le nombre de CpG dans le promoteur de *PLAGL1*, la longueur de l'îlot CpG et le nombre d'échantillons que nous souhaitons étudier (une centaine de sarcomes), la technique la plus appropriée pour étudier la méthylation de chaque CpG du promoteur de *PLAGL1* est le pyroséquençage.

Technique	Traitement des échantillons	DNA amount	Longueurs en pb	CpGs analysés	Haut débit possible
MassARRAY	Bisulfite conversion	250 ng ^a	200–600	>30	Possible
MethyLight	Bisulfite conversion	250 ng ^a	50–150	1–14 ^b	Yes
QAMA	Bisulfite conversion	250 ng ^a	50–150	1–4 ^b	Yes
ERMA	Bisulfite conversion	250 ng ^a	100–250	30	Yes
HeavyMethyl	Bisulfite conversion	30 pg	50–200	3–10 ^b	Yes
QBSUPT	Bisulfite conversion	10 ng	22–75	1–10	Yes
MS-SNuPE	Bisulfite conversion	250 ng ^a	N/A	1	Yes
MethylQuant	Bisulfite conversion	250 ng ^a	100–200	2–3	Yes
Quantitative PCR sequencing	Bisulfite conversion	250 ng ^a	100–670	NR	Yes
Oligonucleotide-based microarray	Bisulfite conversion	250 ng ^a	N/A	N/A	Yes
HPLC	Total hydrolysis	<1 µg	N/A	N/A	Yes
DMH	Enzyme digestion	>300 ng	N/A	up to 12,000	Yes
RLGS	Enzyme digestion	>1 µg	N/A	>2,000	No
BAC arrays	Enzyme digestion/ immunoprecipitation	>400 ng	N/A	Variable	Yes

Tableau 21: techniques d'analyses de méthylation de l'ADN (d'après (Brena et al., 2006))

CpGs cytosine–phosphate–guanine, QAMA quantitative analysis of methylated alleles, ERMA enzymatic regional methylation assay, QBSUPT quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology, MS-SNuPE methylation-sensitive single-nucleotide primer extension, PCR polymerase chain reaction, HPLC high-performance liquid chromatography, DMH differential methylation hybridization, RLGS restriction landmark genomic scanning, BAC bacterial artificial chromosome, NR not reported, N/A not applicable

- a- Le traitement au bisulfite peut être réalisé avec une quantité variable d'ADN génomique (1 ng-2 µg).
- b- l'utilisation de multiple primers permet d'augmenter le nombre de CpG analysable par amplicon

.9.1 Principe général de l'étude

Le pyroséquençage utilise une technologie de séquençage direct dans laquelle les nucléotides sont ajoutés consécutivement. Cette technique rapide, à la fois qualitative et quantitative, permet d'étudier le pourcentage de méthylation de chaque CpG et cela sur 96 échantillons simultanément.

Cependant, il existe des limites notamment la taille des fragments analysables qui ne doit pas dépasser en moyenne 60-120 nucléotides.

L'analyse de la méthylation de l'ADN se déroule en plusieurs étapes : tout d'abord l'ADN des cellules ou des tumeurs est extrait, puis il est converti par bisulfite de sodium avant d'être amplifié par PCR et séquencé par pyroséquençage.

.9.2 Extraction d'ADN génomique à partir de lignées

Les ADN des 4 lignées de sarcomes et des tumeurs de patients sont extraits avec le kit Qiagen « DNeasy Blood and Tissues kit » selon les recommandations du fournisseur. Une quantité appropriée de cellules (en général 10^6 cellules) ou de tissus frais ou congelé (25 mg) est lysée grâce à de la protéinase K puis l'ADN contenu dans le lysat est purifié sur une colonne de silice par lavages et centrifugations successifs, puis élué avec 200 μ l de tampon d'éluion.

.9.3 Dosage

Une fois les ADN extraits, ceux-ci sont dosés au Nanodrop (Labtech) à 260 nm. 1 DO (à 260 nm) = 50 ng/ μ l pour l'ADN double brin.

Une lecture de l'absorbance à 280 nm et 230 nm permet de déterminer la pureté de l'ADN ; en effet le rapport de DO 260 nm / 280 nm est normalement compris entre 1,8 et 2,0. Un rapport plus élevé indique une contamination par des ARN ; un rapport plus faible indique une contamination par les protéines (280 nm). De plus, le rapport 260 nm / 230 nm permet d'estimer si les sels utilisés pour la précipitation de l'ADN ont bien été éliminés ; ce rapport doit être supérieur à 1,7.

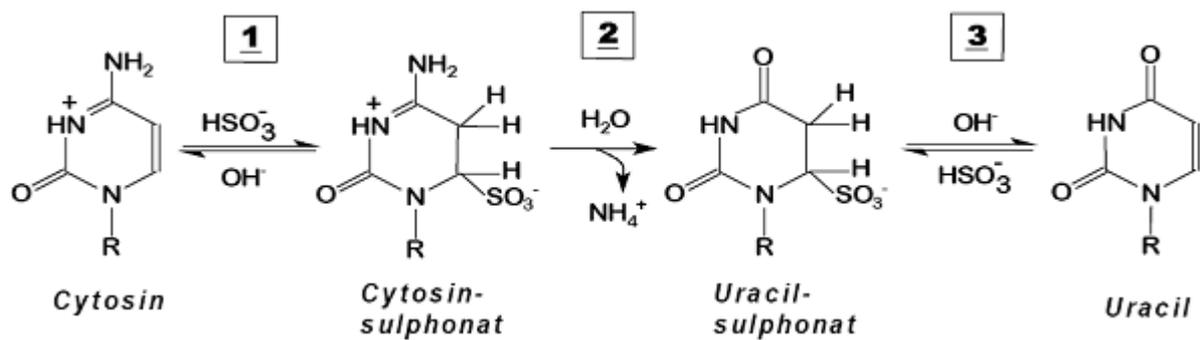


Figure 61 : principe du traitement au bisulfite de sodium

Étapes	Temps	Température
Dénaturation	5 min	99°C
Incubation	25 min	60°C
Dénaturation	5 min	99°C
Dénaturation	5 min	99°C
Incubation	85 min	60°C
Incubation	175 min	60°C
Conservation	15-18h	20°C

Tableau 22 : étapes du traitement de l'ADN au bisulfite de sodium

.9.4 Traitement au bisulfite de sodium

.9.4.1 Principe

Le traitement au bisulfite de sodium de l'ADN entraîne la désamination des cytosines non méthylées en uraciles. La conversion d'une cytosine méthylée en uracile s'effectue en plusieurs étapes résumées sur la Figure 61 :

- Sulfonation de la cytosine (1 sur le schéma) : en présence d'acide sulfamique (HSO_3^-), le groupement SO_3^- se fixe sur un carbone de la cytosine.
- Désamination de la cytosine (2 sur le schéma) : en présence d'une molécule d'eau (H_2O), il y a libération d'un groupement NH_2 .
- Désulfonation (3 sur le schéma) : perte du groupement SO_3^- en présence d'ion OH^- .

Ainsi, après ce traitement, on obtient une séquence d'ADN modifiée dans laquelle seules les cytosines méthylées persistent alors que les cytosines non méthylées ont été converties en uraciles. Cette technique permet de transformer une information épigénétique difficile à analyser en une information de type polymorphisme de base (C ou U) qui peut facilement être mise en évidence par de nombreuses techniques (digestion enzymatique, séquençage...).

.9.4.2 Protocole

Le traitement et la purification de l'ADN ont été réalisés à l'aide du kit Qiagen « Epitect Bisulfite Kit », selon les recommandations du fournisseur.

Une quantité d'ADN comprise entre 1 ng et 2 μg (en général 100-300 ng ont été utilisés) est ajoutée à une solution de bisulfite et à un tampon « DNA protect buffer » qui prévient la fragmentation de l'ADN généralement associée au traitement au bisulfite et accroît la dénaturation de l'ADN indispensable à la conversion des cytosines en uraciles. Puis, l'ADN est placé dans un thermocycleur programmé pour les cycles énumérés dans le Tableau 22.

La succession du cycle : dénaturation / conversion permet d'augmenter le taux de conversion. Une fois l'ADN convertit, celui-ci est purifié sur colonne de silice par lavages successifs avant son élution.

Étape	Temps	Température
Activation de l'enzyme	5 minutes	95°C
Dénaturation des brins d'ADN	30 secondes	95°C
hybridation des amorces sur l'ADN	30 secondes	X°C
Élongation	30 secondes	72°C
Élongation finale	7 minutes	72°C

} X 50 cycles

Tableau 23: déroulement de la réaction de PCR

.9.5 PCR (Polymerase Chain Reaction)

.9.5.1 Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) fut inventée par K. Mullis en 1983 et brevetée en 1985. Cette technique permet d'obtenir par répllication *in vitro* de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait d'ADN ou d'ADNc complexe. La réaction en chaîne de polymérisation est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN, la Taq polymérase, les amorces et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon. Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température réitérés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur. Les amorces sont conçues pour reconnaître spécifiquement la région d'intérêt. La taille des amorces est généralement comprise entre 10 et 30 nucléotides afin de garantir une hybridation suffisamment spécifique.

Dénaturation initiale

Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage (généralement 10 à 15 minutes à 95°C) est réalisée. Cette étape permet de déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique et d'activer les polymérases de type « Hot start » (Tableau 23: déroulement de la réaction de PCR).

Phase de dénaturation

Cette étape permet de déshybrider les ADN, de « décrocher » les polymérases qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces

Cette étape permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider à ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable.

Composant	Concentration finale	Volume
Tampon 10×	1X	5 μ l
Matrice (x ng/ μ l)	x ng	1 μ l
Mélange des 4 dNTP à 10 mM	200 μ mol/l	1 μ l
Amorce sens (10 μ M)	200 nmol/l	1 μ l
Amorce anti-sens (10 μ M)	200 nmol/l	1 μ l
Enzyme Taq platinum polymerase (Invitrogen) (5 unités/ μ l)	1 unité	0,2 μ l
Eau Millipore stérile		40,8 μ l

Tableau 24: mélange réactionnel de PCR

Phase d'élongation

Cette étape permet aux polymérase de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN matrice à une température qui leur est optimale (en général entre 68-72°C). Ce brin est synthétisé à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend de la longueur de l'amplicon (1 minute par kilobase).

.9.5.2 Protocole

La mise au point de la PCR a été effectuée sur différents ADN contrôles fournis par Qiagen : ADN méthylé et non méthylé traités au bisulfite par Qiagen et de l'ADN non méthylé non traité (qui sera traité au laboratoire avant la PCR). Les produits utilisés sont des réactifs Invitrogen (Taq polymérase, dNTPs, tampon, MgCl₂...). Les amorces ont été choisies avec le logiciel « PyroMark Assay Design 2.0 » de Qiagen et synthétisés par Eurogentec. La composition du mélange réactionnel de PCR est reportée dans le Tableau 24.

L'une des deux amorces a la particularité d'être couplée à une biotine. Seul le brin biotinylé sera utilisé pour le pyroséquençage. La PCR est réalisée dans un thermocycleur (Veriti, Applied Biosystem).

Afin de déterminer les conditions optimales de la réaction PCR, plusieurs températures d'hybridation sont testées ainsi que plusieurs concentrations en ions MgCl₂. Une migration sur gel d'électrophorèse à 2 % est réalisée pour vérifier le bon déroulement de la PCR.

.9.6 Electrophorèse pour vérifier la présence d'une bande unique

Après la PCR, une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée sur les produits obtenus pour vérifier la présence d'une bande unique et que la quantité d'amplicons obtenus est suffisante pour poursuivre l'analyse par pyroséquençage.

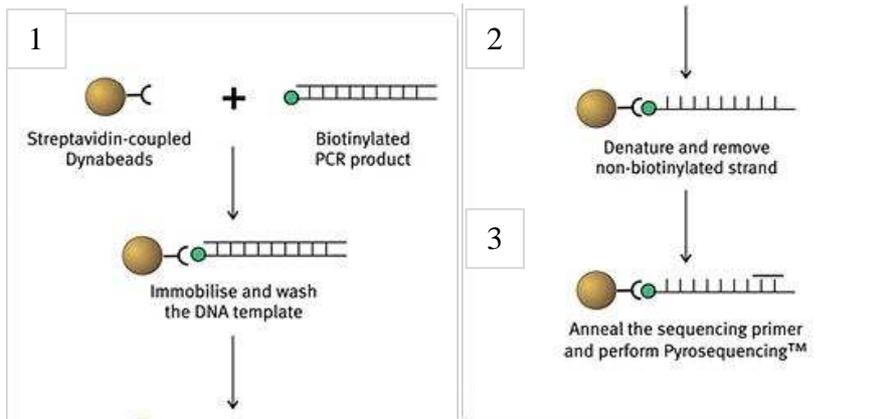


Figure 62 : préparation des produits PCR pour le séquençage

.9.7 Pyroséquençage

.9.7.1 Principe

Le pyroséquençage permet de mettre en évidence un profil de méthylation en déterminant le pourcentage de méthylation de chaque CpG. Cette technique nécessite la réalisation d'une PCR en amont. Seul le brin biotinylé sera utilisé comme matrice de lecture pour le pyroséquençage.

Le pyroséquençage se déroule en plusieurs étapes, schématisées sur la Figure 62:

Fixation des billes de sepharose sur la Biotine (1 sur le schéma) : la purification d'un brin d'ADN de l'amplicon, repose sur l'utilisation de billes de sepharose sur lesquelles sont hybridées de la streptavidine. La biotine et la streptavidine ont une forte affinité, ce qui va permettre la liaison du brin biotinylé à une bille de sepharose.

Purification des amplicons (2 sur le schéma) : cette étape de lavage se fait en deux temps, un lavage à l'éthanol 70% qui permet de conserver l'ADN, seul tous les autres éléments de la PCR étant éliminés, et un lavage avec un tampon de dénaturation (qui permet de déshybrider les deux brins de l'amplicon). A la fin de la dénaturation il ne reste alors que les brins biotinylés fixés aux billes. Pour finir, il y a une étape de lavage qui permet d'éliminer les brins non biotinylés.

Hybridation des amorces de séquençage (3 sur le schéma) : cette étape permet aux amorces de séquençage de s'hybrider à ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable (70°C). Une fois l'ADN monocaténaire fixé sur les billes de sépharose, celui-ci va être mis en présence d'amorces de séquençage dans un tampon permettant l'hybridation de ces amorces à l'ADN. Chaque puits peut contenir une amorce de séquençage différente.

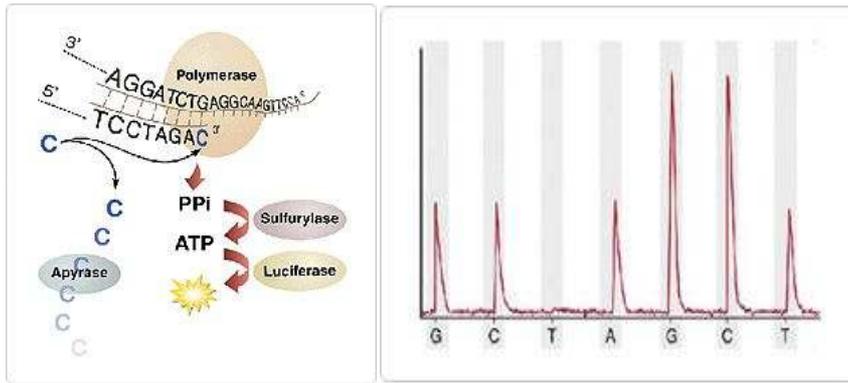


Figure 63 : principe du pyroséquençage

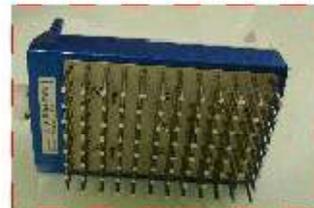
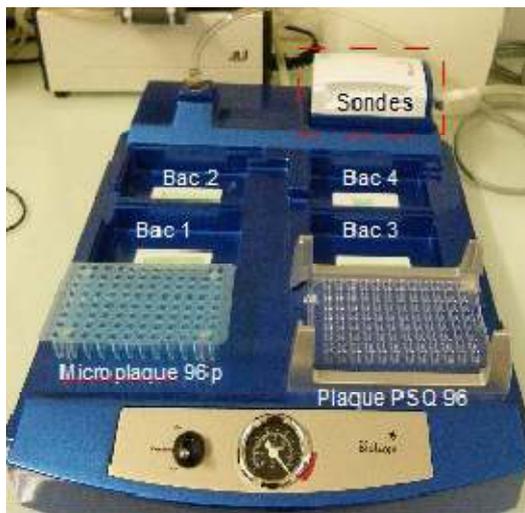


Figure 64 : A : cartouche permettant l'injection des enzymes, substrats, nucléotides lors de l'analyse par pyroséquençage, B : système d'aspiration permettant la purification de l'ADN monocaténaire avant le pyroséquençage

Une fois l'hybridation réalisée, l'appareil injecte tout d'abord un mélange d'enzymes : ADN polymérase, ATP sulfurylase, Luciférase et Apyrase ; puis leur substrat : Adénosine 5' phosphosulfate et Luciférine. Puis les nucléotides vont être ajoutés les uns après les autres. Si le nucléotide injecté dans le milieu réactionnel correspond au nucléotide attendu par l'ADN polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse (élongation). Cette incorporation libère un Pyrophosphate. L'ATP sulfurylase utilise ce Pyrophosphate pour produire de l'ATP, qui est lui-même utilisé par la luciférase et provoque la libération d'oxyluciférase et l'émission d'un signal lumineux qui sera capté par l'appareil. L'apyrase quant à elle dégrade les nucléotides en excès ou non incorporés.

Le signal lumineux est alors enregistré par un capteur, puis reproduit sous forme de pic sur un pyrogramme. La hauteur d'un pic est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés pour chaque base injectée (Figure 63).

.9.7.2 Protocole

Chaque bac, représenté ci-contre, contient une solution différente, le bac 1 contient de l'éthanol à 70 %, le bac 2 du tampon de dénaturation et le bac 3 de la solution de lavage, enfin le bac 4 contient de l'eau (Figure 64).

Deux mélanges réactionnels sont préparés. Le premier est constitué de billes Sépharose - Streptavidine diluées dans un tampon de liaison. Cette solution est ajoutée aux produits PCR (microplaque 96 puits sur le schéma). Cette microplaque est ensuite soumise à une rotation de 1300 rpm pendant 5 min à température ambiante pour permettre la liaison des billes, sur lesquelles sont fixées la streptavidine, à l'amplicon biotinylé.

Le second mélange est composé de l'amorce de séquençage dilué à 10 μ M dans du tampon d'hybridation, il est alors déposé dans chacun des puits de la plaque 96 puits (plaque PSQ96 sur le schéma).

La purification des produits PCR s'effectue par aspiration. Les sondes sont tout d'abord lavées à l'eau distillée. Puis l'aspiration des amplicons de PCR est réalisée avant de procéder à la purification en plongeant les sondes dans le bac contenant l'éthanol puis celui contenant le tampon de dénaturation et enfin celui contenant le tampon de lavage.

Une fois les produits PCR purifiés, les sondes de l'appareil d'aspiration sur lesquelles sont retenues les amplicons, sont déposées dans la plaque PSQ96, contenant les amorces de

séquençage. Cette étape nécessite une agitation d'environ 30 secondes qui permet la libération des billes dans chaque puits de la plaque PSQ96. Les sondes sont alors retirées de la microplaque PSQ96 puis de nouveau lavées à l'eau distillée.

La plaque PSQ96, contenant les amorces de séquençage et les produits PCR monocaténaire liés à la biotine, est chauffée à 70°C pendant au moins 15 minutes pour permettre l'hybridation des amorces de séquençage à la matrice. Chaque puits contient une amorce de séquençage. Une fois l'hybridation terminée, la plaque est placée dans le pyroséquenceur. Une cartouche d'injection des réactifs est alors préparée. Les volumes d'enzymes, de substrats et de nucléotides sont indiqués par le logiciel selon le nombre de puits à analyser et les séquences à lire, puis déposés dans la cartouche. La cartouche, permettant l'injection de l'enzyme, du substrat et des bases, est placée dans le pyroséquenceur. Le logiciel injecte le mélange d'enzymes et de substrats dans tous les puits, puis les nucléotides selon la séquence d'injection prédéfinie.

.9.8 Analyses statistiques

Les analyses statistiques concernant la première partie des résultats (régulation transcriptionnelle) ont été effectuées avec le logiciel R. Les données génomiques de PLAGL1 obtenues par CGH array (Agilent) et les données d'expression de PLAGL1 obtenues par puces d'expression (Agilent pour les US, LPS et LMS ou Affymetrix pour les GIST) suivent une loi normale. La corrélation entre ces deux données a été calculée par un coefficient de Pearson. Une p-value inférieure ou égale à 0,05 et un coefficient de Pearson supérieur ou égale à 0,3 ont été considérés comme significatifs.

Les associations entre : l'expression de l'ARNm de PLAGL1 et 1) la méthylation globale du promoteur de PLAGL1 ou 2) la méthylation de chaque CpG du promoteur de PLAGL1, ont été évaluées par le coefficient de Pearson corrigé.

Pour évaluer la significativité de la différence entre deux groupes d'un facteur clinique, sur les données d'expression ou de méthylation, les données sont ajustées par un modèle linéaire. Les paramètres estimés et les erreurs standards issus de ce modèle servent à réaliser un t-test modéré déduit d'une diminution Bayésienne empirique des erreurs standards vers une valeur commune (package Limma du logiciel R). Les p-values issues de ce modèle sont ensuite

corrigées pour les tests multiples par la méthode de Benjamini et Hochberg, évaluant ainsi le taux de faux positifs attendus (False Discovery Rate ou FDR). Les deux premières étapes de cette méthode (modèle linéaire suivi du t-test modéré avec réduction de la variance) ont l'avantage de permettre l'utilisation de cette méthode aussi efficacement qu'un test de Student même sur des données pour lesquelles la normalité des distributions n'est pas respectée (Smyth, 2005). En effet, la taille des échantillons étudiée étant inférieure à 30, la normalité n'a pu être mesurée.

Les courbes de survie ont été faites selon la méthode de Kaplan-Meier et calculées de la date du diagnostic à la date de dernier status connu.

Dans la deuxième partie des résultats, les expériences de qRT-PCR ont toutes été réalisées en triplicat. Les expériences de cytométrie, ont été faites en triplicat et répétées au moins trois fois. La significativité des résultats obtenus par qRT-PCR ou cytométrie a été appréciée par t-test. Les résultats ont été considérés comme significatifs lorsque la p-value était inférieure ou égale à 0,05.

**Première partie : régulation
transcriptionnelle de *PLAGL1* dans les
sarcomes**

.1 Résultats de la partie : régulation transcriptionnelle

.1.1 Modèles d'étude

Parmi les lignées cellulaires établies à l'Institut Curie et à l'Institut Bergonié, quatre ont été sélectionnées pour étudier l'expression de *PLAGL1* et les modes de régulation de l'expression de ce gène. La lignée MFH148 a été établie à partir d'un léiomyosarcome, les lignées MFH128, LPS78 et LPS80 ont été établies à partir de liposarcomes.

La grande variété des types de sarcomes rend l'analyse des profils complexe et difficilement informative en raison du faible nombre de tumeurs par type de sarcomes. Nous avons choisi, parmi les données disponibles, d'étudier le gène *PLAGL1* dans 89 tumeurs comprenant des léiomyosarcomes ou LMS (35 tumeurs), des sarcomes indifférenciés (US) regroupant des histiocytofibromes malins (MFH) et des myxofibrosarcomes (28 tumeurs), des liposarcomes (LPS) regroupant des liposarcomes dédifférenciés et bien différenciés (15 tumeurs) et des GIST (11 tumeurs).

Les tumeurs utilisées dans notre étude font parties de la Conticabase, une base de données européenne spécifique des sarcomes mise en place notamment par Jean-Michel Coindre à l'Institut Bergonié. Pour chaque prélèvement inclus dans la Conticabase, plusieurs données sont disponibles, comme : le conditionnement du prélèvement (inclus en paraffine, congelé, ADN ou ARN déjà extrait et disponible...), les données cliniques du patient (âge, date de prélèvement, type de traitement, type de chirurgie, grade tumoral, localisation anatomique de la tumeur...), les données immunohistochimiques (marquage p53, c-Kit...), le centre détenteur (Institut Bergonié, Curie...)...

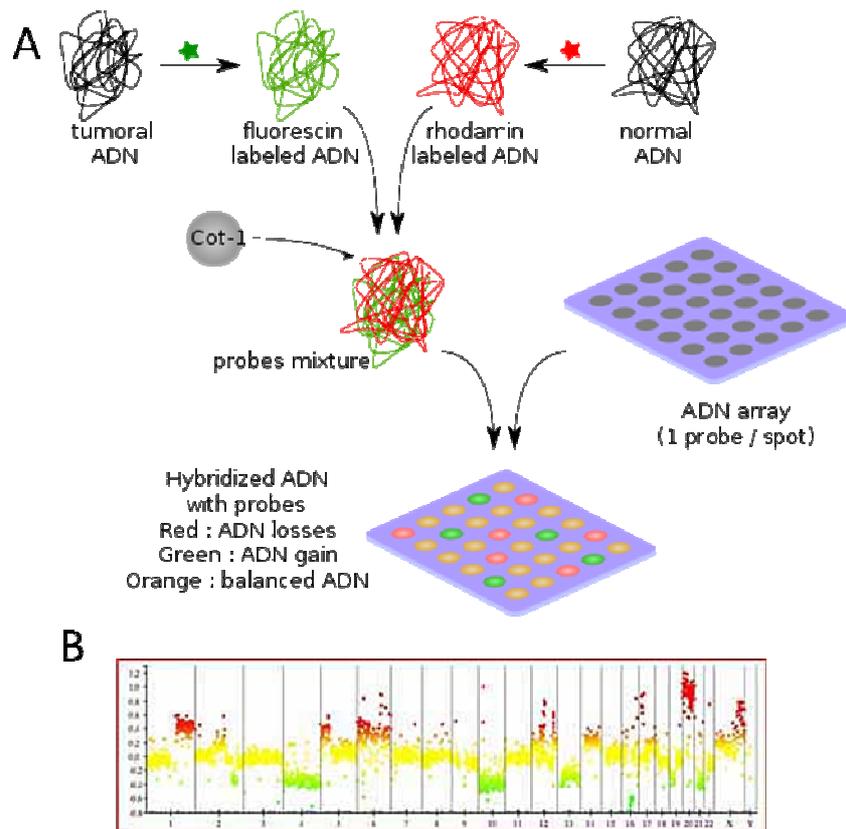


Figure 65 : principe de la CGH array. A : procédure, B : profil génomique obtenu après CGH array

.1.2 Expression transcriptionnelle de *PLAGL1* dans les sarcomes

.1.2.1 Profil génomique de PLAGL1

De très nombreuses études publiées sur *PLAGL1*, montrent une expression monoallélique de *PLAGL1* physiologique et la perte de l'allèle paternel dans plusieurs cancers (du sein, de l'ovaire...), causant une perte d'expression de *PLAGL1* (Bilanges et al., 1999), (Dusica et al., 2004).

Le profil du gène *PLAGL1* n'étant pas caractérisé dans les sarcomes, une analyse du profil génomique de *PLAGL1* a été effectuée dans des lignées et des tumeurs de sarcomes pour savoir si ce type de remaniement existait dans cette classe de cancer.

.1.2.1.1 Lignées

Afin de caractériser les lignées sélectionnées, une analyse génomique globale a été réalisée par CGH array à l'Institut Bergonié.

La technique de CGH array (Comparative Genomic Hybridization) permet de déterminer le nombre de copies de portions d'un génome par rapport à un autre. C'est une technique très utilisée en cancérologie pour quantifier les réarrangements génomiques des cellules tumorales, en comparant leur génome à celui de cellules saines utilisées comme référence. Cette technique est basée sur la liaison de l'ADN du génome fragmenté à des molécules fluorescentes de deux couleurs différentes rouge et verte (cyanine 5 et 3). Les portions non remaniées présentent un rapport 1 : 1 entre les deux fluorochromes, les régions délétées ou amplifiées expriment majoritairement l'un des deux fluorochromes. Dans le cadre de cette analyse, le génome de lignées de sarcomes a été comparé à celui de cellules sanguines comme contrôle de tissu sain. Les niveaux de fluorescence acquis sont ensuite normalisés par rapport au génome normal. Une valeur de 1 est affectée aux régions non remaniées, les valeurs supérieures à 1 représentent les régions amplifiées, les valeurs inférieures à 1 représentent les régions délétées. Plus la valeur du remaniement est forte, plus le remaniement est quantitativement important.

Name	Chr	Position	LPS78L	LPS80	MFH128	MFH148
g1int725 (PLAGL1)	6	143287285	3,7910	1,1580	2,1790	0,975
g1CNS556 (PLAGL1)	6	144840012	5,5130	2,4350	ABS	0,898

Tableau 25 : remaniements génomiques de la région chromosomique de *PLAGL1* mesurés par CGH array dans les lignées de sarcomes

sarcome	g1int725	g1CNS556	sarcome	g1int725	g1CNS556	sarcome	A_14_P101276	A_14_P136836	A_14_P112482
LMS	1,647	1,54	LPS	1,077	0,9298	GIST	0,4812	0,5855	1,0396
LMS	0,8562	1,0519	LPS	1,0338	0,9272	GIST	-0,1301	-0,1511	-0,3995
LMS	1,049	NA	LPS	1,1258	NA	GIST	-0,0773	0,0443	0,6164
LMS	1,0875	0,8925	LPS	0,7526	0,9733	GIST	-0,1264	0,0243	0,4009
LMS	0,982	1,075	LPS	0,9876	1,0403	GIST	-0,0647	0,0432	0,5071
LMS	1,0168	NA	LPS	4,66	8,47	GIST	-0,0947	-0,1812	0,2681
LMS	1,0168	NA	LPS	0,7895	0,6462	GIST	-0,6595	-0,8071	0,3161
LMS	0,7749	0,6242	LPS	0,7895	0,6462	GIST	0,0829	-0,0325	1,0939
LMS	0,989	EEE	LPS	NA	0,8276	GIST	0,0361	-0,0289	0,7391
LMS	0,831	0,9931	LPS	1,2092	NA	GIST	-0,0521	-0,0736	0,8067
LMS	0,8981	0,8932	LPS	0,9546	1,0822				
LMS	1,0792	1,0253	LPS	1,519	NA				
LMS	1,3813	1,4006	US	1,0224	1,0154				
LMS	0,8609	NA	US	1,0091	0,9842				
LMS	0,9633	NA	US	0,9659	0,952				
LMS	1,1119	1,0182	US	1,0475	NA				
LMS	0,7738	NA	US	1,0056	1,0592				
LMS	1,0935	1,0822	US	0,8699	0,8651				
LMS	1,0091	NA	US	NA	1,0035				
LMS	1,0345	1,2649	US	1,1157	0,9428				
LMS	0,9208	1,0762	US	0,8196	1,0035				
LMS	1,2605	1,325	US	0,9639	NA				
LMS	0,9828	0,9337	US	0,9876	NA				
LMS	1,0644	1,2535	US	1,2	NA				
LMS	1,2294	1,0958	US	1,0556	0,9088				
LMS	0,93	NA	US	1,0126	1,0526				
LMS	0,8265	1,0837	US	1,026	NA				
LMS	NA	1,0483	US	1,2252	1,2614				
LMS	0,9311	1,0644	US	1,075	NA				
LMS	0,9586	0,858	US	0,9794	0,9126				
LMS	1,7508	0,9619	US	1,1157	NA				
LPS	0,957	1,029	US	0,9965	1,3268				
LPS	1,1631	0,9849	US	1,2201	1,2658				
LPS	1,0461	1,0182	US	1,1655	1,077				
LPS	1,0021	1,0381	US	0,9945	1,071				
			US	0,7922	0,7225				

Tableau 26 : remaniements génomiques de la région chromosomique de *PLAGL1* mesurés par CGH array dans les tumeurs de sarcomes

en rouge : les regions amplifiées : LMS, US, LPS>1,2, GIST>0,2

en jaune : les régions non remaniées : LMS, US, LPS [0,8 ; 1,2], GIST [-0,2 ; +0,2]

en vert : les régions délétées : LMS, US, LPS <0,8, GIST <-0,2

La quantification de l'abondance du gène *PLAGLI* est effectuée à l'aide de deux sondes : g1int725 et g1CNS556, mais il est important de regarder une région plus vaste pour connaître l'ampleur du remaniement. Ainsi, nous avons regardé 150 Kb en amont et en aval des sondes g1int725 et g1CNS556 de *PLAGLI* pour savoir si *PLAGLI* appartenait à une région remaniée. **Cette étude a permis de mettre en évidence des différences de profil génomique de la région chromosomique contenant *PLAGLI* entre les différentes lignées.**

Dans la lignée MFH148 issue d'un léiomyosarcome, *PLAGLI* n'est pas remanié (0,9). En effet, des valeurs comprises entre 0,8 et 1,2 sont considérées comme non remanié puisque l'erreur relative de cette technologie est de 0,2. Par contre, les trois autres lignées présentent une amplification de la région contenant *PLAGLI*. Le gène *PLAGLI* est amplifié d'un facteur 2, 3 et 5 dans les cellules MFH128, les LPS78 et LPS80 respectivement, trois lignées de liposarcomes (Tableau 25).

.1.2.1.2 Tumeurs

Une fois les lignées cellulaires de sarcomes caractérisées et montrant un remaniement de la région chromosomique de *PLAGLI*, une analyse génomique par CGH a été réalisée au laboratoire par l'équipe de Frédéric Chibon sur un grand nombre de sarcomes comprenant des LMS, des US et des LPS (sondes : g1int725 et g1CNS556). Parallèlement, une analyse par CGH array (plus résolutive que la CGH classique car des réarrangements de l'ordre de 200 pb sont identifiables contre 150 kb dans le cas de la CGH classique utilisant des BAC) a été effectuée sur des GIST (sondes : A_14_P101276, A_14_P136836 et A_14_P112482).

Il apparaît lors de l'étude du profil génomique de *PLAGLI* par CGH, que la région chromosomique contenant le gène *PLAGLI* est remaniée dans les sarcomes (Tableau 26).

	MFH128	MFH148	LPS78	LPS80	Chromosome	First.Probe.Relative.Position	Gene.Symbol
209318_x_at	13,0630799	2,77610399	7,92973183	8,40151954	6q24.2	144302842	PLAGL1
207002_s_at	12,5822173	2,50334874	8,05077376	8,52501176	6q24.2	144303126	PLAGL1
207943_x_at	12,0861395	2,81352469	7,94286634	7,97888203	6q24.2	144303131	PLAGL1
moyenne	12,6316667	2,7041342	7,97548498	8,3201236	6q24.2		PLAGL1

Tableau 27 : niveau d'expression de *PLAGL1* dans les lignées de sarcomes, ARNm quantifié par puce Affymetrix

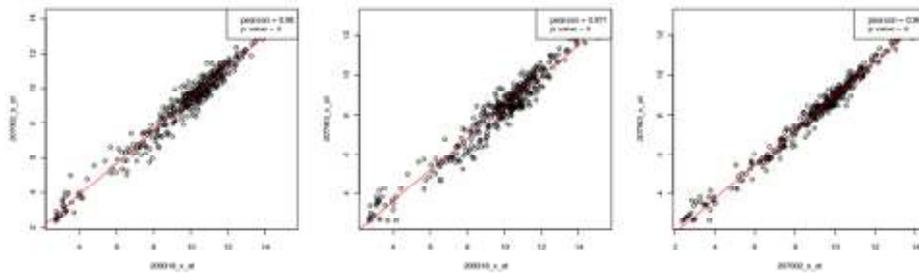


Figure 66 : validation des 3 sondes utilisées pour quantifier *PLAGL1* par puces Affymetrix sur les sarcomes (comparaison des sondes deux à deux)

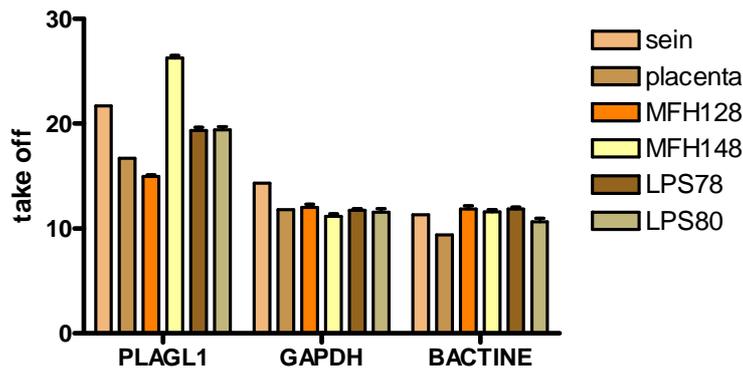


Figure 67 : quantification relative de l'ARNm de *PLAGL1* par qRT-PCR dans les lignées de sarcomes, le sein et le placenta

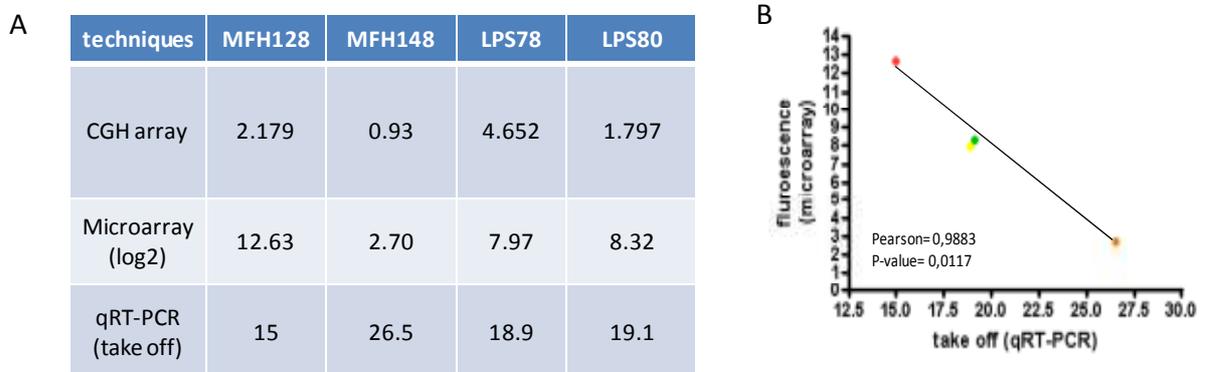


Figure 68 : tableau récapitulatif des données génomiques et transcriptomiques des lignées de sarcomes (A), corrélation entre les valeurs des puces Affymetrix et les résultats de qRT-PCR (B)

.1.2.2 Expression du transcrit *PLAGL1*

.1.2.2.1 Lignées

Une analyse transcriptomique par puce Affymetrix a été effectuée à l'Institut Curie, où les lignées ont été établies. Trois sondes ont été utilisées pour quantifier l'abondance du transcrit de *PLAGL1* : 209318_x_at, 207002_s_at et 207943_x_at. Les trois sondes ont été validées, ce qui nous a permis d'utiliser la moyenne de fluorescence de ces trois sondes pour le reste de nos analyses (Figure 66).

Cette analyse a permis de mettre en évidence une forte expression de l'ARNm de *PLAGL1* dans les MFH128 (valeur de fluorescence = 12,63 en \log_2), une expression intermédiaire dans les LPS78 (valeur de fluorescence = 7,97 en \log_2) et les LPS80 (valeur de fluorescence = 8,32 en \log_2) et aucune expression dans les MFH148 (valeur de fluorescence = 2,70 en \log_2) (Tableau 27).

Dans le but de confirmer ces données, nous avons réalisé des qRT-PCR sur ces quatre lignées. Pour chaque lignée, nous avons quantifié l'expression de *PLAGL1* par rapport à deux gènes de ménage : l'*ACTNB* (β -actine) et la *GAPDH* (glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase). Ceci a permis de valider les données de microarray, les cellules MFH128 expriment fortement l'ARNm de *PLAGL1* (take off = 15), les cellules MFH148 n'expriment pas *PLAGL1* (take off = 26,5), quant aux cellules LPS78 et LPS80, elles présentent un niveau intermédiaire d'ARNm de *PLAGL1* (take off respectifs = 18,9 et 19,1). Ces qRT-PCR ont été effectuées en incluant deux contrôles positifs : du tissu mammaire et du tissu placentaire normal (ADNc de Cliniscience). La corrélation entre les données de puces Affymétrie et celle des qRT-PCR est donnée dans la Figure 68.

L'expression de l'ARNm de *PLAGL1* est répartie ainsi : MFH128 > tissu placentaire > LPS78 > LPS80 > tissu mammaire > MFH148 (Figure 67).

Le calcul du $2^{-\Delta\Delta Ct}$, montre que : *PLAGL1* est 158,68 fois plus exprimé dans les cellules MFH128 que dans le tissu mammaire, 7,46 fois plus dans les cellules LPS78 que dans le tissu mammaire, 3,03 fois plus dans les cellules LPS80 que dans le tissu mammaire et 19,03 fois moins dans les cellules MFH148 que dans le tissu mammaire.

Type de sarcome	Transcrits PLAGL1						
LMS	2,5849625	LMS	10,7540524	US	6,87036472	GIST	13,88168
LMS	8,06069593	LMS	10,5459298	US	9,24079133	GIST	13,92258
LMS	3,80735492	LMS	10,0728025	US	3,169925	GIST	14,620144
LMS	5,72792045	LMS	9,78790256	US	6,33985	GIST	14,664939
LMS	10,4019461	LMS	9,07146236	US	7,25738784	GIST	14,748476
LMS	9,93810933	LMS	8,48784003	US	7,61470984	GIST	15,094006
LMS	8,72451385	LMS	9,68299458	US	8,37503943	GIST	15,294325
LMS	7,27612441	LMS	7,84549005	US	8,64024494	LPS	10,4747199
LMS	4,169925	LMS	7,41785251	US	9,03066714	LPS	10,1459321
LMS	7,60733031	LMS	10,5536293	US	9,20945337	LPS	11,3037807
LMS	10,2143191	LMS	10,1774195	US	9,29001885	LPS	10,2082344
LMS	10,1421071	LMS	10,0292872	US	9,47978026	LPS	12,7144602
LMS	9,59058705	LMS	9,93810933	US	9,75154406	LPS	10,3674148
LMS	8,89784546	US	9,99152185	US	9,78135971	LPS	11,1052538
LMS	11,1052538	US	10,1369911	US	9,85174904	LPS	3,80735492
LMS	9,67065625	US	9,4918531	US	10,0484869	LPS	12,7251532
LMS	8,15987134	US	10,0168083	US	10,1202379	LPS	13,0070273
LMS	8,85486838	US	9,509775	US	9,75154406	LPS	7,52356196
LMS	13,0701209	US	9,53138146	GIST	5,786949	LPS	14,9901483
LMS	6,52356196	US	9,59058705	GIST	7,18738	LPS	9,95419631
LMS	10,883407	US	9,94397991	GIST	10,690022	LPS	3,80735492
LMS	11,6843103	US	2,5849625	GIST	11,608786	LPS	9,42206477

Tableau 28 : niveau d'expression de *PLAGL1* dans les tumeurs de sarcomes, ARNm quantifié par puce Affymetrix pour les LMS, US, LPS et par puce Agilent pour les GIST

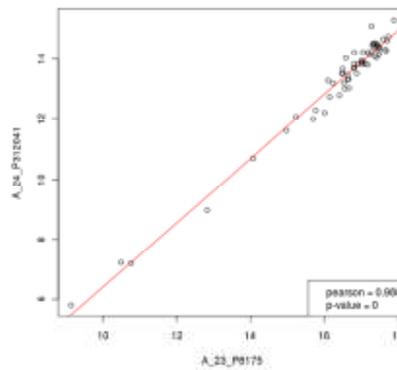


Figure 69 : corrélation entre les deux sondes utilisées pour quantifier *PLAGL1* en puce Agilent

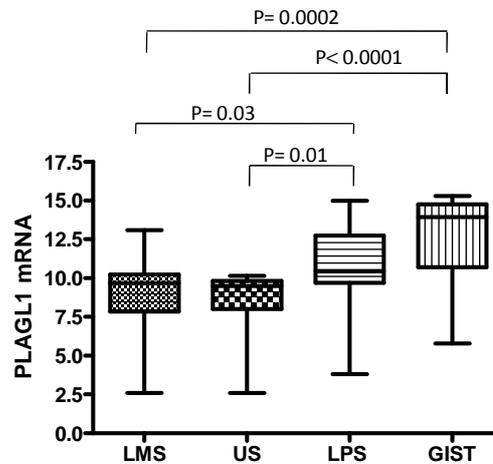


Figure 70 : niveau d'expression de l'ARNm de *PLAGL1* (en \log_2) dans les différents types de sarcomes étudiés

Les lignées MFH128, LPS78 et LPS80 présentent, respectivement, une amplification d'un facteur 2, 5 et 2 de la région chromosomique contenant le gène *PLAGLI* à la différence de la lignée MFH148 qui ne présente pas de remaniement. Or, on observe que l'expression du transcrite de *PLAGLI* ne corrèle pas au niveau d'amplification génique puisque, la lignée MFH128 exprime très fortement l'ARNm de *PLAGLI* contrairement aux lignées LPS78 et LPS80, qui l'expriment moins (cf tableau récapitulatif sur la Figure 68).

Il y a donc une absence de corrélation entre le profil génomique et transcriptomique de *PLAGLI* dans ces lignées de sarcomes.

.1.2.2.2 Tumeurs

Une analyse transcriptomique a été réalisée à l'aide de puces Affymetrix U133 plus 2 au laboratoire par l'équipe de Frédéric Chibon sur les tumeurs de patients sélectionnées précédemment pour l'analyse génomique et comprenant des LMS, des US et des LPS. Parallèlement, une analyse transcriptomique a été effectuée à l'aide de puces Agilent sur des GIST (Tableau 28). Les sondes utilisées pour les puces Affymetrix sont les mêmes que celles des puces réalisées sur les lignées de sarcomes (209318_x_at, 207002_s_at et 207943_x_at). La moyenne de fluorescence a été calculée car les sondes sont corrélées entre elles. Nous avons également vérifié la corrélation des deux sondes utilisées dans les puces Agilent (A_23_P8175 et A_24_P312041) (Figure 69).

Notre étude a montré une expression très variable de *PLAGLI* au sein des différents groupes de sarcome (Figure 70). En effet,

- les LMS ont une médiane d'expression à 9,67, les valeurs étant comprises entre 2,58 et 13,07 ;
- les sarcomes indifférenciés (US) ont une médiane d'expression à 9,48, les valeurs étant comprises entre 2,58 et 10,12 ;
- les LPS ont une médiane d'expression à 10,42, les valeurs étant comprises entre 3,81 et 14,99 ;
- les GIST ont une médiane d'expression à 13,9, les valeurs étant comprises entre 5,78 et 15,29 ;

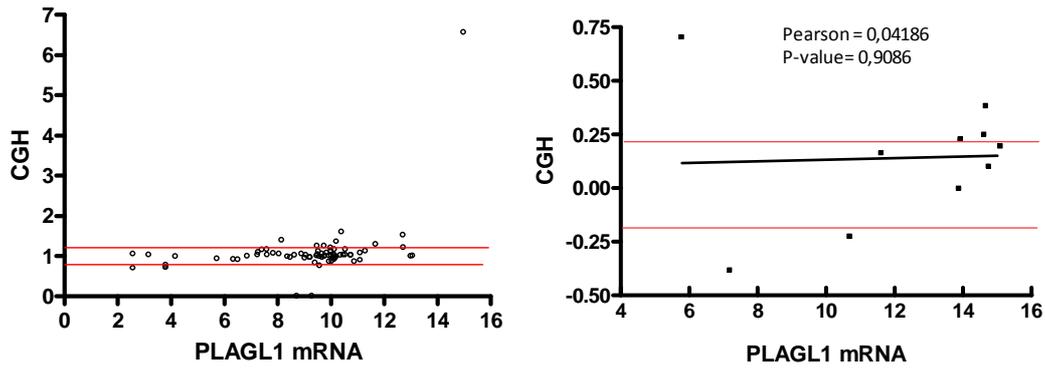


Figure 71 : corrélation entre l'expression du transcrit *PLAGL1* et les remaniements génomiques du 6q24-q25 dans A : les sarcomes, B : les GIST (entre les deux lignes rouges se situe la zone de non remaniement)

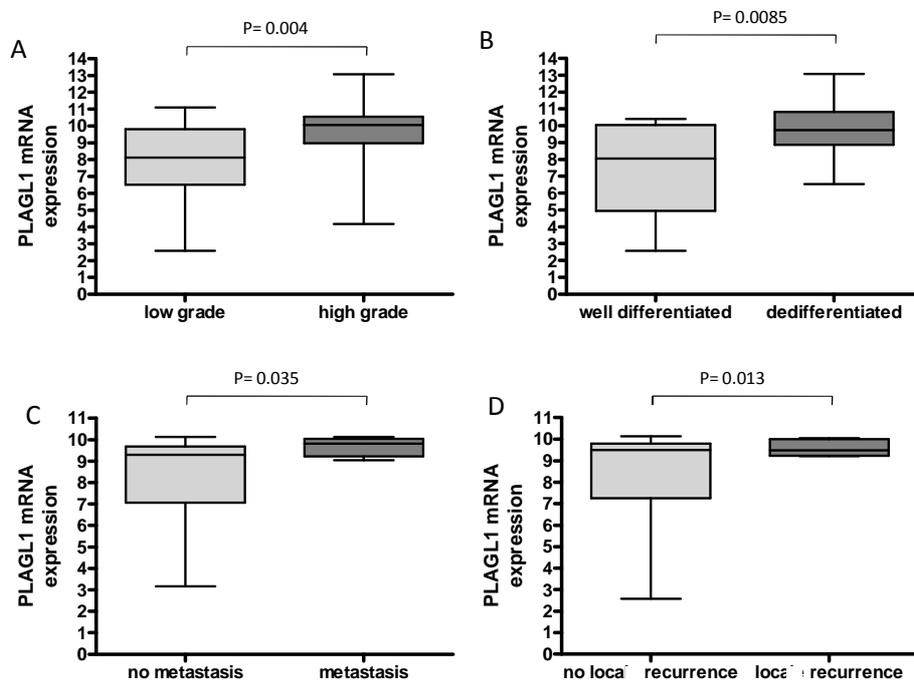


Figure 72 : l'expression de l'ARNm de *PLAGL1* est significativement différente en fonction : A : du grade dans les LMS, B : de la différenciation tumorale dans les LMS, C : de la survenue de métastase dans les US, D : de la récurrence locale dans les US.

Dans les LPS et surtout dans les GIST, l'expression de *PLAGLI* est significativement plus importante que dans les US et les LMS. De façon globale, *PLAGLI* a une expression très hétérogène dans les quatre groupes de sarcomes. Cette hétérogénéité de l'expression de *PLAGLI* ne peut être due à des modifications du profil génomique dans les US, les LMS et les LPS, puisque nous avons montré qu'il n'y avait pas de remaniement de la région chromosomique contenant *PLAGLI* (Tableau 26 et Figure 71). En revanche, les GIST présentent des remaniements du gène *PLAGLI*. Nous avons regardé si les profils génomiques expliquaient les différences d'expression de l'ARNm de *PLAGLI*. En corrélant le niveau du transcrit *PLAGLI* avec l'indice des remaniements, on trouve un coefficient de Pearson à 0,04186 et une p-value à 0,9086 qui nous permet d'écarter cette hypothèse (Tableau 26 : remaniements génomiques de la région chromosomique de *PLAGLI* mesurés par CGH array dans les tumeurs de sarcomes et Figure 71).

Dans les quatre groupes de sarcomes étudiés, le niveau d'expression de *PLAGLI* ne s'explique pas par des remaniements génomiques.

.1.2.2.3 ARNm de *PLAGLI* : facteur diagnostique ou pronostique ?

Ensuite, nous avons regardé si le niveau d'expression de *PLAGLI* pouvait être corrélé à des facteurs cliniques et si *PLAGLI* pouvait être un bon facteur pronostique ou diagnostique, dans les différents groupes de sarcomes.

Ceci a permis de constater une expression différentielle de *PLAGLI* en fonction :

- du grade (p value = 0,004) et de la différenciation (p value = 0,0085) dans les LMS,
- de la survenue de métastases (p value = 0,035) et de la rechute locale (p value = 0,013) dans les US (Figure 72).

L'expression de *PLAGLI* est faible dans les LMS de bas grade et bien différenciées, ainsi que dans les sarcomes indifférenciés ne présentant pas de récurrence locale et de métastases. La forte expression du transcrit *PLAGLI* serait donc un facteur de mauvais pronostic dans ces types tumoraux.

Les analyses effectuées sur les LPS et les GIST n'ont pas permis de mettre en avant un rôle pronostique ou diagnostique de *PLAGLI*.



Figure 73 : représentation schématique de l'îlot CpG P1 du gène *PLAGL1*, les barres noires représentent les 118 CpG et leur répartition au sein de l'îlot

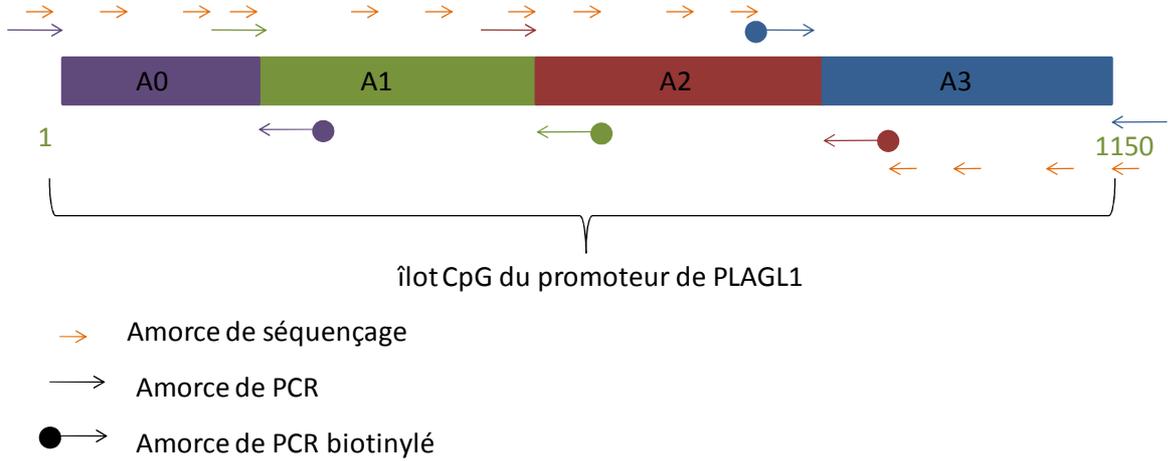


Figure 74 : représentation de l'îlot CpG du promoteur de *PLAGL1* et de la stratégie mise en œuvre pour l'étude de la méthylation au pyroséquenceur

.1.3 Régulation transcriptionnelle de *PLAGL1* par la méthylation de son promoteur

Dans de nombreuses études, il a été démontré que l'expression du transcrite de *PLAGL1*, qui est un gène soumis à l'empreinte parentale, était dérégulée dans certaines pathologies par une altération de la méthylation de son promoteur. En effet, il a été montré que la perte d'expression de *PLAGL1* dans de nombreux cancers était due à une hyperméthylation de son promoteur ou à une perte d'hétérozygotie. Au contraire, dans le syndrome TNDM (diabète transitoire néonatal) *PLAGL1* était surexprimé et cette surexpression était due à une hypométhylation de son promoteur.

.1.3.1 Mise au point de l'analyse de méthylation par pyroséquençage

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il existait une méthylation différentielle du promoteur de *PLAGL1* responsable de l'hétérogénéité de l'expression de *PLAGL1* dans les lignées et dans les tumeurs de sarcomes. Ainsi, les lignées MFH128, LPS78 et LPS80 qui expriment l'ARNm de *PLAGL1* seraient moins méthylées que la lignée MFH148 qui n'exprime pas l'ARNm de *PLAGL1*.

Plusieurs techniques sont disponibles pour analyser la méthylation d'un promoteur. Ces analyses peuvent être réalisées par digestion enzymatique, par séquençage, pyroséquençage, ou par PCR spécifique de la méthylation (ou MSP) qui permet de discriminer par PCR, l'allèle méthylé du non méthylé en utilisant des amorces spécifiques.

L'expression de *PLAGL1* est dirigée par deux promoteurs tissu-spécifiques contenant chacun un îlot CpG. Le promoteur P1 permet l'expression de *PLAGL1* dans de nombreux types cellulaires à l'exception des leucocytes. Il contient un îlot CpG regroupant 118 sites de méthylation. Le promoteur P2 permet l'expression de *PLAGL1* exclusivement dans les leucocytes et contient un îlot CpG regroupant 113 sites de méthylation.

Pour savoir si l'expression de *PLAGL1* était régulée par méthylation de l'ADN dans les sarcomes, nous avons choisi d'étudier le niveau de méthylation de l'îlot P1.

Cet îlot compte 118 dinucléotides CpG qui peuvent avoir chacun un pourcentage de méthylation propre (Figure 73). Etant donné le nombre de sites de méthylation du promoteur de *PLAGL1* et leur densité, nous avons choisi d'étudier la méthylation par pyroséquençage,

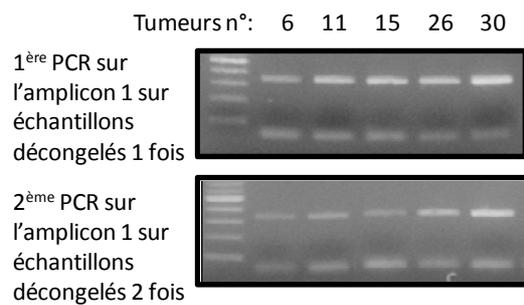


Figure 75 : Effet de la congélation/décongélation des échantillons sur l'efficacité de la PCR

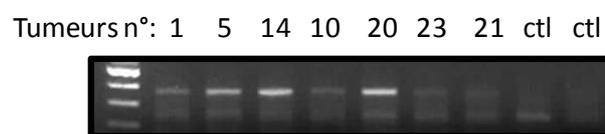


Figure 76 : exemple d'une PCR de l'amplicon 3 ayant une efficacité variable en fonction de la tumeur considérée

qui permet une étude exhaustive du promoteur de *PLAGLI* et permettra de savoir quels CpG dirigent l'expression de *PLAGLI* dans les sarcomes. Aucune analyse exhaustive par pyroséquençage du promoteur de *PLAGLI* n'ayant été faite à ce jour, il a donc fallu mettre au point cette technique, qui de surcroît n'avait jamais été utilisée au laboratoire.

Le pyroséquençage se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, l'ADN des cellules doit être extrait, puis une fraction d'ADN est traitée au bisulfite de sodium, ce qui permet la conversion des cytosines non méthylées en uraciles, seules les cytosines méthylées restent inchangées. Une fois le traitement effectué, l'îlot CpG du promoteur de *PLAGLI* est amplifié par PCR avant d'être séquençé par pyroséquençage.

La taille maximale des produits PCR analysables par pyroséquençage est de 400 pb. Or l'îlot P1 de *PLAGLI* s'étendant sur 931 pb, il a donc fallu réaliser plusieurs PCR et analyser séparément chaque amplicon. Des couples d'amorces ont été choisis grâce au logiciel PyroMark Assay Design 2.0 pour 4 PCR différentes (Figure 74).

Lors de la mise au point de l'analyse de la méthylation par pyroséquençage, nous avons dû optimiser certaines étapes afin d'obtenir des séquences de bonne qualité au pyroséquenceur.

Ainsi, pour le traitement au bisulfite, il est apparu nécessaire de traiter un nombre restreint d'échantillons simultanément afin d'éviter toute dégradation de l'ADN converti : 10 échantillons maximum. En effet, la conversion des C en U engendre l'apparition de mésappariements et de liaisons faibles qui fragilisent l'ADN. De plus, l'ADN converti se conserve à -20°C mais il est nécessaire d'aliquoter l'ADN qui, une fois converti, supporte très mal les cycles congélation-décongélation. L'efficacité des PCR diminue très fortement dès la deuxième décongélation (Figure 75).

Les PCR servant à l'amplification de l'ADN avant l'analyse de la méthylation par pyroséquençage ont également nécessité de nombreuses mises au point. Il s'est avéré nécessaire d'avoir une grande quantité de produit PCR pour avoir une bonne qualité de séquence au pyroséquenceur. Ainsi, il a été indispensable de passer par des doubles PCR (PCR sur les produits d'une première PCR) pour certaines portions de l'îlot de *PLAGLI*. En effet, les PCR ont été mises au point sur de l'ADN extrait de multiples lignées cellulaires

Nom du primer	séquence (5'-3')	température d'hybridation et concentration de MgCl ₂	bases
PLAGL1 A0 PCR FW	TTGTTGGTATAGGAGGTAAGTTAG	54°C; 1,5mM	24
PLAGL1 A0 PCR RV biotinylé	AAACTAAACCACACCCACAC	54°C; 1,5mM	20
PLAGL1 A0 séquençage 1	GGTAAGTTAGTTTGGTTTATTGTA		24
PLAGL1 A0 séquençage 2	GTTTTGTTGTAGATTTTAGGT		21
PLAGL1 A1 PCR FW	TGG TTT GGG TTT ATT TGT GTT AGT	56°C; 1,5mM	24
PLAGL1 A1 PCR RV biotinylé	CCC CAA CCC TAT CTA AAT CAA AAC	56°C; 1,5mM	24
PLAGL1 A1 séquençage 1	GTT TAT TTG TGT TAG TGT TGT A		22
PLAGL1 A1 séquençage 2	GGG TTT TTT TTT GTT A		16
PLAGL1 A1 séquençage 3	GTA GTT ATT TTT TTG GTT GT		20
PLAGL1 A2 PCR FW	GGT TGT TGT GGG TGG TAA AG	58°C; 2mM	20
PLAGL1 A2 PCR RV biotinylé	ACA AAA ACA CAC CCT CCT	58°C; 2mM	18
PLAGL1 A2 séquençage 1	GGT TGT TGT GGG TGG TAA AG		20
PLAGL1 A2 séquençage 2	GGG AGT GTT TTG GTT TTA TTT TT		23
PLAGL1 A2 séquençage 3	GTG TTT ATA GTT TAG TAG		18
PLAGL1 A2 séquençage 4	GTA GGG TAG GTG TTT GGG		18
PLAGL1 A3 PCR FW biotinylé	GGT AGG TGT TTG GGT GTT	58°C; 2,5mM	18
PLAGL1 A3 PCR RV	CCC ATT ATT ACT TAA AAC AAA CTT	58°C; 2,5mM	24
PLAGL1 A3 séquençage 1	TTT CCT TAT TCT ATT TTT TTC CTA		24
PLAGL1 A3 séquençage 2	CCT CAT ACC AAA TAA AC		17
PLAGL1 A3 séquençage 3	AAA CTA CCT AAA TTA C		16
PLAGL1 A3 séquençage 4	AAA CAC ACC CTC CTC		15

Tableau 29 : tableau récapitulatif des amorces de PCR et de séquençage utilisées pour l'analyse de méthylation du promoteur de *PLAGL1* par pyroséquençage

méthylé ou déméthylé *in vitro* vendu par la société Qiagen, en faisant une gamme de température d'hybridation : 6 températures testées et choisies en fonction de la température calculée par le logiciel de design PyroMark Assay 2.0, et une gamme de concentration de MgCl₂ qui est le cofacteur de la Taq polymérase utilisé : gamme de 5 concentrations allant de 1 mM à 3 mM. Les conditions de PCR trouvées ont pu être appliquées sans difficulté sur l'ADN extrait des quatre lignées cellulaires de sarcomes, mais l'efficacité des PCR s'est avérée moins constante pour les tumeurs. En effet, l'ADN extrait de tumeur est de moins bonne qualité que celui des lignées cellulaires. Les PCR des amplicons 0, 1 et 2 avaient une bonne efficacité sur l'ADN tumoral alors que la PCR de l'amplicon 3 présentait une mauvaise efficacité (Figure 76).

Afin de pouvoir amplifier et analyser la méthylation de l'amplicon 3, nous avons tout d'abord amplifié l'ADN tumoral correspondant aux séquences de l'amplicon 2-3 (amorce sens en amont de l'amplicon 2 et amorce anti-sens en aval de l'amplicon 3). Les produits PCR obtenus ont été utilisés comme matrice pour amplifier séparément l'amplicon 2 et l'amplicon 3. Après avoir mis au point les conditions de PCR pour cet amplicon « 2-3 » sur les contrôles Qiagen, nous avons amplifié l'ADN tumoral correspondant à l'amplicon 2-3. La quantité de produit PCR obtenue étant importante, les produits de PCR ont ensuite été amplifiés pour les amplicons 2 et 3 avec succès et reproductibilité.

Le fait d'augmenter la quantité de matrice suffisait à faciliter la PCR de l'amplicon 3 et donc permettait d'obtenir une quantité de produit PCR analysable au pyroséquenceur. Les conditions de PCR optimales sont répertoriées dans le Tableau 29.

Une fois les PCR mises au point et les ADN de lignées et de tumeurs amplifiés, les produits PCR ont été analysés au pyroséquenceur. Toutefois, la taille moyenne de lecture d'une séquence au pyroséquenceur est de 60 à 120 pb. Les produits de PCR obtenus faisant entre 300 et 350 pb, plusieurs amorces de séquençage ont dû être utilisées pour chaque région de l'îlot de *PLAGL1* (entre 2 et 4 par amplicon). Le logiciel PyroMark Assay 2.0 détermine une seule amorce de séquençage quelque soit la taille du fragment PCR à analyser. Les amorces supplémentaires nécessaires au séquençage de tout le produit PCR ont donc été choisies manuellement en prenant soin de se placer entre les CpG et en respectant une longueur minimale de 15 bases.

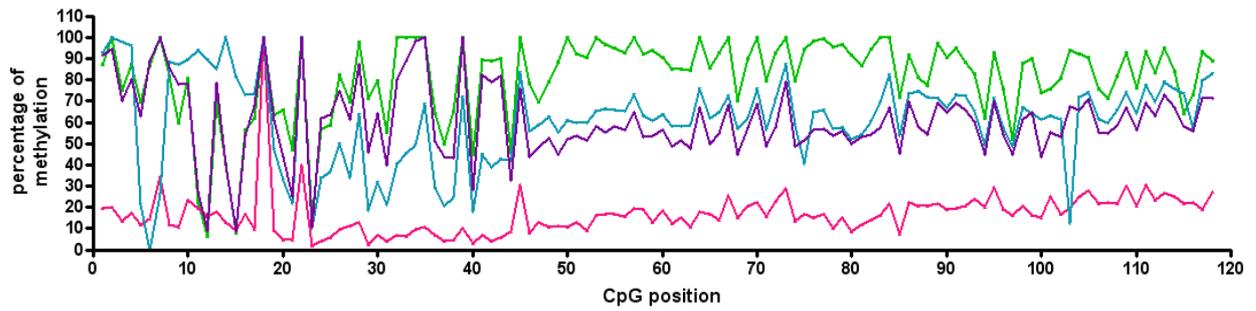


Figure 77 : pourcentage de méthylation des 118CpG du promoteur de *PLAGL1* dans les quatre lignées de sarcome (en vert : MFH148, en rose : MFH128, en violet : LPS80 et en bleu : LPS78)

	Pourcentage de méthylation globale	<i>PLAGL1</i> mRNA expression (Affymetrix)
MFH128	16,7159322	12,63163181
MFH148	81,12525424	2,584962501
LPS78	60,85504274	7,977279923
LPS80	60,75966102	8,321928095

Tableau 30 : comparaison du pourcentage de méthylation globale et de l'expression de *PLAGL1* dans les lignées de sarcome

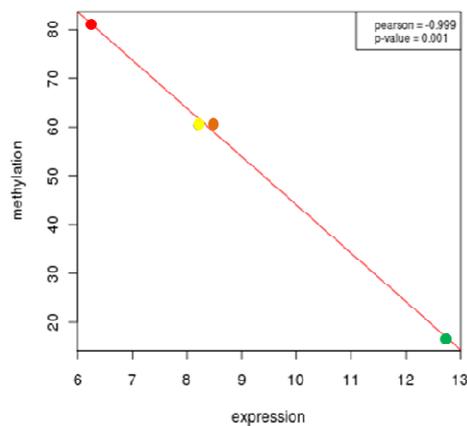


Figure 78 : corrélation entre l'expression de *PLAGL1* et le pourcentage de méthylation calculé sur l'ensemble des CpG du promoteur de *PLAGL1*, dans les lignées MFH148 (rouge), MFH128 (vert), LPS78 (jaune) et LPS80 (orange)

Le premier amplicon noté A0 ou amplicon 0 fait 234 pb et a nécessité l'utilisation de 2 amorces de séquençage, le deuxième amplicon noté A1 fait 342 pb et a nécessité l'utilisation de 3 amorces de séquençage, le troisième amplicon noté A2 fait 304 pb et a nécessité l'utilisation de 4 amorces de séquençage, le quatrième amplicon noté A3 fait 370 pb et a nécessité l'utilisation de 4 amorces de séquençage.

.1.3.2 Etude de la méthylation de PLAGL1 dans les lignées

Après avoir mis au point la technique de pyroséquençage pour l'analyse de la méthylation de l'îlot CpG du promoteur de *PLAGL1*, le profil de méthylation des lignées de sarcomes MFH128, MFH148, LPS78 et LPS80 a été étudié. Les profils de méthylation des quatre lignées sont représentés sur la Figure 77. Cette analyse par pyroséquençage de tous les CpG de l'îlot P1 de *PLAGL1* a permis de constater que le niveau de méthylation varie d'un CpG à l'autre. Le pourcentage de méthylation présente plus de variation d'un CpG à l'autre dans la première partie de l'îlot (jusqu'au CpG n°40) alors que le niveau de méthylation des CpG dans la deuxième partie est plus homogène.

L'analyse par pyroséquençage permet de calculer le pourcentage de méthylation de chaque CpG, mais, on peut également connaître le pourcentage moyen de méthylation de tout l'îlot (en calculant la moyenne du pourcentage de méthylation de chacun des 118 CpG) que l'on a nommé : « méthylation globale ». Le niveau d'expression du transcrit *PLAGL1* a été comparé à la méthylation globale de son promoteur.

La méthylation globale de l'îlot P1 du promoteur de *PLAGL1* corrèle très bien avec l'expression de son ARNm (Figure 78 et le Tableau 30), puisque le coefficient de Pearson obtenu est de -0.999 et la p-value de 0,001.

Bien que le niveau de méthylation ne soit pas identique d'un site de méthylation à l'autre le long du promoteur de *PLAGL1*, le niveau de méthylation de l'îlot entier est corrélé avec le niveau d'expression de l'ARNm de *PLAGL1*, dans les quatre lignées de sarcomes étudiées.

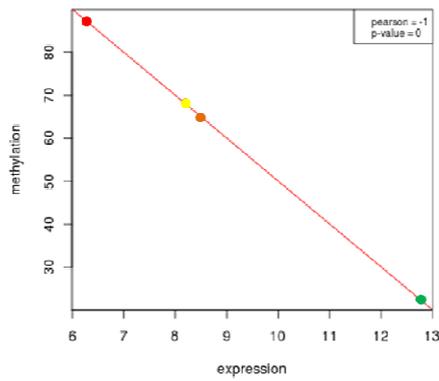


Figure 79 : corrélation entre l'expression de *PLAGL1* et le pourcentage de méthylation calculé sur les CpG significatifs du promoteur de *PLAGL1* (même code couleur que précédemment)

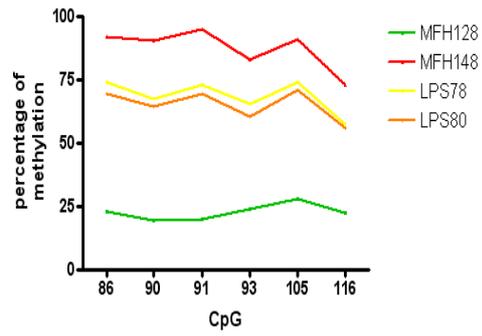


Figure 80 : pourcentage de méthylation des positions les plus corrélées à l'expression de *PLAGL1*

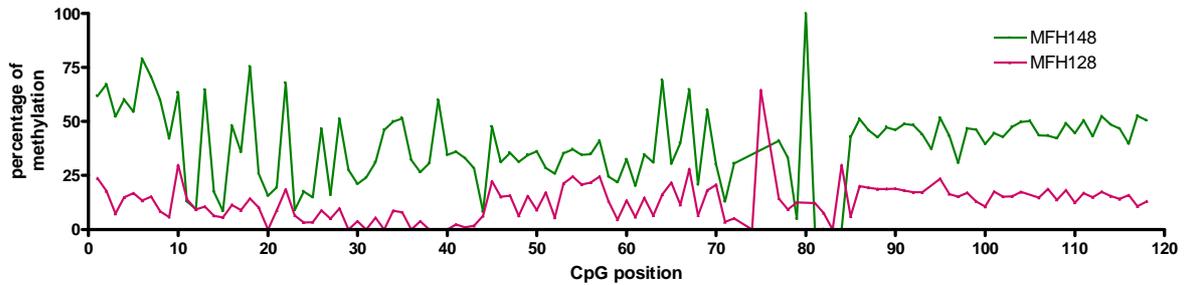


Figure 81 : profil de méthylation des tumeurs MFH148 et MFH128

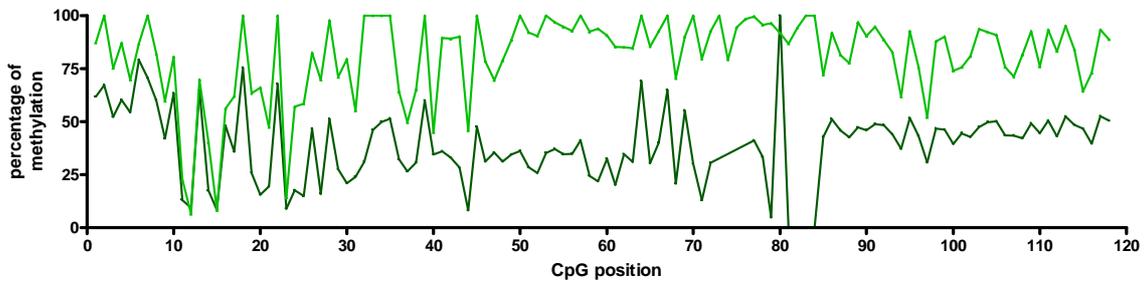


Figure 82 : comparaison entre les profils de méthylation de la tumeur MFH148 (vert foncé) et de la lignée MFH148 (vert clair)

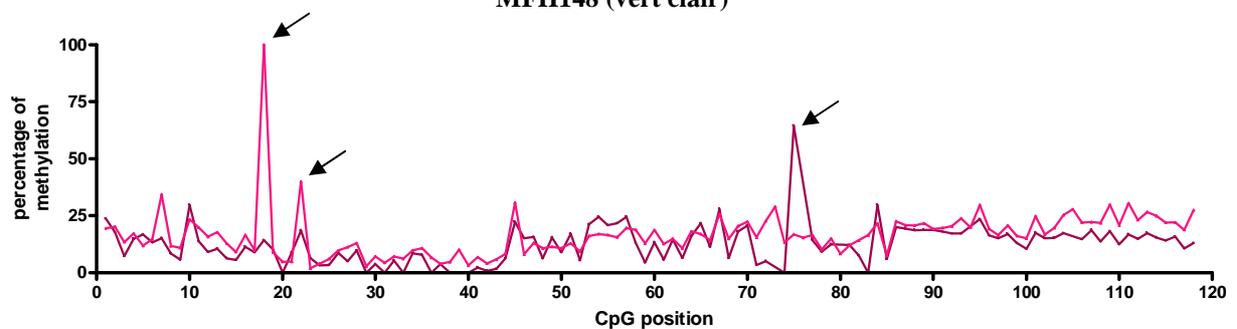


Figure 83 : comparaison entre les profils de méthylation de la tumeur MFH128 (rose foncé) et de la lignée MFH128 (rose clair)

Il est toutefois possible de déterminer des positions privilégiées et corrélées à l'expression de *PLAGL1*. Ainsi les CpG n° 86, 90, 91, 93, 105, 116 ont un coefficient de Pearson égal à -1 et une p-value à 0 (Figure 79 et Figure 80).

Le niveau d'expression transcriptomique de *PLAGL1* dans les lignées de sarcomes s'explique donc exclusivement par le niveau de méthylation de tous les dinucléotides CpG mais surtout par la méthylation des 6 positions nommées ci-dessus.

Les lignées MFH148 et MFH128 ont été établies respectivement à partir d'une tumeur primaire de LMS et de LPS. Nous avons analysé le profil de méthylation des tumeurs dont dérivent ces deux lignées de façon à savoir si les lignées en culture reflétaient bien le profil de méthylation de la tumeur initiale (Figure 81).

Comme on peut le voir sur la Figure 82, les profils de méthylation de la lignée MFH148 et de la tumeur dont elle est issue sont très semblables voire superposables, même s'il y a une différence au niveau du pourcentage de méthylation globale : 39 % pour la tumeur et 81 % pour la lignée.

En revanche, la comparaison entre la tumeur et la lignée MFH128 (Figure 83), montre que le pourcentage de méthylation globale est quasiment identique, bien que certains CpG soient différenciellement méthylés (CpG 18, 22 et 75, indiqués par une flèche noire). De plus, on peut noter que le profil de méthylation de la tumeur MFH128 est très homogène d'un CpG à l'autre comparé à celui de la tumeur MFH148.

Le profil de méthylation est différent d'un type cellulaire à l'autre et peut varier au cours de l'établissement d'une lignée tumorale.

L'étude de la méthylation de la lignée MFH128 est représentative de la méthylation de la tumeur MFH128, la tumeur était donc constituée d'une population cellulaire très homogène du point de vue de la méthylation de *PLAGL1*. Par contre le profil de la lignée MFH148 hyperméthylée suggère que la lignée est issue d'un clone cellulaire minoritaire dans la tumeur initiale.

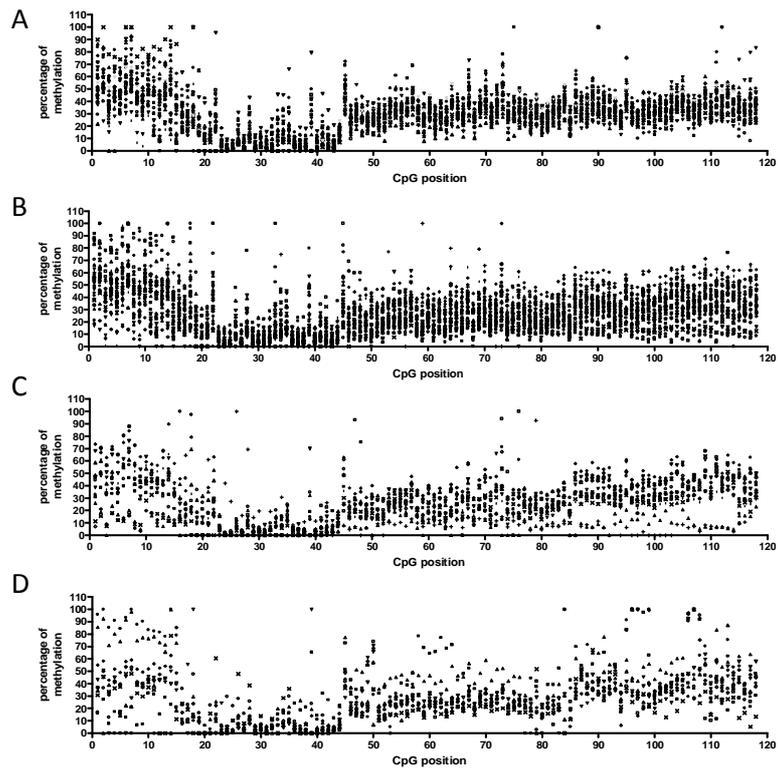


Figure 84 : profils de méthylation obtenus pour toutes les tumeurs par groupe, A : LMS, B : US, C : LPS, D : GIST

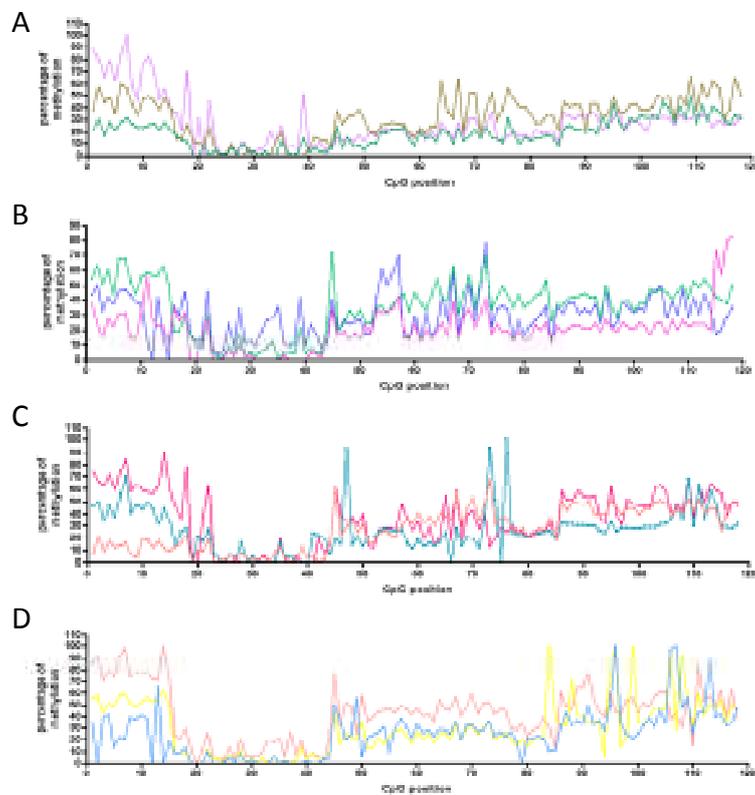


Figure 85 : exemple du profil de méthylation obtenu pour trois tumeurs de chaque groupe, A : LMS, B : US, C : LPS, D : GIST

.1.3.3 Etude de la méthylation de PLAGL1 dans des tumeurs

Nous avons étudié la corrélation entre le statut de méthylation du promoteur de *PLAGL1* et le niveau d'expression de son transcrite dans 95 tumeurs de patients.

L'ADN de ces tumeurs a été converti par du bisulfite de sodium, puis les quatre PCR permettant d'amplifier chaque partie de l'îlot CpG du promoteur de *PLAGL1* séparément ont été effectuées. Enfin les produits PCR ont été analysés par pyroséquençage.

Les profils de méthylation obtenus pour chaque sous-type tumoral (LMS, LPS, US et GIST) sont représentés sur la Figure 84. Nous observons qu'il existe une certaine divergence des profils de méthylation au sein d'un même groupe tumoral, mais également entre les groupes tumoraux. De façon à illustrer cette disparité intra-groupe, trois exemples de profils de méthylation par groupe de tumeurs ont été représentés sur la Figure 85.

- Les profils de méthylation variant au sein d'un même groupe tumoral, nous avons recherché si ces différences pouvaient expliquer l'hétérogénéité d'expression de l'ARNm de *PLAGL1* observés dans les différents sous-types de tumeurs.
- Les profils de méthylation semblent variés d'un type de sarcome à l'autre, nous avons recherché si le niveau de méthylation de certains CpG était différent selon le groupe tumoral, et si les tumeurs étudiées avaient un profil de méthylation particulier qui pouvait les discriminer du tissu sain.

.1.3.4 Profils de méthylation du promoteur de PLAGL1

Pour chaque groupe tumoral, la moyenne de méthylation de chaque CpG a été calculée et le profil de méthylation par groupe a été tracé sur la Figure 86. De façon globale, les profils de méthylation sont assez similaires entre chaque type de tumeurs et présentent une hétérogénéité de méthylation le long de l'îlot : entre les CpG 1 et 15, la méthylation est élevée (autour de 45 %), entre les CpG 15 et 20 il y a une chute de la méthylation qui devient très faible entre les CpG 20 et 45 (entre 0 et 20 %). En revanche, entre les CpG 45 et 118, la méthylation est homogène d'un CpG à l'autre et à une valeur intermédiaire par rapport aux trois premières parties (comprise entre 20 et 30 %).

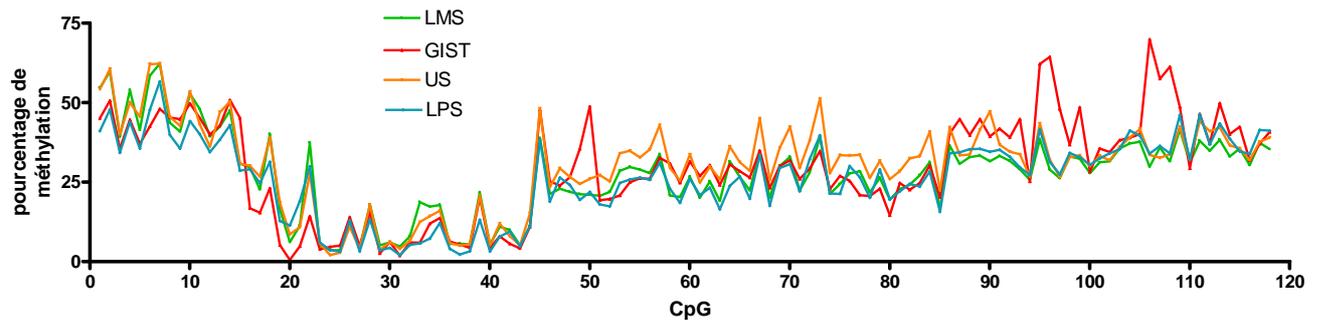


Figure 86 : profils de méthylation des quatre groupes tumoraux de sarcomes

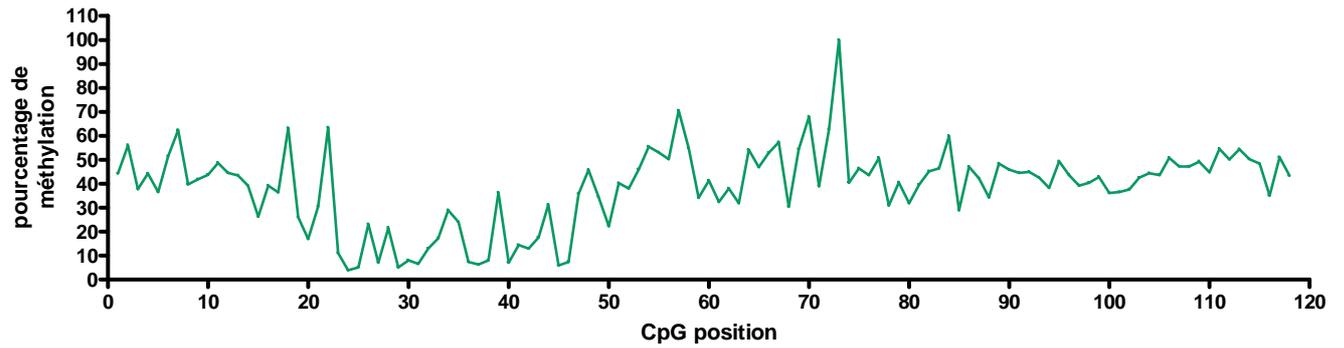


Figure 87 : profil de méthylation des fibroblastes IA482B

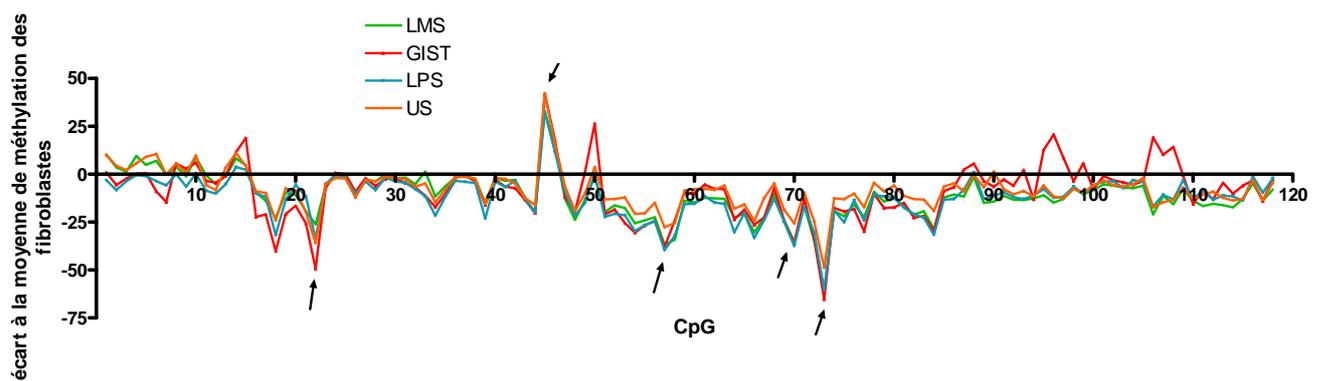


Figure 88 : mise en évidence des CpG différemment méthylés entre les quatre types de sarcomes et les fibroblastes

.1.3.4.1 Comparaison entre le profil de méthylation des sarcomes et celui d'une culture primaire de fibroblastes

De façon à savoir si les profils de méthylation des 4 groupes de sarcomes étaient différents du profil du tissu sain, l'îlot CpG du promoteur de *PLAGL1* d'une culture primaire de fibroblastes a été pyroséquencé : IA482B (profil de méthylation : Figure 87).

En effet, les sarcomes, même s'ils peuvent présenter des lignes de différenciation musculaire lisse ou adipeuse, comme par exemple dans le cas des LMS ou des LPS, ils ne dérivent pas forcément de cellules musculaires lisses ou de cellules adipeuses. Nous avons donc choisi de comparer les profils de méthylation des 4 groupes de sarcomes étudiés à une lignée précoce de fibroblaste (troisième passage après mise en culture à partir de tissu péri-tumoral). Comme attendu les fibroblastes sont globalement hémiméthylés pour *PLAGL1* (38,4 %).

Afin de savoir si les différents groupes de sarcomes étudiés avaient des profils de méthylation distincts du tissu tumoral, les pourcentages de méthylation de chaque CpG des LMS, GIST, US et LPS ont été normalisés par rapport au pourcentage de méthylation des CpG correspondants des fibroblastes. Ceci a permis de montrer que, les quatre groupes de sarcomes ont des profils de méthylation similaires entre eux mais très différents, sur certains des CpG, des fibroblastes en culture (Figure 88).

Il est possible de déterminer des CpG dont le niveau de méthylation est particulièrement éloigné de celui des fibroblastes. Ainsi pour :

- le CpG 22, on peut noter une différence de méthylation allant de 26 à 50 % pour les quatre groupes de sarcomes,
- le CpG 45, on peut noter une différence de méthylation allant de 32 à 42 % pour les quatre groupes de sarcomes,
- le CpG 57, on peut noter une différence de méthylation allant de 27 à 39 % pour les quatre groupes de sarcomes
- le CpG 70, on peut noter une différence de méthylation allant de 25 à 37 % pour les quatre groupes de sarcomes
- le CpG 73, on peut noter une différence de méthylation allant de 49 à 65% pour les quatre groupes de sarcomes.

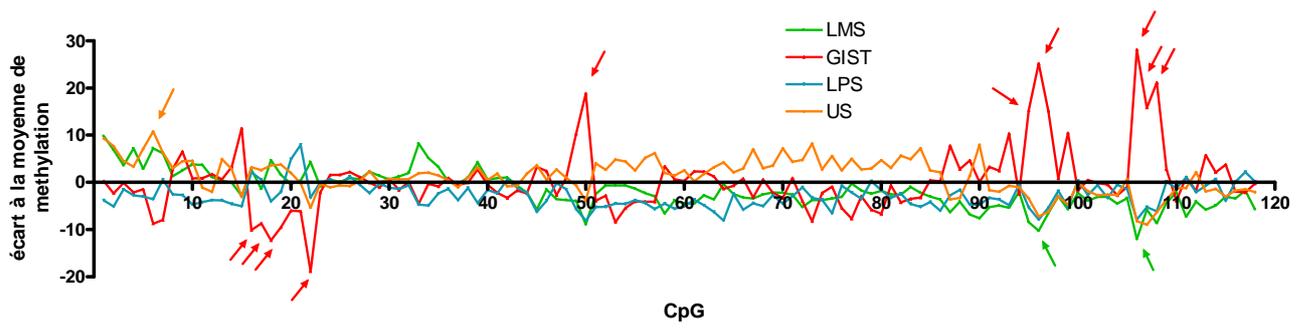


Figure 89 : mise en évidence des CpG spécifiques de chaque type de sarcomes

Cette analyse a permis d'identifier un profil tumoral de méthylation commun aux quatre groupes de sarcomes et qui le distingue du profil normal. Etudier la méthylation de certains sites de méthylation particulièrement discriminant entre le « tissu sain » et le tissu tumoral comme les CpG 22, 45, 57, 70 ou 73 pourrait permettre de déterminer si un tissu est normal ou tumoral, et de ce fait être utilisé comme outil diagnostique.

.1.3.4.2 Comparaison du profil de méthylation des quatres types de sarcomes

Malgré ce profil assez semblable d'un type de sarcome à l'autre, des divergences dans le pourcentage de méthylation de certains CpG sont notables. Pour mettre en avant ces différences, la moyenne de méthylation par CpG sur l'ensemble des sarcomes a été calculée.

Les écarts à la moyenne de chaque CpG (Figure 89) ont été calculés et ont permis de quantifier la différence de méthylation de chaque CpG des quatre groupes par rapport à l'ensemble des tumeurs étudiées.

La majorité des écarts à la moyenne se situe entre -10 % et +10 % ce qui indique que des différences significatives existent entre les différents types tumoraux, mais que ces variations sont faibles. Ainsi, on peut noter que :

- Dans les LMS, les CpG 106 et 96 présentent une variation de +/- 10 %,
- dans les GIST, les CpG 16, 18, 15, 22, 50, 97, 99 présentent une variation de +/- 10 %,
- dans les US, le CpG 6 présente une variation de +/- 10 %,
- les LPS ne montrent pas de variations (par rapport à l'ensemble des sarcomes) de la méthylation supérieure ou égale à 10 %.

Seuls les GIST montrent des différences importantes. En effet, les positions de méthylation n° 96, 106 et 108 présentent des pourcentages de méthylation inférieurs ou supérieurs de 20 % par rapport à l'ensemble des sarcomes étudiés, ce qui tend à montrer que les GIST ont un profil de méthylation spécifique et qu'il est possible de différencier ce type de tumeurs des autres sarcomes aux profils de méthylation plus semblables (Figure 89).

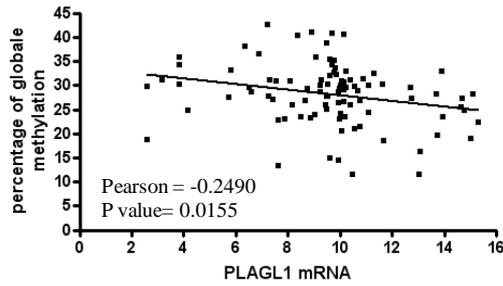


Figure 90 : corrélation entre le pourcentage de méthylation globale et l'expression de *PLAGL1*

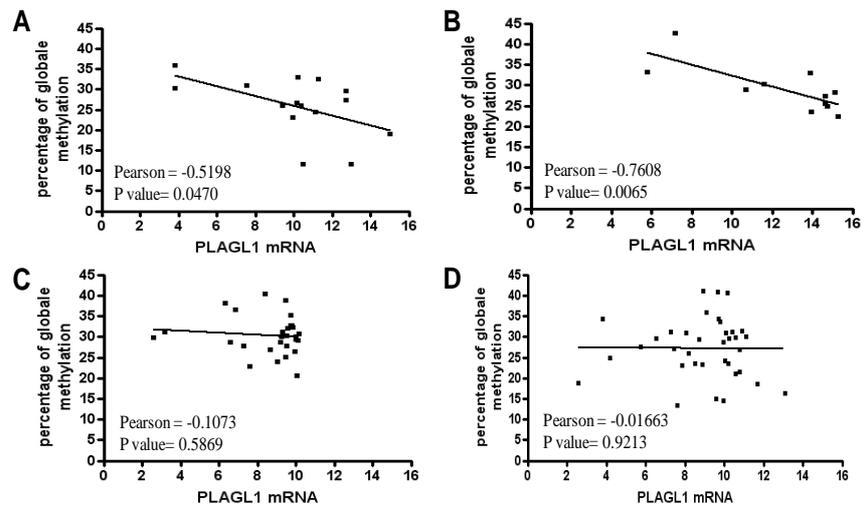


Figure 91 : corrélation entre le pourcentage de méthylation globale et l'expression de l'ARNm de *PLAGL1* dans les LPS (A), les GIST (B), les US (C) et les LMS (D)

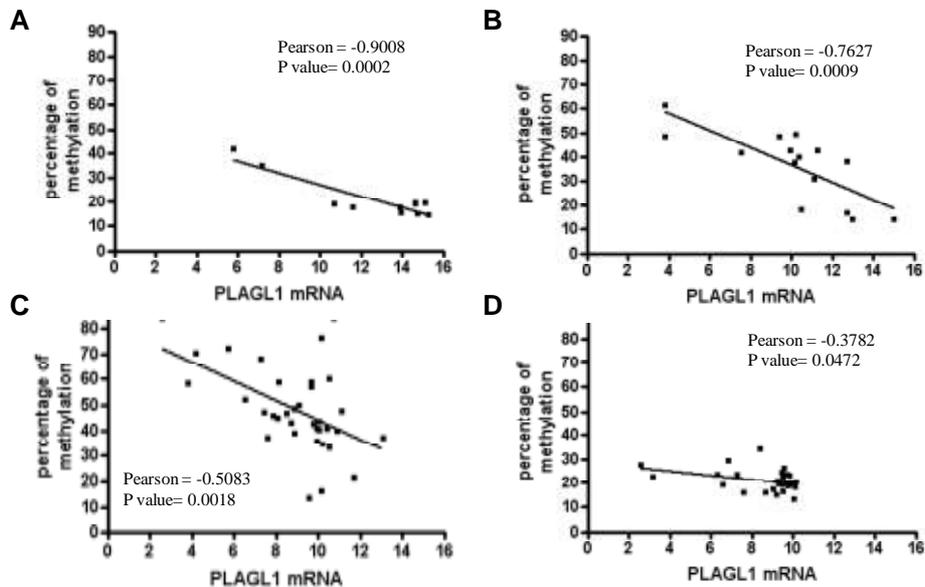


Figure 92 : corrélation entre le pourcentage de méthylation des positions significatives et l'ARNm de *PLAGL1* dans les GIST (A), les LPS (B), les LMS (C) et les US (D)

L'analyse du profil de méthylation du promoteur de *PLAGL1* nous a permis de découvrir :

- **qu'il existait une signature de méthylation du tissu tumoral différente de celle du tissu sain,**
- **que le profil de méthylation variait d'un type tumoral à l'autre et permettait de discriminer les GIST des autres types de sarcomes,**
- **le niveau de méthylation de l'îlot du promoteur de *PLAGL1* pouvait donc être un outil diagnostique.**

*.1.3.5 Méthylation du promoteur de *PLAGL1* et expression de son transcrit*

A la différence des lignées, pour lesquelles la méthylation globale était corrélée à l'expression transcriptomique de *PLAGL1*, la corrélation entre l'expression de *PLAGL1* et la méthylation globale de tous les types de sarcomes (Figure 90), n'est pas aussi convaincante (coefficient de Pearson = - 0,2490 et p-value = 0,0155).

Sachant que les sarcomes sont une catégorie de cancers regroupant des types tumoraux très différents, il apparaît nécessaire d'étudier chaque groupe indépendamment pour ne pas masquer les variations inter-groupes.

Ainsi, nous avons étudié la corrélation entre l'expression de *PLAGL1* et le pourcentage de méthylation globale de son promoteur dans chaque sous-type de sarcome (LMS, US, LPS et GIST).

- Pour les LMS et les US, il n'existe aucune corrélation entre le pourcentage de méthylation globale et l'expression de *PLAGL1*. En effet, ces deux types de sarcomes ont respectivement des coefficients de Pearson de -0,0166 et -0,1073 et des p-value respectives de 0,9213 et 0,5869 (Figure 91).
- A l'inverse, dans les LPS et les GIST, l'expression de *PLAGL1* est corrélée au pourcentage de méthylation globale du promoteur de *PLAGL1* avec, respectivement, des coefficients de Pearson de -0,5198 et -0,7608 et des p-values de 0,0470 et 0,0065 (Figure 91).

GIST	Pearson. Correlation	P.Value
CpG n°64	-0,8730	0,00045
CpG n°65	-0,8440	0,00110
CpG n°66	-0,8430	0,00111
CpG n°58	-0,8420	0,00115
CpG n°37	-0,8410	0,00119
CpG n°86	-0,8350	0,00138
CpG n°59	-0,8340	0,00143
CpG n°62	-0,8170	0,00215
CpG n°42	-0,8130	0,00236
CpG n°63	-0,8100	0,00249
CpG n°68	-0,8100	0,00251
CpG n°67	-0,8090	0,00255
CpG n°56	-0,8080	0,00259
CpG n°60	-0,7970	0,00333
CpG n°44	-0,7960	0,00338
CpG n°38	-0,7950	0,00347
CpG n°55	-0,7880	0,00401
CpG n°61	-0,7800	0,00467
CpG n°43	-0,7760	0,00503
CpG n°33	-0,7690	0,00568
CpG n°52	-0,7510	0,00777
CpG n°91	-0,7460	0,00837
CpG n°82	-0,7330	0,01030
CpG n°57	-0,7300	0,01070
CpG n°47	-0,7200	0,01250
CpG n°41	-0,7180	0,01280
CpG n°81	-0,7120	0,01390
CpG n°31	-0,7020	0,01600
CpG n°105	-0,6930	0,01800
CpG n°20	-0,6850	0,02000
CpG n°36	-0,6710	0,02380
CpG n°51	-0,6700	0,02400
CpG n°75	-0,6610	0,02680
CpG n°78	-0,6540	0,02900
CpG n°53	-0,6480	0,03100
CpG n°116	-0,6390	0,03440
CpG n°39	-0,6210	0,04150
CpG n°48	-0,6170	0,04310

Tableau 31 : CpG corrélés à l'expression de *PLAGL1* dans les GIST

US	Pearson. Correlation	P.Value
CpG n°54	-0,5670	0,00165
CpG n°29	-0,5170	0,00486
CpG n°58	0,4800	0,00978
CpG n°107	-0,4610	0,01340
CpG n°36	-0,4440	0,01800
CpG n°33	-0,4260	0,02390
CpG n°32	-0,4220	0,02520
CpG n°51	0,4080	0,03100
CpG n°105	-0,4030	0,03330
CpG n°109	-0,4020	0,03380
CpG n°45	0,3980	0,03580
CpG n°28	-0,3980	0,03580
CpG n°26	-0,3930	0,03830
CpG n°27	-0,3880	0,04160
CpG n°34	-0,3780	0,04740
CpG n°30	-0,3780	0,04760

LMS	Pearson. Correlation	P.Value
CpG n°1	-0,4760	0,00388
CpG n°7	-0,4700	0,00441
CpG n°4	-0,4550	0,00606
CpG n°6	-0,4130	0,01360
CpG n°33	-0,3590	0,03170
CpG n°5	-0,3610	0,03310

US	Pearson. Correlation	P.Value
CpG n°22	-0,7830	0,00055
CpG n°1	-0,7180	0,00567
CpG n°4	-0,6930	0,00869
CpG n°16	-0,6240	0,01290
CpG n°115	-0,6140	0,01490
CpG n°5	-0,6450	0,01720
CpG n°9	-0,6330	0,02010
CpG n°46	-0,5920	0,02020
CpG n°3	-0,6280	0,02160
CpG n°14	-0,6260	0,02200
CpG n°49	-0,5740	0,02520
CpG n°10	-0,6110	0,02640
CpG n°13	-0,6050	0,02840
CpG n°7	-0,5860	0,03530
CpG n°6	-0,5800	0,03790
CpG n°8	-0,5780	0,03860

Tableau 32 : CpG corrélés à l'expression de *PLAGL1* (respectivement) dans les US, LMS et LPS

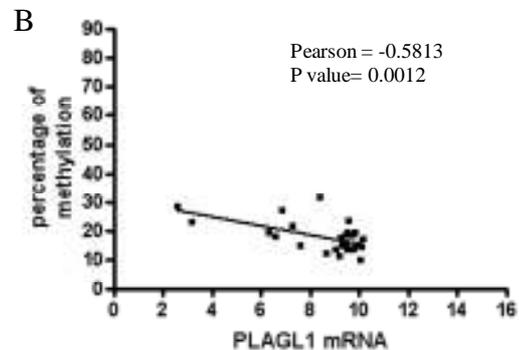
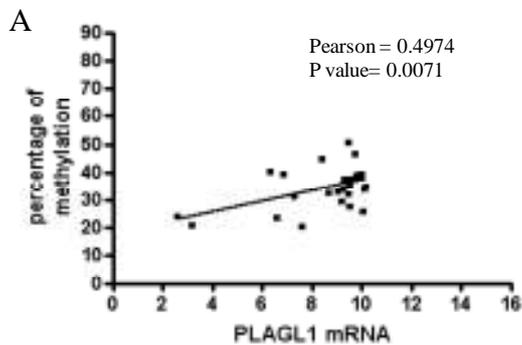


Figure 93 : corrélation positive (A) et négative (B) des CpG avec l'ARNm de *PLAGL1* dans les US

Toutefois, le pourcentage de méthylation étant très variable d'un CpG à l'autre, nous avons donc recherché si certaines positions de méthylation étaient plus fortement corrélées à l'expression de *PLAGLI* et si l'expression de *PLAGLI* pouvait être conditionnée par la méthylation de quelques CpG uniquement. Une analyse statistique a donc été effectuée indépendamment pour chaque sous-groupe de sarcomes. Le coefficient de Pearson et la p-value rendant compte de la corrélation de chaque CpG avec l'expression du transcrit *PLAGLI* ont été calculés.

Ceci a permis de mettre en évidence un nombre de positions significativement corrélées à l'expression de *PLAGLI* et a également permis de montrer, pour la première fois, que les positions significativement corrélées à l'expression étaient spécifiques de chaque type tumoral.

Les p-values ont été considérées comme significatives lorsque elles étaient inférieures ou égales à 5.10^{-2} .

Ainsi,

- pour les GIST, 37 CpG sont significativement et inversement corrélés à l'expression de *PLAGLI*, c'est-à-dire que lorsque le pourcentage de méthylation augmente l'expression de *PLAGLI* diminue. Ce sont les positions : 31, 33, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 75, 78, 81, 82, 86, 91, 105, 116 (Figure 92 ; Tableau 31).
- Pour les LPS, 19 positions sont significativement et inversement corrélées à l'expression de *PLAGLI*. Ce sont les positions : 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 22, 46, 49, 115, 118 (Figure 92 ; Tableau 32).
- Pour les LMS, 6 positions sont significativement et inversement corrélées à l'expression de *PLAGLI*. Ce sont les positions : 1, 4, 5, 6, 7, 33 (Figure 92 ; Tableau 32).
- Pour les US, 16 positions sont significativement corrélées à l'expression de *PLAGLI*. Ce sont les positions : 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 36, 45, 51, 54, 58, 105, 107, 109 (Figure 92 ; Tableau 32).

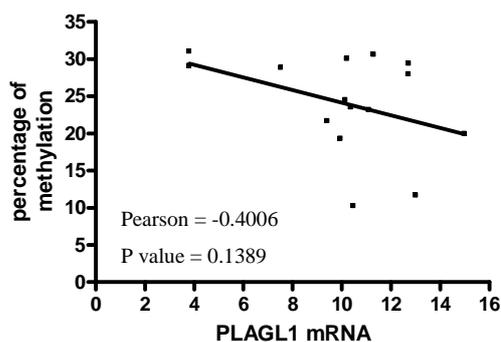


Figure 94 : corrélation entre l'expression de *PLAGL1* et la moyenne de méthylation des CpG non significatifs dans les LPS

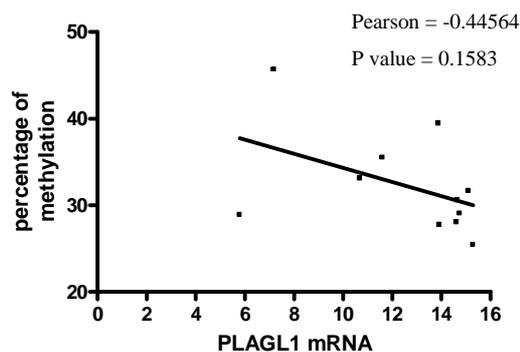


Figure 95 : corrélation entre l'expression de *PLAGL1* et la moyenne de méthylation des CpG non significatifs dans les GIST

CpG	type de sarcome	facteurs de transcription
1	LMS LPS	PPARγ RxRα
2	LPS	
3	LPS	FOXP3(G)
4	LMS LPS	ENKTF-1 PAX5 P53 E2F1 E2F
5	LMS LPS	ENKTF-1 E2F1
6	LMS LPS	
7	LMS LPS	E2F1
8	LPS	
9	LPS	RxRα (G)
10	LPS	ENKTF-1 GCF GRα (C)-
13	LPS	T3R-β1
14	LPS	P53 E2F1 RxRα (C) C-JUN
15	LPS	PAX5 (C) P53 (G) E2F1 GRα (C)-
16	LPS	TFII-H
22	LPS	
26	US	ENKTF-1 E2F1 WT-1 EBF
27	US	PAX5 P53 RxRγ PPARγ GCF
28	US	ETF GRα
29	US	E2F1 ETF GCF
30	US	E2F1 GCF
31	GIST	E2F1 GCF
32	US	GCF TFII-H STAT4 c-Ets-1 (G)
33	LMS US GIST	TFII-H (C) STAT4 (C) c-Ets-1
34	US	PAX5 P53 GCF
36	US GIST	GRα (C) AP2α2(C)ETF (C)GCF
37	GIST	GCF
38	GIST	E2F1 GCF
39	GIST	GCF GRα
41	GIST	ENKTF-1 (C) E2F1
42	GIST	E2F1 SP1
43	GIST	PAX5 E2F1 P53 SP1 SRY
44	GIST	
45	US	PAX5 (C) P53 (G)

CpG	type de sarcome	facteurs de transcription
46	LPS	
47	GIST	PAX5 P53
48	GIST	SP1 (C)
49	LPS	PPARγ RxRγ (G)
51	US GIST	PAX5 (G) P53 (G) SP1 TFII-H (C)
52	GIST	PAX5 P53 E2F1 RxRα (G) SP1
53	GIST	TFII-H
54	US	TFII-H
55	GIST	TFII-H
56	GIST	TFII-H
57	GIST	
58	US GIST	GCF
59	GIST	E2F1 GCF
60	GIST	ENKTF-1 E2F NF1ETF
61	GIST	ENKTF-1 E2F NF1ETF GCF
62	GIST	ENKTF-1 (C) E2F1 E2F (C) ETF GTF
63	GIST	PAX5 P53 E2F1 REL-A NFKB STAT 4 (G) ETF (C) GCF (C)
64	GIST	REL-A Elk-1 (C) NFKB (C) NFKB1 (C) C-ETS (C)
65	GIST	RxRα C-JUN (G)
66	GIST	C-JUN XBP1
67	GIST	ENKTF-1 E2F1 XBP1 (C)
68	GIST	ENKTF-1 E2F1 GRα (G)
75	GIST	PAX5 P53 E2F1
78	GIST	E2F1
81	GIST	PAX5 P53 E2F1 SP1
82	GIST	PAX5 (C) P53 (C) E2F1
86	GIST	GCF GRα
91	GIST	E2F1
105	US	E2F1 RxRα RARβ FOXP3 C/EBPβ (G) T3Rβ1
107	US	E2F1 (C)
109	US	RxRα
115	LPS	RxRα (C) GRβ
116	GIST	ENKTF-1
118	LPS	PAX5 (G) P53 (G) E2F (C) ENKTF-1 FOXP3 (C)

Tableau 33 : facteurs de transcription susceptibles de se fixer aux CpG significativement corrélés à l'expression de *PLAGL1*

Il apparaît que, dans les US, 3 des 16 CpG ont un coefficient de corrélation de Pearson positif signifiant que le pourcentage de méthylation et l'expression de *PLAGLI* augmente dans le même sens, les 13 autres positions présentent une corrélation inverse (Figure 93).

Comme nous l'avons vu plus haut, pour les liposarcomes et les GIST, le pourcentage de méthylation globale est corrélé à l'expression de *PLAGLI*. Ces deux types de sarcomes ont respectivement 19 et 37 positions significativement corrélées à l'expression de *PLAGLI*. Il est possible que le grand nombre de CpG corrélé à l'expression, rende la corrélation expression-méthylation globale significative.

En effet, bien que la corrélation entre la méthylation globale et l'expression de *PLAGLI* soit significative (Figure 91), toutes les positions de méthylation ne sont pas corrélées à l'expression de *PLAGLI*. Nous avons donc calculé la moyenne de méthylation de tous les CpG, hormis les CpG significativement corrélés à l'expression (moyenne de 99 CpG pour les LPS et 81 CpG pour les GIST). Ce pourcentage de méthylation des CpG non significatifs ne corrèle pas avec l'expression de *PLAGLI* (figure 94 et figure 95).

Nous avons pu mettre en évidence des CpG ayant des niveaux de méthylation significativement corrélés à l'expression de l'ARNm de *PLAGLI*. Ces CpG sont différents d'un type de sarcome à l'autre.

Une fois les sites de méthylation dirigeant l'expression de *PLAGLI* identifiés, une analyse bioinformatique a été réalisée pour connaître les facteurs de transcription pouvant théoriquement se fixer aux CpG corrélés à l'expression et donc susceptibles de conditionner l'expression de l'ARNm de *PLAGLI*. Le site internet ALGEN-PROMO <http://alggen.lsi.upc.es/> utilisant la base de données des facteurs de transcription TRANSFAC version 8.3 <http://www.biobase-international.com/> a été utilisé. Les résultats sont reportés dans le Tableau 33. On peut noter que le facteur de transcription RxR α (Retinoid X receptor alpha) est surtout retrouvé associé aux CpG corrélés à l'expression dans les LPS, le facteur GCF (Guanylate cyclase 2F) dans les GIST et les US. Globalement certains facteurs de transcription comme P53 ou E2F1 sont retrouvés dans plusieurs types de sarcomes et sont connus pour être associés, soit à l'expression de *PLAGLI* (pour P53), soit à la progression tumorale (E2F1).

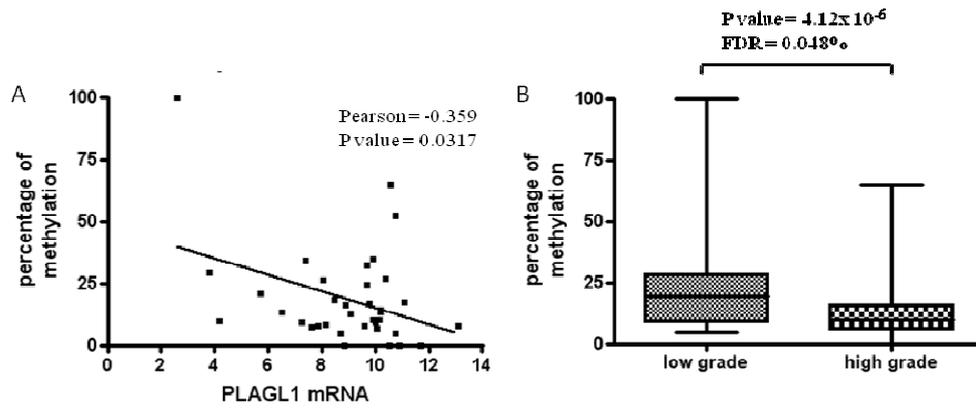


Figure 96 : CpG corrélés à la fois à l'expression de *PLAGL1* et à un ou plusieurs facteurs cliniques dans les LMS. CpG 33 corrélé à l'expression (A) et au grade (B) ;

.1.3.6 Méthylation du promoteur de *PLAGL1* et facteurs cliniques

Une analyse statistique univariée a été réalisée dans chacun des groupes de sarcomes, pour déterminer si certains CpG étaient corrélés à des facteurs cliniques pronostiques de la rechute ou de l'agressivité tumorale. En effet, les LMS, US, GIST et LPS sont très variables d'un point de vue histologique et clinique. Nous avons vu auparavant que les CpG régissant l'expression de *PLAGL1* étaient différents d'un sous-type de sarcome à l'autre. Ceci tend à montrer que les mécanismes régulant la méthylation de l'ADN sont différents selon le type de sarcome considéré. Faire une étude globale de l'ensemble des sarcomes pourrait mettre en évidence des vérités statistiques mais n'auraient pas de réalité biologique.

.1.3.6.1 Corrélations entre méthylation des CpG / expression de *PLAGL1* et facteurs cliniques

Cette étude a permis de mettre en évidence trois positions corrélées à l'expression de *PLAGL1* et à un facteur clinique. Afin de valider les résultats obtenus, nous avons constitué, dans un 2^{ème} temps, une cohorte de validation.

- Dans les LMS, le CpG 33, qui est corrélé à l'expression de *PLAGL1* (coefficient de Pearson = -0,359 et p value = 0,0317), est également corrélé au grade (p-value = $4,12 \times 10^{-6}$, FDR = 0,048%) (Figure 96). La cohorte de validation, constituée de 18 tumeurs a permis de valider ce résultat avec une p-value du CpG 33 associé au grade de : 0,022.

Ainsi dans les tumeurs de haut grade, le pourcentage de méthylation du CpG 33 est faible, et cette position étant corrélée à l'expression, l'expression de *PLAGL1* est importante. Alors que dans les tumeurs de bas grade, le pourcentage de méthylation du CpG 33 est important et l'expression de *PLAGL1* faible. **La méthylation et l'expression de *PLAGL1* seraient des facteurs de mauvais pronostic dans ce type de tumeur.**

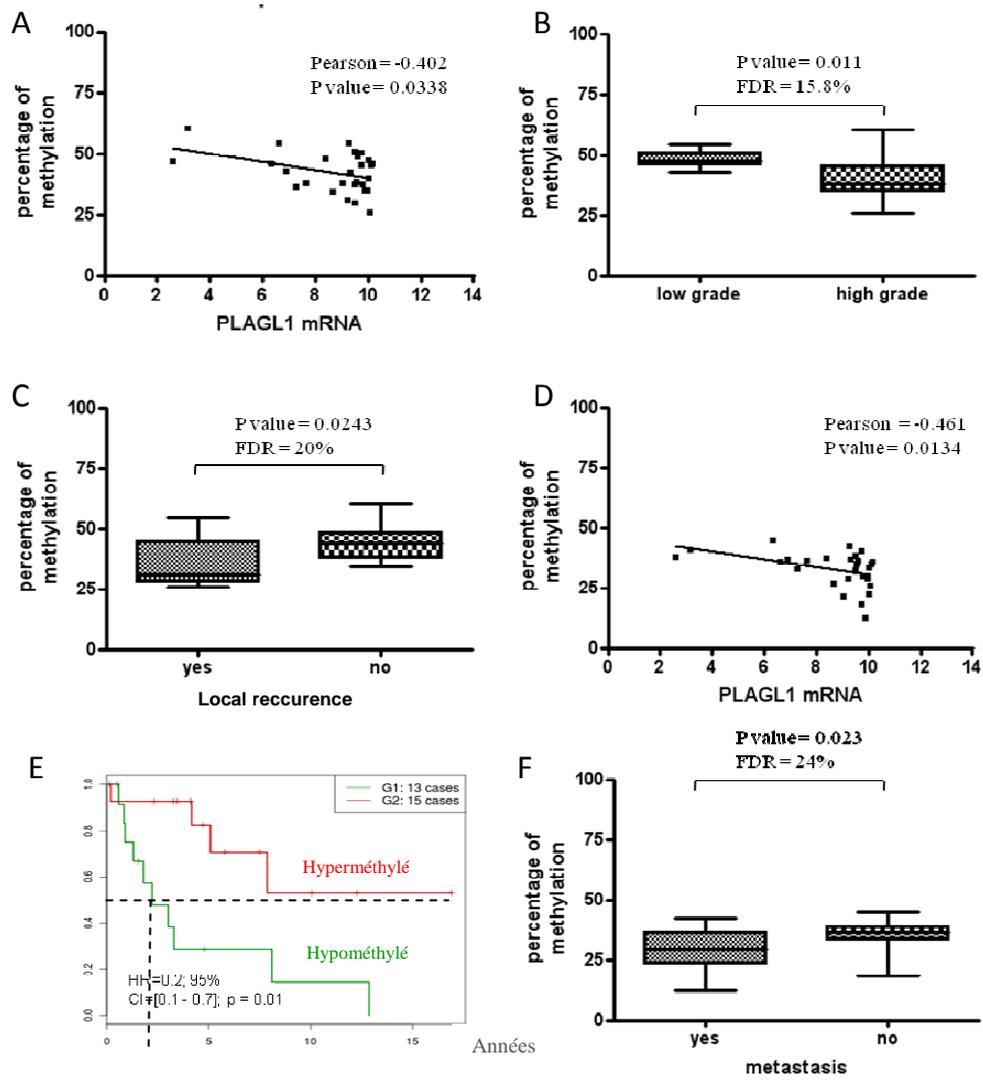


Figure 97 : CpG corrélés à la fois à l'expression de *PLAGL1* et à un ou plusieurs facteurs cliniques dans les US. CpG 109 corrélé à l'expression (A), au grade (B) et à la récurrence locale (C), CpG 107 corrélé à l'expression (D), à survie globale (E) et à la métastase (F)

Dans les US, deux CpG sont associés à la fois à l'expression de *PLAGLI* et à un facteur clinique.

- Le CpG 107 est corrélé à l'expression de *PLAGLI* (coefficient de Pearson = - 0,461 et p value = 0,0134) mais également à la survie globale (p-value= 0,01, Hazard ratio= 0,2) et à la survenue de métastases (p-value= 0,023, FDR= 24,7%). La médiane de survie globale des patients ayant un sarcome indifférencié, avec une hypométhylation de *PLAGLI*, est de 2 ans alors qu'elle est de plus de 15 ans pour les patients ayant un sarcome indifférencié avec une hyperméthylation de *PLAGLI*. La cohorte de validation constituée de 25 tumeurs, a permis de confirmer le résultat obtenu pour la métastase (p-value =0,047), mais pas pour la survie (p-value = 0,3, non significative en raison de la taille de l'échantillon analysé),
- Le CpG 109 est corrélé à l'expression de *PLAGLI* (coefficient de Pearson = -0.402 et p-value = 0.0338) mais également au grade (p-value = 0,011, FDR = 15,8%) et à la récurrence locale (p-value = 0,0243, FDR = 20%). Ces résultats n'ont pas pu être confirmés dans la cohorte de validation : la position 109 n'est pas corrélée au grade (p-value = 0,19 non significative due à la mauvaise balance de l'échantillon : 25 grade 3 contre 4 grade 1 et 2), ni à la récurrence locale (p-value = 0,52 non significatif en raison de la mauvaise balance de l'échantillon : 22 tumeurs ne présentent pas de récurrence locale contre seulement 7 qui récidive localement). Ainsi, les tumeurs de bas grade présentent une méthylation importante du promoteur de *PLAGLI* et une expression faible de *PLAGLI* alors que les tumeurs de haut grade ont une faible méthylation du promoteur de *PLAGLI* et une expression faible. Les tumeurs ne récidivant pas ont une méthylation du promoteur de *PLAGLI* plus élevée que les tumeurs récidivant. **La méthylation et l'expression de *PLAGLI* seraient donc des facteurs de mauvais pronostic dans les sarcomes indifférenciés. Mais ces observations nécessiteraient d'être confirmées dans une cohorte de tumeurs plus importante et mieux balancée.**
- Dans les GIST et les LPS, aucun CpG corrélé à l'expression de *PLAGLI* n'est corrélé à un facteur clinique.

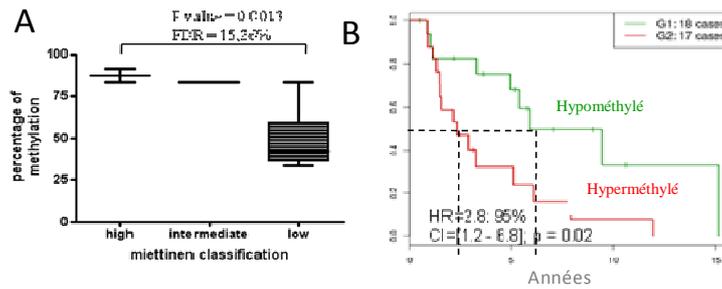


Figure 98 : A : pourcentage de méthylation du CpG 95 en fonction de la classification de Miettinen dans les GIST ; B : survie globale en fonction du niveau de méthylation du CpG 19 dans les LMS

CpG	Metastasis		Locale Recurrence		Grade		globale survival	
	p-value	FDR	p-value	FDR	p-value	FDR	p-value	FDR
8	0,0234	24,72%	0,0429	20,15%				
17							0,0133	26,13%
46	0,0154	24,72%						
49	0,0395	27,65%						
53			0,0377	20,15%				
56			0,0407	20,15%				
59			0,0317	20,09%				
61	0,0456	27,65%	0,0436	20,15%				
62			0,0484	21,13%				
66			0,0329	20,09%				
74			0,0444	20,15%				
76			0,0335	20,09%				
77			0,0169	20,09%				
78	0,0151	24,72%						
80	0,0202	24,72%						
81	0,0372	27,65%	0,0406	20,15%				
83			0,0223	20,09%				
84			0,0335	20,09%				
86			0,0169	20,09%				
87	0,0249	24,72%			0,0009	5,49%		
88					0,0004	4,19%		
89			0,0025	20,09%				
91	0,0200	24,72%	0,0200	20,09%	0,0045	10,64%		
92	0,0269	24,72%			0,0365	30,74%		
93			0,0298	20,09%				
94			0,0332	20,09%				
96	0,0068	24,72%	0,0238	20,09%				
97	0,0489	27,65%			0,0308	28,97%		
98					0,0120	15,78%		
99					0,0100	15,78%		
100			0,0163	20,09%				
101					0,0036	10,64%		
102			0,0183	20,09%	0,0319	28,97%		
103					0,0044	10,64%		
104					0,0251	26,97%		
106	0,0348	27,65%	0,0100	20,09%			0,0083	26,13%
107	0,0230	24,72%					0,0025	26,13%
108	0,0180	24,72%	0,0152	20,09%				
109			0,0243	20,09%	0,0110	15,78%		
110	0,0061	24,72%					0,0067	26,13%
111			0,0340	20,09%				
113	0,0272	24,72%	0,0099	20,09%	0,0234	26,97%	0,0101	26,13%
114	0,0093	24,72%	0,0061	20,09%			0,0117	26,13%

Tableau 34 : récapitulatif des CpG corrélés à un ou plusieurs facteurs cliniques dans les US

.1.3.6.2 Autres sites de méthylation corrélés aux facteurs cliniques

Outre les CpG associés à la fois à l'expression et à un facteur clinique, nous avons pu mettre en évidence un certain nombre de CpG dont la méthylation n'était pas liée à l'expression de *PLAGL1* mais était liée à un ou plusieurs facteurs cliniques.

Par exemple, le niveau de méthylation du CpG 95 dans les GIST est associé à la classification de Miettinen avec une p-value à 0,0013 et un FDR de 15,3 %. Les tumeurs classées comme « à bas risque » sont significativement moins méthylées pour le promoteur de *PLAGL1* que les tumeurs de « risque intermédiaire » ou « à haut risque ». **L'hyperméthylation de *PLAGL1* sur le CpG 95 est un facteur de mauvais pronostic dans les GIST.** Le CpG 19 dans les LMS est lié à la survie globale avec une p-value de 0,002 et un FDR de 27,9 % (Figure 98).

L'hyperméthylation en 19 est un facteur de mauvais pronostic.

Mais c'est dans les sarcomes indifférenciés que le plus grand nombre de CpG a pu être corrélé à des facteurs cliniques.

Ainsi,

- 18 CpG sont associés à la survenue de métastases : les CpG 8, 46, 49, 61, 78, 80, 81, 87, 91, 92, 96, 97, 106, 107, 108, 110, 113 et 114.
- 13 CpG sont associés au grade, ce sont les CpG : 87, 88, 91, 92, 97, 98, 99, 101, 102, 103, 104, 109 et 113.
- 6 CpG sont associés à la survie globale : 17, 106, 107, 110, 113 et 114.
- 27 CpG sont associés à la récurrence locale : 8, 53, 56, 59, 61, 62, 66, 74, 76, 77, 81, 83, 84, 86, 89, 91, 93, 94, 96, 100, 102, 106, 108, 109, 111, 113 et 114.

Ces sites de méthylation associés à des facteurs cliniques, ainsi que les p-values et FDR associées, sont répertoriés dans le Tableau 34.

CpG	facteurs de transcription
8	
17	RxR α (C) E2F1
19	E2F1 AP α 2 GR α
46	
49	PPAR γ RxR γ (G)
53	TFII-I
56	TFII-I
59	E2F1 GCF
61	ENKTF-1 E2F NF1ETF GCF
62	ENKTF-1 (C) E2F1 E2F (C) ETF GTF
66	C-JUN XBP1
74	PAX5 (G) P53 (G) RxR α
76	E2F1 EBF GR α (G)
77	E2F1 (G)
78	E2F1
80	PAX5 (G) P53 (G) E2F1 SP1ETF
81	PAX5 P53 E2F1 SP1
83	ENKTF-1 XBP1 (G)
84	E2F1 GCF C/EBP α (C)
86	GCF GR α
87	GCF TFII-I
88	GCF
89	E2F1 (G) RxR α RAR β
91	E2F1
92	E2F1 (C) GR α
93	E2F1 GCF SRY LEF1 TCF4E (C)
94	E2F1 GCF SRY (C)
95	E2F1 GCF AP2 α 2 (G)
96	GR α (C) AP2 α 2(C) HIF1
97	E2F1 RxR α (G) HIF1
98	PAX5 (G) P53 (G) RxR α E2F1 (C)
99	PAX5 (C) P53 (C) E2F1
101	PAX5 P53 E2F1 (C) WT-1 RxR α (G)
102	E2F1 RxR α
103	E2F1
104	C-JUN
106	E2F1
107	E2F1 (C)
108	E2F1
109	RxR α
110	ENKTF-1 E2F1 EBF
111	E2F1 ENKTF-1
113	GATA3 (G)
114	GATA3 AP2 α A

Tableau 35 : récapitulatif des facteurs de transcription pouvant potentiellement se fixer aux CpG corrélés à un ou plusieurs facteurs cliniques

Une fois les sites de méthylation significativement corrélés aux facteurs cliniques identifiés, une analyse « bioinformatique » a été réalisée pour connaître les facteurs de transcription pouvant théoriquement se fixer aux CpG corrélés aux facteurs cliniques et donc susceptibles de conditionner la survenue de métastases ou la survie, par exemple. Nous avons utilisé le site internet ALGEN-PROMO, comme pour identifier les facteurs de transcription pouvant se fixer aux CpG corrélés à l'expression de *PLAGL1*. Les résultats sont reportés dans le Tableau 35.

Globalement, on peut voir que les facteurs de transcription les plus souvent retrouvés associés à la métastase sont : E2F1, PAX5, P53, GCF et GR α . Les protéines associées à la récurrence locale sont : E2F1, GCF, GR α , RxR α et TFII-I ; celles liées au grade sont : E2F1, PAX5, GCF et RxR α ; celles associées à la survie sont : E2F1 et ENKTF-1.

L'analyse de la méthylation du promoteur de *PLAGL1* par pyroséquençage a permis de mettre en évidence des CpG corrélés à la fois à l'expression de *PLAGL1* et à des facteurs cliniques et des CpG uniquement corrélés à des facteurs cliniques, pouvant avoir une valeur pronostique.

.1.4 Conclusions générales

Ce travail a permis de montrer de façon originale :

- **L'apport du pyroséquençage pour l'étude exhaustive de la méthylation de l'ADN de promoteur ayant un grand nombre de CpG,**
- **Les conditions indispensables à l'analyse d'îlot CpG de grande taille,**
- **L'intérêt d'une étude exhaustive de l'ensemble des sites de méthylation d'un îlot CpG,**
- **Que le niveau de méthylation de l'ensemble des CpG de l'îlot P1 de *PLAGL1* était corrélé à l'expression de son transcrite dans les lignées de sarcomes étudiées contrairement aux tumeurs de sarcomes sélectionnées,**
- **Qu'il existait une signature de méthylation des tumeurs, différente de celle du tissu sain,**
- **Qu'il existait une signature de méthylation propre à chaque type de sarcome,**

- Que quelques CpG de l'îlot P1 du promoteur de *PLAGLI* étaient reliés à l'expression de *PLAGLI* et que ces CpG étaient spécifiques de chaque type de sarcome,
- Que trois CpG de l'îlot P1 du promoteur de *PLAGLI* étaient corrélés à l'expression de *PLAGLI* et à des facteurs cliniques (un dans les LMS et deux dans les US),
- Que de nombreux CpG pouvaient être reliés à des facteurs cliniques, sans l'être à l'expression,
- Que la méthylation et / ou l'expression de *PLAGLI* pouvaient constituer un facteur de bon ou de mauvais pronostic, selon le sarcome considéré.

.2 Discussion de la partie : régulation transcriptionnelle

.2.1 Etat des connaissances sur *PLAGL1*

En 1997, Spengler *et al.*, utilise un test de clonage par expression chez la souris, mis au point précédemment (Spengler et al., 1993) pour identifier de nouveaux récepteurs couplés à l'adénylate cyclase. Ce test permet d'identifier un nouveau gène de 667 acides aminés que l'équipe nomme : *Zac1*, pour **Zinc finger gene involved in Apoptosis and Cell cycle arrest 1**. Ce gène est essentiellement exprimé dans le cerveau, à un niveau très faible dans le cortex, le bulbe olfactif, l'hypothalamus, l'hippocampe... mais très fortement dans l'hypophyse antérieure. Des expériences de clonogénicité et de prolifération ont montré que *Zac* était impliqué dans **l'arrêt du cycle cellulaire** en G0/G1 et dans **l'apoptose**, tout comme *TP53*, qui était jusqu'alors le seul gène connu à réunir ces deux activités. De plus *Zac* inhibe la formation de tumeur chez la souris xénotransgénée (Spengler et al., 1997).

En 1998, la même équipe met en évidence l'homologue humain de *Zac* qu'il nomme *hZac* mais qui sera plus tard renommé *PLAGL1* (**PL**eiomorphic **A**denoma **G**ene **L**ike **1**) en raison de son homologie avec les gènes de la famille *PLAG* (*PLAG1* et *PLAGL2*) (Kas et al., 1998). Varrault *et al.*, montrent dans cette étude que le locus du gène *PLAGL1* ou *hZac* est situé en **6q24-q25**, une **région fréquemment délétée** dans de nombreuses tumeurs solides comme dans le cancer du sein, de l'ovaire, les astrocytomes ou les carcinomes rénaux (Varrault et al., 1998).

En 1997 l'équipe d'Abdollahi « découvre » un gène codant pour une protéine à doigts de zinc qu'elle nomme *LOT1* pour « **lost on transformation 1** » situé en 6q24-25 et dont l'expression est perdue dans les cellules cancéreuses (Abdollahi et al., 1997). Ces deux équipes ont mis en évidence le même gène : *PLAGL1*. **La localisation de ce gène, son rôle dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire ont permis de qualifier *PLAGL1* de gène suppresseur de tumeur.**

C'est en 2000, que Mamoru Kamiya met en évidence la régulation de l'expression de *PLAGL1* par méthylation de son promoteur (Kamiya et al., 2000). La même année, Graziella Piras découvre que *Zac1*, la forme murine de *PLAGL1*, est un **gène d'empreinte** et que seul l'allèle paternel s'exprime dans des fibroblastes embryonnaires murins (Piras et al., 2000). Depuis, de multiples études ont mis en évidence l'implication de modifications de l'empreinte

parentale de *PLAGL1* au cours de l'oncogénèse, conduisant à sa perte d'expression. Cette perte d'expression était due soit à une méthylation des deux allèles du gène, soit à une perte d'hétérozygotie (perte de l'allèle paternel) (Kamikihara et al., 2005), (Lemeta et al., 2007), (Bilanges et al., 1999), (Leal et al., 2007).

Les études sur *PLAGL1/Zac/Lot1* ont souvent été transcriptomiques et montrent une perte d'expression du transcrit dans de nombreux cancers. De façon générale, les quantifications de l'ARNm de *PLAGL1* ont porté sur de petits nombres de lignées cellulaires ou de tumeurs de patients. Ainsi l'article publié en 2005 par Basyuk *et al.*, comparent le niveau d'expression du transcrit *PLAGL1* dans des tissus épidermiques normaux, 18 cas de carcinomes basocellulaires et 8 cas de carcinomes spinocellulaires (Eugenia et al., 2005). En 1999, Bilanges *et al.*, quantifient par Northern blot le niveau d'expression de l'ARNm de *PLAGL1* dans une vingtaine de cas de cancers du sein et montrent une expression variable mais globalement faible de *PLAGL1* (Bilanges et al., 1999). De la même façon en 2005, Kamikihara *et al.*, mettent en évidence une perte d'expression de *PLAGL1* dans une dizaine de tumeurs ovariennes (Kamikihara et al., 2005). Les études portant sur l'expression de *PLAGL1* dans des tumeurs cérébrales portent également sur un petit nombre de tumeurs et quelques lignées cellulaires (Hide et al., 2009), (Lemeta et al., 2007).

Aucun article publié à ce jour sur *PLAGL1* ne montre de relation entre le niveau d'expression de l'ARNm de *PLAGL1* et certains facteurs cliniques.

L'implication de *PLAGL1*, sa signalisation et son expression ont essentiellement été étudiées dans des cancers d'origine épithéliale ou hématopoïétique. **L'objectif de notre travail a consisté à étudier le niveau d'expression de *PLAGL1* dans la troisième classe de cancer : les sarcomes.**

Les sarcomes sont des cancers d'origine mésenchymateuse représentant un groupe très hétérogène de cancers parmi lesquels : les liposarcomes (LPS, présentant une différenciation adipeuse), les léiomyosarcomes (LMS, exprimant des protéines spécifiques du tissu musculaire lisse), les sarcomes indifférenciés (par exemple : les myxofibrosarcomes et les histiocytofibrosarcomes malins MFH qui ne présentent pas de ligne de différenciation claire) et les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST pour Gastro Intestinal Stromal Tumor). **Le but était de déterminer si *PLAGL1* pouvait avoir un rôle diagnostique ou pronostique dans ce type de tumeurs et de comprendre les modes de régulation de son expression.**

.2.2 Expression de *PLAGL1* dans les cellules tumorales

*.2.2.1 Expression de *PLAGL1* dans les sarcomes*

Les sarcomes sont des cancers des tissus de soutien caractérisés par de nombreux remaniements génomiques. Le gène *PLAGL1* est souvent remanié dans les cancers, puisque sa perte d'expression fréquente est due, soit à une hyperméthylation de son promoteur, soit à une perte d'hétérozygotie. Afin d'établir le profil génomique de *PLAGL1* dans les sarcomes, le statut de son gène a été étudié dans certains types de sarcomes : à génomique complexe (LMS, US), à amplification (LPS) et dans les GIST.

Les analyses génomiques réalisées sur les quatre lignées de sarcomes ont montré que le gène ***PLAGL1* était remanié dans les trois lignées de liposarcomes contrairement à la lignée de léiomyosarcome**. Dans les tumeurs, la région chromosomique contenant le gène ***PLAGL1* n'était pas remaniée dans les sarcomes, mais souvent amplifiée ou délétée dans les GIST**.

Parallèlement, le profil transcriptomique de *PLAGL1* a été étudié sur ces quatre lignées de sarcomes et sur les 89 tumeurs ayant été analysées par CGH.

Les données de puces Affymetrix, confirmées par qRT-PCR, montrent que *PLAGL1* n'est pas exprimé dans la lignée MFH148 issue d'un léiomyosarcome. En revanche *PLAGL1* est exprimé dans les lignées issues de liposarcomes, mais à des niveaux variable. En effet, *PLAGL1* est fortement exprimé dans les cellules MFH128, et exprimé à un niveau intermédiaire dans les cellules LPS78 et LPS80.

Les lignées exprimant *PLAGL1* montrent une expression relativement importante puisque toutes ont un niveau d'expression supérieur à celui observé dans le tissu mammaire normal, souvent utilisé comme contrôle positif (Bilanges et al., 1999). La lignée MFH128 a une expression très supérieure à celle mesurée dans le tissu placentaire, l'un des tissus exprimant le plus *PLAGL1* (Valleley et al., 2007).

Par la suite, le profil d'expression de l'ARNm de *PLAGL1* a été étudié dans différents sarcomes. Pour cela, nous avons à disposition les résultats d'une analyse par puces transcriptomiques affymetrix et Agilent sur 89 tumeurs, réalisée par Frédéric Chibon à

l'Institut Bergonié. Cette analyse porte sur un nombre très important de tumeurs appartenant à différentes sous classes de sarcomes.

Nos résultats montrent que les sarcomes à la différence des autres types de cancers étudiés, présentent une **expression variable de l'ARNm de *PLAGL1*** allant de 2,6 à 15 (niveau d'expression exprimé en \log_2) et non pas une perte d'expression systématique. De plus, il apparaît que les **GIST et les LPS présentent une expression de *PLAGL1* significativement plus importante que dans les LMS et les US.**

A ce jour, nous n'avons pas d'explication à cette observation. Néanmoins, il a été montré que les GIST et les LPS surexprimaient le **marqueur de différenciation CD34** (Miettinen and Lasota, 2001), (Suster and Fisher, 1997). Le marqueur CD34 est une sialomucine transmembranaire impliquée dans l'adhérence inter-cellulaire qui est fortement exprimé dans les cellules hématopoïétiques, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales, certaines cellules mésenchymateuses. Il a été montré que l'expression de ce marqueur était associée à une signature moléculaire impliquant de nombreux gènes dont *PLAGL1* (Chang et al., 2008). Cet article a mis en évidence la **surexpression de *PLAGL1* dans les cellules CD34+**. Ainsi, la surexpression de *PLAGL1* observée dans les GIST et les LPS pourrait être liée à l'expression de CD34. De plus, les liposarcomes expriment également *PPAR γ* qui est un gène clé de la différenciation adipocytaire (Horvai et al., 2008). Or il a été montré que *PPARG* est un gène cible de *PLAGL1* (Barz et al., 2006). Ainsi, ***PLAGL1* pourrait jouer un rôle dans la différenciation adipocytaire en induisant l'expression de *PPAR γ*** (Barz et al., 2006).

.2.2.2 Rôle pronostique ou diagnostique de l'ARNm de PLAGL1 dans les sarcomes

Les études publiées sur l'expression de l'ARNm de *PLAGL1* consistent en général à comparer le niveau d'expression du transcrite de *PLAGL1* entre plusieurs lignées cellulaires ou entre différents tissus, ou à rechercher, par hybridation *in situ*, la localisation du transcrite. Mais peu d'études ont été menées pour connaître la relation entre l'expression de *PLAGL1* et des données cliniques, et cela sur un nombre important de tumeurs de patients.

L'hypothèse d'un rôle pronostique ou diagnostique de l'ARNm de *PLAGL1* dans les sarcomes a donc été étudiée. Une analyse univariée par groupe de tumeurs (LMS, US, LPS et GIST) a été effectuée. De façon surprenante, **dans les LMS l'expression de *PLAGL1* est plus importante dans les tumeurs de haut grade que dans les tumeurs de bas grade**. De même, ***PLAGL1* est plus exprimé dans les LMS dédifférenciés que les LMS différenciés**. Or une tumeur bien différenciée est moins agressive et de meilleur pronostic qu'une tumeur dédifférenciée. De la même façon, **dans les US, *PLAGL1* est moins exprimé dans les tumeurs ne récidivant pas** (sans métastase ou sans rechute locale).

Pour la première fois, **ces résultats suggèrent que *PLAGL1* pourrait être un facteur de mauvais pronostic**. Ces observations sont très surprenantes puisque jusqu'à ce jour, *PLAGL1* était décrit comme un gène **suppresseur de tumeur**, bien qu'il appartienne à une **famille d'oncogènes**. En effet, *PLAGL1* est un des trois membres de la famille *PLAG* (pour PLeiomorphic Adenoma Gene) qui compte également *PLAGL2* et *PLAG1*. Tous deux codent pour des facteurs de transcription à doigts de zinc comme l'est *PLAGL1*. Les trois facteurs de transcription sont caractérisés par une grande homologie de séquence, surtout en N-terminal, région qui compte 7 doigts de zinc de type C₂H₂ primordiaux pour la liaison à l'ADN. Bien que ces trois protéines à doigts de zinc soient très similaires, elles ont des rôles distincts.

PLAG1 est un oncogène situé en 8q12 qui est la cible d'une translocation t(3;8)(p21;q12) dans les adénomes pléomorphes de la glande salivaire. Ceci aboutit à la fusion de *PLAG1* et du gène de la β -caténine (*CTNNB1*) qui induit l'expression constitutive de *PLAG1* et l'inhibition de l'expression de la β -caténine. *PLAG1* qui est surexprimé dans les hépatoblastomes et les lipoblastomes, induit l'expression du gène d'empreinte *IGF2* (Zatkova et al., 2004). De plus l'expression de *PLAG1* et *PLAGL2* est augmentée dans environ 20 % des leucémies myéloïdes aiguës et auraient un rôle dans l'oncogenèse de ce type de tumeurs

(Landrette et al., 2005). Bien que *PLAGL1* ait été décrit comme un régulateur de l'apoptose et du cycle cellulaire et que de très nombreuses études aient montré une perte d'expression de *PLAGL1* dans beaucoup de cancers, comme le cancer du sein (Bilanges et al., 1999) ou de l'ovaire (Kamikihara et al., 2005), des études récentes ont décrit un **rôle oncogénique de *PLAGL1* dans les glioblastomes.**

En 2007, Lemeta *et al.*, notent une **surexpression de *PLAGL1* dans les glioblastomes multiformes, dans les méningiomes et les cellules de Purkinje** (Lemeta et al., 2007), alors que l'expression de *PLAGL1* est perdue dans les astrocytomes de bas grade. En 2009, l'équipe de Takuichiro Hide montre 1) que la survie des patients atteints de gliomes est plus faible si l'ARNm de *PLAGL1* est exprimé, 2) que l'expression de *PLAGL1* est importante dans des zones proliférantes du cerveau et 3) qu'il jouerait un rôle majeur dans la tumorigenèse des glioblastomes (Hide et al., 2009). Le retard de croissance observé chez les souris déficientes en *PLAGL1* n'est pas cohérent avec la fonction d'un gène suppresseur de tumeur mais est plus en faveur d'un rôle oncogénique (Varrault et al., 2006). **Cette dualité de fonction pourrait ainsi dépendre du type tumoral dans lequel *PLAGL1* est exprimé.**

Notre étude suggère que l'expression du transcrite de *PLAGL1* pourrait être un **facteur de mauvais pronostic dans les LMS et les US**, laissant supposer que *PLAGL1* puisse y avoir un rôle oncogénique. Par ailleurs, dans les LPS et les GIST, l'expression de *PLAGL1* n'a pu être reliée à aucun facteur clinique, suggérant que *PLAGL1* ne jouerait pas de rôle dans l'agressivité et le devenir de ces sarcomes. Enfin, il ne faut pas oublier que la présence de l'ARNm ne prévaut en rien à l'existence systématique de la protéine responsable de la fonction, et qu'une régulation post-transcriptionnelle de *PLAGL1* dans ces sarcomes est toujours envisageable.

.2.3 Régulation de l'expression de *PLAGL1* par méthylation

Nous avons montré que *PLAGL1* avait un niveau d'expression de son ARNm variable au sein d'un même groupe tumoral. Notre objectif a donc été de rechercher les **mécanismes de régulation transcriptionnel de *PLAGL1* dans les sarcomes** pouvant expliquer ces différents niveaux d'expression.

La première hypothèse que nous avons explorée est celle d'une modification du profil génomique de *PLAGL1*, puisque les sarcomes sont des cancers génétiquement très remaniés (Chibon et al., 2010).

Nos analyses montrent que, même dans les tumeurs génétiquement remaniées pour la région 6q (GIST et LPS), il n'y a **pas de corrélation entre le profil génomique et transcriptomique de *PLAGLI***. Les mêmes observations ont été faites sur les lignées cellulaires de sarcomes étudiées (MFH128, MFH148, LPS78 et LPS80). Ceci suggère que l'hétérogénéité dans l'expression de *PLAGLI* observée dans les sarcomes n'est pas due à des remaniements génomiques.

De façon générale, pour être exhaustif quant à l'étude du profil génomique de *PLAGLI* dans les sarcomes, il aurait été nécessaire de vérifier précisément le nombre de copies de gène *PLAGLI*. Si la CGH a permis de montrer que la région chromosomique contenant le gène *PLAGLI* n'était pas remaniée dans les sarcomes, la précision de la technique n'est pas suffisante pour écarter l'hypothèse de remaniements de quelques centaines de paires de bases et donc celle d'une perte d'hétérozygotie du gène *PLAGLI*. Dans les GIST, l'utilisation de CGH array (plus précise) a mis en évidence des remaniements. Bien que ceux-ci ne soient pas liés à l'expression, il est nécessaire de vérifier la présence des deux allèles de *PLAGLI*.

La deuxième hypothèse permettant d'expliquer la variabilité d'expression du transcrite de *PLAGLI* était une **modification de l'empreinte parentale**.

En effet, *PLAGLI* est un gène soumis à l'empreinte parentale, ce qui induit une expression monoallélique uniquement dirigée par l'allèle paternel. L'expression de *PLAGLI* est conditionnée par deux promoteurs comptant chacun un îlot CpG.

Le premier promoteur, contient l'îlot CpG **P1** constitué de **118 sites de méthylation**, le deuxième promoteur contient l'îlot **P2** constitué de **113 sites de méthylation**.

Ces deux promoteurs peuvent contrôler l'expression des deux isoformes transcriptionnelles de *PLAGLI*, mais dans des tissus distincts. Ainsi, le promoteur contenant l'îlot P1 est majoritairement impliqué dans la régulation de *PLAGLI* dans l'ovaire, le placenta, le cerveau (...) alors que le promoteur contenant l'îlot P2 est mis en jeu dans les leucocytes (Valleley et al., 2007).

Les premières études portant sur le lien entre l'expression de *PLAGLI* et le cancer ont mis en évidence une perte d'expression de *PLAGLI* dans le cancer de l'ovaire et du sein notamment. C'est dans ce dernier modèle que la perte d'expression de *PLAGLI* a pu être reliée pour la première fois à une méthylation aberrante de son promoteur (Bilanges et al., 2001). En effet,

le traitement à la 5-azadéoxycytidine de plusieurs lignées mammaires entraîne l'augmentation significative de l'expression de l'ARNm de *PLAGLI*.

En 2000-2001, trois articles portant sur le TNDM (diabète néonatal transitoire) montrent que l'expression de *PLAGLI* est conditionnée par la méthylation de son promoteur. Dans cette pathologie, le transcrite de *PLAGLI* est surexprimé en raison de la **perte de l'empreinte parentale** due à une absence de méthylation de l'allèle maternel (Kamiya et al., 2000), (Arima et al., 2001), (Varrault et al., 2001). Par la suite de nombreux articles ont montré que la perte d'expression de *PLAGLI* dans les cancers était due à **une méthylation de l'allèle paternel** du promoteur P1 ou à une **perte d'hétérozygotie** (Kamikihara et al., 2005), (Dusica et al., 2004), (Abdollahi et al., 2003).

Nous avons donc étudié la méthylation du promoteur P1 de *PLAGLI* dans les sarcomes pour savoir si une variation du niveau de méthylation de l'ADN pouvait expliquer l'hétérogénéité de l'expression de *PLAGLI*.

.2.4 Apport de la technique de pyroséquençage pour l'étude de la méthylation de l'ADN

Les études effectuées jusqu'à présent sur la méthylation du promoteur de *PLAGLI* ont surtout été réalisées par MSP (Methylation Specific PCR), ou dans une moindre mesure par séquençage.

- La MSP est une technique classique pour étudier la méthylation de l'ADN. Elle permet d'amplifier spécifiquement et de façon distincte l'ADN méthylé et l'ADN non méthylé par PCR, en utilisant des amorces contenant un polymorphisme (C/T) spécifiques du niveau de méthylation. La position des amorces sur un ou deux sites de méthylation permet d'assurer la spécificité du produit formé. Cependant, la MSP ne permet de connaître que le niveau de méthylation des CpG contenus dans les amorces mais pas des CpG du fragment de PCR.
- Le séquençage, après sous clonage du produit de PCR ayant au préalable été traité au bisulfite de sodium, est une technique robuste, qui permet potentiellement de connaître le pourcentage de méthylation de tous les sites d'un îlot, mais cette technique est coûteuse et fastidieuse. De plus, le séquençage après clonage de la séquence d'intérêt peut induire un biais par le choix des clones à séquencer. En effet, certaines séquences

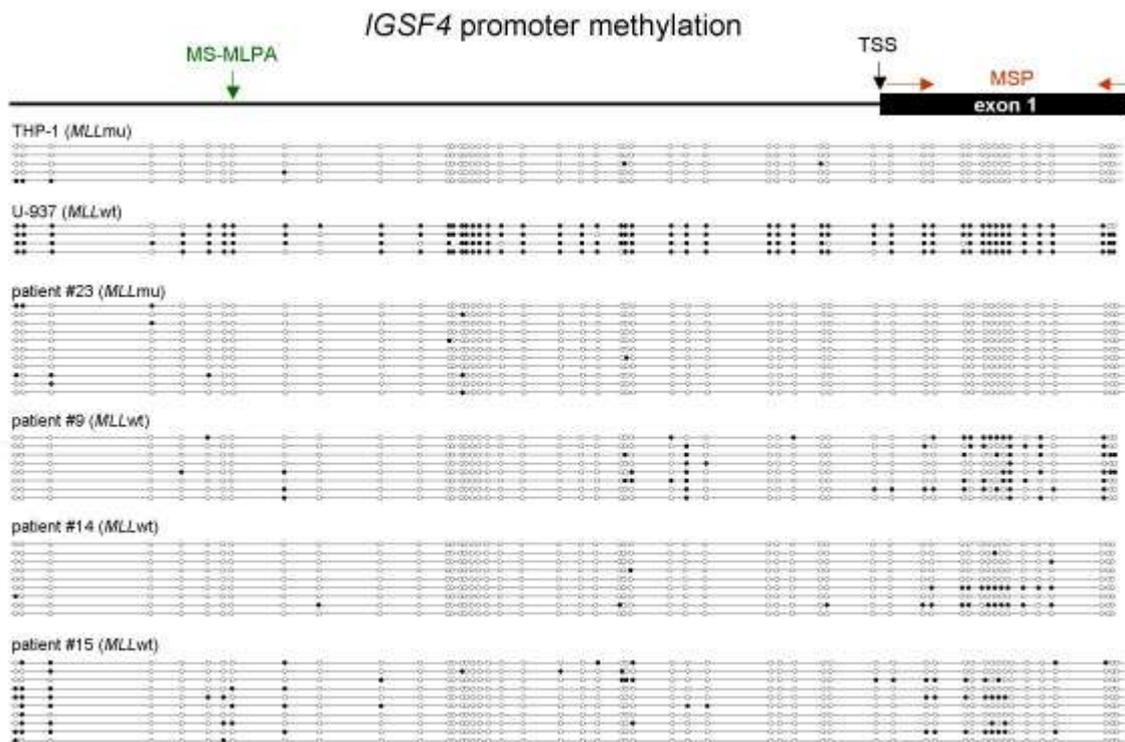


Figure 99 : exemple d'étude de la méthylation d'*IGSF4* par MSP et séquençage (Röhrs et al., 2009)

(les ronds vides représentent les sites non méthylés alors que les ronds pleins représentent les sites méthylés)

- peuvent se cloner plus facilement que d'autres, certains plasmides peuvent se transformer plus facilement que d'autres, ceci peut donc biaiser le calcul du pourcentage de méthylation.

Dans le cas de *PLAGLI*, les analyses de méthylation réalisées par séquençage ne couvrent en général qu'une dizaine de CpG (Valleley et al., 2007). Or, plusieurs études montrent que **la méthylation de l'ADN n'est pas homogène le long d'un îlot** (Yang et al., 2008), (Lopez-Serra et al., 2008), (Nabils et al., 2009), (Röhrs et al., 2009). Le choix de la zone à séquencer induit donc, là encore, un biais potentiel.

Un exemple de ce biais possible a été donné par Röhrs *et al.*, en 2009. Dans cet article, les auteurs ont étudié la méthylation du promoteur du gène *IGSF4* : dans un premier temps par MSP, en choisissant des amorces dans le premier exon et ensuite par séquençage, en prenant des amorces en amont du premier exon. Comme on peut le voir sur la Figure 99, la méthylation n'est pas homogène et la MSP surévalue la méthylation par rapport au séquençage.

Nous avons donc choisi d'étudier les 118 sites de méthylation de l'îlot P1 par pyroséquençage.

Cette technique permet de **quantifier** précisément le niveau de méthylation de chaque CpG d'un produit PCR sans passer par une étape de clonage. Comme pour la MSP, l'ADN à étudier est traité au bisulfite de sodium puis amplifié par PCR sans discriminer l'ADN méthylé du non méthylé. Pour finir l'ADN est séquencé. Cette technique a l'avantage d'être rapide puisque 96 échantillons peuvent être séquencés simultanément et directement car il n'est pas nécessaire de cloner les produits PCR avant de les séquencer. Toutefois, cette technique ne permet de séquencer qu'une centaine de paires de bases. Il faut donc plusieurs PCR et plusieurs séquençages par PCR pour couvrir un îlot entier.

.2.5 Mise en évidence d'un profil de methylation

Le pourcentage de méthylation d'une centaine de tumeurs a été mesuré afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la variabilité du niveau d'expression de *PLAGLI* dans les sarcomes serait due à des différences de méthylation de son promoteur. Nous avons sélectionné des

tumeurs pour lesquelles des études de CGH array et de puces Affymetrix avaient été réalisées. Ainsi 35 LMS, 28 US, 14 LPS et 11 GIST ont été analysés.

De façon surprenante, cette étude a permis de montrer que la **méthylation n'était pas homogène le long de l'îlot P1** : le pourcentage de méthylation variant d'un CpG à l'autre. La grande majorité des études publiées à ce jour sur la méthylation de l'ADN met en relation la méthylation de quelques CpG choisis au hasard avec l'expression, mais peu d'études ont été menées sur un grand nombre de sites de méthylation. Lorsque quelques sites sont étudiés, même si le pourcentage de méthylation diffère d'un CpG à l'autre, ceci n'est pas pris en compte, seul la moyenne de méthylation est utilisée pour établir la corrélation avec le profil transcriptomique du gène d'intérêt.

Néanmoins, quelques articles récents mettent en avant **l'hétérogénéité de la méthylation** le long d'un îlot CpG. Graff *et al.*, ont ainsi comparé le profil de méthylation d'une vingtaine de CpG de l'îlot CpG du promoteur de l'E-cadhérine dans trois lignées de cancer du sein. Ils ont établi que le profil de méthylation différait d'une lignée à l'autre mais aussi d'un CpG à l'autre. De plus, **le profil de méthylation semble évoluer en fonction des conditions de culture** puisque la méthylation de certains sites de méthylation change de façon significative selon que la culture se fait en monocouche ou en 3D (Graff *et al.*, 2000). Ceci tend à montrer que **l'environnement influe sur la méthylation de l'ADN** et permet l'adaptation du phénotype cellulaire. L'hétérogénéité du profil de méthylation a également été montrée pour les gènes : *RB* dans le rétinoblastome (Stirzaker *et al.*, 1997), *CX26* (connexine 26) dans le cancer du sein (Tan *et al.*, 2002) et *TP15* dans la leucémie myéloïde aiguë (Dodge *et al.*, 1998).

Les études réalisées jusqu'à présent ne concernant qu'un petit nombre de CpG, il était difficile de mettre en évidence de telles variations de la méthylation d'un CpG à l'autre. L'utilisation de technique de séquençage et de pyroséquençage permet une avancée des connaissances sur la répartition de la méthylation le long des îlots CpG. Il est probable que *RB*, *TP15*, *CX26*, *E-Cad* et *PLAGL1* ne soient pas des exceptions, mais que la grande majorité des îlots CpG présentent une hétérogénéité de méthylation.

L'article de Pao *et al.*, va encore plus loin et montre que la méthylation est hétérogène le long d'un îlot CpG mais également que la méthylation de certains CpG est différente d'un cancer à

l'autre, et entre le tissu normal et le tissu tumoral (Pao et al., 2001). Il existerait donc une **signature de méthylation** propre à chaque type de cancer et une signature permettant de discriminer le tissu sain du tissu tumoral : ces CpG peuvent alors être considérés comme des **marqueurs tumoraux**.

Nous avons donc analysé la méthylation de *PLAGL1* en regardant 1) si la méthylation de *PLAGL1* était différente dans le tissu normal et tumoral et s'il existait une signature tumorale de méthylation, 2) s'il existait une signature de méthylation propre à chaque type de sarcomes.

.2.5.1 Signature tumorale de méthylation de l'ADN

Le profil moyen de méthylation de chaque groupe de sarcome (GIST, LMS, LPS, US) a été comparé au profil de cellules primaires fibroblastiques. Ces cellules ont été choisies car elles représentaient le meilleur modèle de tissu sain correspondant aux sarcomes. En effet, les sarcomes ne dérivent pas forcément du tissu dont les tumeurs présentent la ligne de différenciation. Le tissu musculaire ou adipeux ne représente donc pas forcément le meilleur tissu sain pour être comparé aux sarcomes.

Nous avons calculé les écarts entre la moyenne de méthylation de chaque groupe au niveau de chaque CpG et le pourcentage de méthylation des cellules fibroblastiques. Nous avons pu constater que tous les groupes tumoraux étudiés avaient un profil similaire entre eux par rapport aux fibroblastes et que certains CpG avaient un taux de méthylation similaire dans tous les groupes mais très différent de celui des fibroblastes.

Ainsi, les CpG 22, 45, 57, 70 et 73 ont un pourcentage de méthylation différent d'au moins 20 à 50 % par rapport à un modèle de cellules saines. **L'étude de la méthylation de ces CpG peut donc permettre de distinguer un tissu sain d'un tissu tumoral.** L'étude de ces quelques sites est facile à intégrer dans le processus de diagnostic, mais pour cela il faudrait avant tout confirmer ces résultats sur un panel plus large de tissus sains et tumoraux.

Pour une application clinique, il serait intéressant de comparer la méthylation de ces CpG, dans du tissu sain, du tissu tumoral et du tissu précancéreux. En effet, il existe un nombre important de lésions précancéreuses apparentées aux sarcomes. Pouvoir discriminer les tumeurs malignes et bénignes par méthylation serait plus informatif que de pouvoir

différencier du tissu normal et tumoral, facilement identifiable par une observation anatomopathologique.

L'autre amélioration possible de cette signature serait de pouvoir quantifier le pourcentage de méthylation de ces CpG sur un échantillon sanguin. Des études récentes, sur le cancer du poumon par exemple, montrent que la méthylation peut être utilisée pour diagnostiquer une tumeur en utilisant un prélèvement sanguin. En effet, le sang de patients atteints de cancer peut contenir des cellules tumorales, ceci permettrait un diagnostic plus précoce (Palmisano et al., 2000).

.2.5.2 Signature inter-tumorale de méthylation de l'ADN

Au sein d'un groupe tumoral, un profil commun se dégage. Nous avons, d'une part, calculé la moyenne de méthylation de chaque CpG par groupe afin de déterminer le profil de méthylation moyen des LMS, US, LPS et GIST. D'autre part, nous avons fait la moyenne des profils de tous les sarcomes (tous sous-types confondus) et nous avons calculé les écarts entre la moyenne de chaque groupe et la moyenne générale des sarcomes afin de mettre en évidence les positions spécifiques de chaque sous-type. De façon intéressante, nous avons pu déterminer plusieurs **CpG corrélés au type de sarcome**. Ceci permettrait de classer les types de sarcomes non plus histologiquement mais d'après leur niveau de méthylation.

Les CpG les plus intéressants semblent être les n° 96, 106 et 108 qui, dans les GIST, ont un niveau de méthylation supérieur ou inférieur aux autres groupes d'au moins 20 %.

Or, les analyses anatomopathologiques ne permettent pas toujours de distinguer les GIST des LMS et de nombreuses tumeurs, par le passé, diagnostiquées comme étant des LMS étaient en fait des GIST (Katz and DeMatteo, 2008). Il a fallu attendre l'utilisation de la CGH array pour mettre en évidence une absence d'homologie entre le profil génomique des GIST et celui des LMS. La CGH est une technique coûteuse et encore peu répandue, nos travaux suggèrent que la méthylation des positions 96, 106 et 108 pourrait aider à diagnostiquer les GIST et à les discriminer des autres types de sarcomes. Le pyroséquençage n'est pas une technique répandue mais, étant donné le faible nombre de CpG à analyser, il est tout à fait envisageable

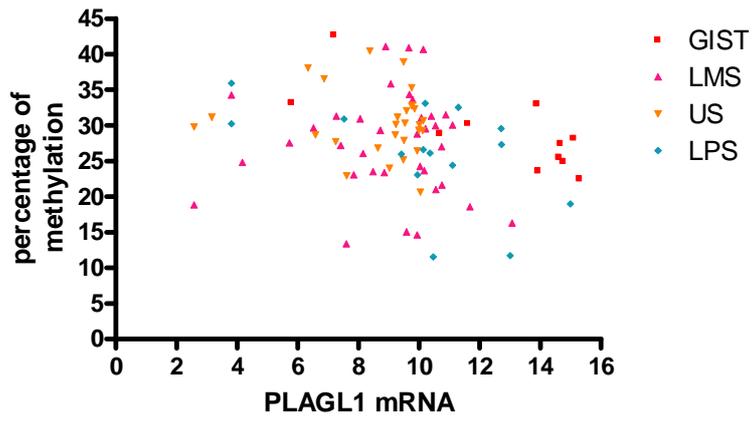


Figure 100: corrélation entre le pourcentage de méthylation globale et l'expression de *PLAGL1*

dans un but diagnostique, de quantifier la méthylation des CpG d'intérêt par MSP quantitative, une technique plus facile à mettre en place en routine et peu onéreuse.

Nous avons pu mettre en évidence une signature de méthylation propre à chaque type de sarcome qui permet entre autres de discriminer les GIST des autres types de sarcomes. Pour autant, les différences de méthylation sont très faibles entre les US, les LPS et les LMS, ce qui suggère que les sarcomes ont des signatures de méthylation quasi-identiques et différentes des GIST qui ne sont d'ailleurs plus considérés tout à fait comme des sarcomes. Ceci tendrait à montrer que plus les types tumoraux sont proches, plus les signatures de méthylation le sont également et inversement plus les types de cancers comparés sont éloignés plus leurs signatures de méthylation sont divergentes.

.2.6 Corrélation expression-méthylation

La méthylation est un mécanisme épigénétique de régulation de l'expression des gènes. La majorité des études, portant sur la relation méthylation de l'ADN / expression d'un gène, corréle la méthylation globale d'un promoteur à l'expression de l'ARNm. Notre travail a permis de montrer que la méthylation globale de l'îlot P1 de *PLAGL1* est très fortement corrélée à l'expression de l'ARNm de *PLAGL1* dans les lignées de sarcomes étudiées (coefficient de Pearson à 0,99 et p-value à 0,001). En revanche, la corrélation entre le pourcentage de méthylation globale et l'expression de *PLAGL1* est faible lorsque la totalité des quatre sous-types de sarcomes est considérée (Pearson = -0,249 p-value = 0,0155). **La méthylation globale du promoteur de *PLAGL1* est donc peu corrélée à l'expression de *PLAGL1* dans les tumeurs.** Etant donné la répartition des tumeurs et la physiologie très différente de chaque type de sarcome, il semblait évident que chaque groupe devait être considéré indépendamment (Figure 100).

Dans les GIST et les LPS, la méthylation globale corréle bien avec l'expression de l'ARNm de *PLAGL1* (GIST : Pearson = -0,76 p-value = 0,0065 ; LPS : Pearson = -0,52 p-value = 0,047). Par contre, de façon surprenante, dans les LMS et les US, la méthylation globale de l'îlot P1 du promoteur de *PLAGL1* n'est absolument pas corrélée à l'expression de son ARNm (LMS : Pearson = -0,016 p-value = 0,92 ; US : Pearson = -0,107 p-value = 0,059).

Contrairement au dogme établi, **la méthylation globale n'est donc pas toujours liée à l'expression des gènes**. De plus en plus d'articles démontrent que, pour certains gènes, seuls quelques sites de méthylation d'un îlot CpG conditionnent l'expression du gène. En 2002, l'article de Tan *et al.*, va dans ce sens. Il met en avant l'importance de **clusters de dinucléotides CpG**, regroupant un petit nombre de sites de méthylation, conditionnant l'expression du gène de la connexine 26 dans des lignées de cancers du sein (Tan et al., 2002). De la même façon, les travaux portant sur la régulation épigénétique du gène *ZFP36* codant pour la TTP (tristetrapoline) publiés en 2010 par Sohn *et al.*, indiquent que seul **un CpG dirige l'expression du gène *ZFP36*** dans le cancer du foie (Sohn et al., 2010).

Nous avons donc analysé la corrélation entre chaque CpG et l'expression de *PLAGLI* et cela pour chaque groupe tumoral. Nous avons mis en évidence que seuls **quelques sites de méthylation étaient liés à l'expression de *PLAGLI***. Comme cela avait été montré récemment, seuls certains CpG d'un îlot CpG conditionnent l'expression d'un gène (Karayan-Tapon et al., 2010), (Yan et al., 2009). Le nombre de sites de méthylation corrélés à l'expression est variable d'un type tumoral à l'autre : 6 CpG dans les LMS, 19 dans les LPS, 16 dans les US et 36 dans les GIST. **Seuls quelques CpG significativement corrélés à l'expression sont communs à plusieurs groupes**. En effet, les CpG n° 1, 4, 5, 6 et 7 sont corrélés à l'expression de *PLAGLI* dans les LMS et les LPS ; les CpG n° 36, 51 et 58 sont corrélés à l'expression de *PLAGLI* dans les US et les GIST ; le CpG n° 33 est corrélé à l'expression de *PLAGLI* dans les LMS, les GIST et les US. En calculant la moyenne de méthylation des positions significativement reliées à l'expression dans chaque groupe et en la reliant à l'expression de *PLAGLI*, nous avons amélioré de façon très significative le coefficient de corrélation obtenu, par rapport à celui observé lors de l'approche « méthylation globale » dans les LMS et les US et, dans une moindre mesure, dans les LPS et les GIST. Le grand nombre de sites significativement corrélés à l'expression de *PLAGLI* dans les LPS et les GIST explique que la méthylation globale puisse être significativement corrélée à l'expression de *PLAGLI*. Ce sont ces sites qui rendent la corrélation significative dans les tumeurs, car lorsqu'on regarde la corrélation entre la moyenne des CpG du promoteur de *PLAGLI* après avoir exclu les CpG corrélés à l'expression, celle-ci n'est plus significative. Parmi les CpG significativement corrélés à l'expression de *PLAGLI* dans les US, trois étaient **corrélés positivement** c'est-à-dire que l'augmentation du pourcentage de méthylation sur ces sites était liée à une augmentation de l'expression de *PLAGLI*. Ceci est en désaccord avec le dogme selon lequel la méthylation est un mécanisme inhibiteur de l'expression des gènes.

Quelques études montrent que les protéines de liaison à l'ADN ayant un rôle de répresseur de la transcription peuvent se lier à des séquences contenant des CpG et bloquer l'expression des gènes lorsque ces CpG sont méthylés. Par contre lorsque ces sites sont méthylés, ces répresseurs ne se fixent plus, il y a une levée de l'inhibition et l'expression des gènes est augmentée (Pipaon et al., 2005), (Nabils et al., 2009). De façon générale, ces résultats montrent que **la position des amorces de PCR choisie pour une analyse par MSP est primordiale et doit être adaptée pour chaque tissu et chaque gène étudié**. Il apparaît donc que l'expression de *PLAGL1* dépend du niveau de méthylation de quelques sites CpG de l'îlot P1 et non pas des 118 CpG. Il existerait donc des « **points chauds** » de méthylation au sein de l'îlot CpG de *PLAGL1*. Ces « points chauds » sont plus ou moins regroupés dans l'îlot.

- Dans les LMS, les CpG reliés à l'expression sont pour 5 des 6 sites, situés au début de l'îlot,
- dans les LPS, la majorité des CpG corrélés à l'expression est regroupée dans les 20 premiers sites de méthylation,
- dans les US, la moitié des CpG corrélés à l'expression est regroupée entre les CpG 26 et 36,
- dans les GIST, ces sites sont surtout dans le deuxième tiers de l'îlot.

On peut également noter que les CpG corrélés à l'expression sont consécutifs, ainsi les CpG 51 à 68 sont tous liés à l'expression de *PLAGL1* dans les GIST par exemple. Le fait que ces sites soient spécifiques de chaque type de sarcomes, laisse penser que **les voies de signalisation permettant l'expression de *PLAGL1***, et donc les facteurs de transcription se fixant au promoteur de *PLAGL1*, **sont différentes dans chaque type de sarcomes**. Ceci est en accord avec l'hypothèse selon laquelle **le microenvironnement influe sur la méthylation et donc l'expression de certains facteurs**. En effet, Graff *et al.*, ont montré que le profil de méthylation du promoteur de l'E-cadhérine variait en fonction des conditions de culture et était différent selon le potentiel invasif suggérant que la méthylation de l'E-cadhérine était le mécanisme donnant l'avantage sélectif aux cellules tumorales impliquées dans la formation de métastases (Graff et al., 2000). L'environnement cellulaire joue un rôle sur la méthylation de l'ADN mais l'Environnement en général influe lui aussi sur la méthylation. Ainsi il a été montré que l'épigénome de jumeaux monozygotes était équivalent durant les premières années de vie puis divergeait avec l'âge, ce qui suggère un **rôle de l'environnement sur la méthylation de l'ADN** (Ollikainen et al., 2010). Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de l'alimentation, l'exposition à l'amiante, à des toxines et à certains métaux

(...) dans la modification du profil épigénétique des individus. Ceci pourrait d'ailleurs expliquer l'apparition de certaines pathologies chez les personnes plus exposées aux carcinogènes (Barros and Offenbacher, 2009).

Les sarcomes représentent un groupe très hétérogène de tumeurs, l'environnement cellulaire propre à chaque type de sarcome peut expliquer l'hétérogénéité des profils de méthylation constaté et la spécificité des CpG corrélés à l'expression.

Les CpG corrélés à l'expression de *PLAGL1* sont variables en fonction du type de sarcome. Ceci suggère que les facteurs de transcription se fixant au promoteur de *PLAGL1* sont spécifiques de chaque sous-groupe ou que la fixation de facteurs de transcription identiques sur des sites différents permet le recrutement de cofacteurs spécifiques de chaque groupe de sarcomes.

Une analyse de la séquence de l'îlot P1 par une base de données (PROMO) a permis de déterminer les facteurs de transcription susceptibles de se fixer aux CpG corrélés à l'expression de *PLAGL1*, parmi lesquels les protéines RXR α , E2F1, P53, SP1, TFII-I et GCF (GC-rich sequence DNA-binding factor). De plus, les facteurs de transcription P53, PAX5, SP1 et GCF sont susceptibles de se lier aux CpG positivement corrélés à l'expression de *PLAGL1*. Ces facteurs de transcription, s'ils se fixent, agiraient comme des répresseurs. Ce rôle de répresseurs de la transcription a été montré pour GCF qui est capable d'inhiber l'expression de l'EGFR ou de la β actine par exemple (Beguinet et al., 1995), (Johnson et al., 1992). SP1 partage le même site de fixation que GCF et a été également décrit comme répresseur de la transcription (Zaid et al., 1999).

Par la suite, il serait intéressant de mettre en évidence les facteurs de transcription se fixant réellement aux sites de méthylation de l'îlot P1, afin de montrer la sensibilité de fixation de ces protéines à la méthylation de l'ADN et de déterminer si les facteurs de transcription sont spécifiques à chaque type de sarcomes.

.2.7 Méthylation et facteurs cliniques

Ces CpG corrélés à l'expression de *PLAGL1* conditionnent la transcription du gène. Or nous avons pu démontrer que l'expression de *PLAGL1* était associée à certains facteurs cliniques.

Des travaux mettent en évidence le rôle pronostique ou diagnostique de certains CpG dans des cancers (Ferreri et al., 2004), (Karayan-Tapon et al., 2010).

Nous avons donc recherché si **le niveau de méthylation des CpG de l'îlot P1 de *PLAGL1* pouvait avoir un rôle pronostique ou diagnostique dans les sarcomes**. Pour cela nous avons comparé le niveau de méthylation de chaque CpG de l'îlot P1 de *PLAGL1* avec le grade, la rechute locale, la différenciation tumorale, la rechute locale...

Cette analyse statistique nous a permis de mettre en évidence **un grand nombre de CpG liés à des facteurs cliniques**, surtout dans les US. Parmi ces CpG, certains étaient également corrélés à l'expression de *PLAGL1*.

Dans les LMS, **le site de méthylation n°33 est corrélé à l'expression et au grade**. Plus cette position est méthylée, plus l'expression de *PLAGL1* est faible et plus la tumeur est de bas grade. Ceci a été mis en évidence dans la première cohorte de LMS puis validé dans la deuxième cohorte de tumeurs. **L'expression de *PLAGL1* et son hypométhylation sur le CpG 33 sont donc des facteurs de mauvais pronostic dans les LMS**. Le fait que tous les CpG corrélés à l'expression ne soient pas tous corrélés au grade comme le CpG 33 peut avoir deux raisons :

- Le facteur de transcription qui se fixe spécifiquement au CpG 33 lorsque celui-ci n'est pas méthylé, influe sur l'expression de *PLAGL1* mais également sur celle d'autres gènes. C'est l'ensemble de ces gènes qui modifie le phénotype et augmente l'agressivité tumorale
- La méthylation du CpG 33 pourrait être régulée de façon plus fine que les autres CpG corrélés à l'expression de *PLAGL1*. Le CpG 33 serait donc un marqueur plus précoce que les autres CpG. La méthylation sur ce site aurait une gamme de pourcentage plus importante qui rendrait la corrélation avec le facteur clinique significative.

Dans les US, l'étude réalisée sur la première cohorte de tumeur a permis de montrer que le **CpG n° 107 était corrélé à l'expression, à la métastase et à la survie ; le CpG 109 était corrélé à l'expression, à la récurrence locale et au grade**. Pour ces deux CpG, plus la méthylation est faible, plus l'expression de *PLAGL1* est forte, plus les tumeurs sont de haut grade et plus le risque de rechute locale et de métastase est grand. **L'expression de *PLAGL1***

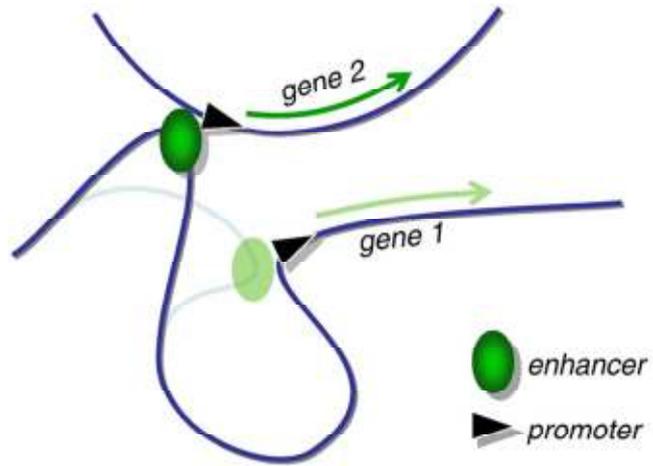


Figure 101 : modèle d'interaction entre deux gènes situés sur deux chromosomes différents

et son hypométhylation sur les sites de méthylation n° 107 et 109 sont donc des facteurs de mauvais pronostic dans les US.

Le fait que tous les CpG corrélés à l'expression ne soient pas corrélés aux facteurs cliniques peut s'expliquer de la même façon que pour les LMS. De façon surprenante les deux CpG 107 et 109 ne sont pas associés aux mêmes facteurs cliniques. Ceci peut s'expliquer par l'hypothèse selon laquelle les facteurs de transcription qui se fixent aux CpG 107 et 109 dirigent aussi l'expression d'autres gènes, le phénotype observé ne serait pas uniquement dû à *PLAGLI* mais au réseau de gènes induits. D'autre part, l'expression de *PLAGLI* est associée à la récurrence locale et à la métastase et non aux autres facteurs cliniques, ceci peut s'expliquer par un biais d'échantillonnage ou une mauvaise balance des groupes comparés, pour chaque facteur clinique.

Il est important de noter qu'une partie de ces résultats n'a pas été confirmée dans la deuxième cohorte de sarcomes indifférenciés. Ceci peut être attribué à la mauvaise balance des échantillons en fonction de certains facteurs cliniques comme le grade et la récurrence locale. Il paraît donc nécessaire de valider les résultats de la première cohorte, en augmentant le nombre d'échantillon de la cohorte de validation, et en prenant soin d'équilibrer autant que possible les groupes à comparer.

Hormis ces trois positions de méthylation, de nombreuses autres ont pu être associées à des facteurs cliniques mais pas à l'expression de *PLAGLI*.

Dans les GIST, le CpG n°95 est associé à la classification de Miettinen, l'hypométhylation du CpG 95 du promoteur de *PLAGLI* est un facteur de bon pronostic dans ce type tumoral.

Dans les LMS, le CpG 19 est lié à la survie globale.

Dans les US, un grand nombre de positions sont associées à la métastase, au grade tumoral, à la récurrence locale et à la survie. De plus, certains CpG sont, dans les US, **prédictifs pour plusieurs critères tumoraux** : les CpG 106 et 114 sont ainsi associés à la survenue de métastase, à la récurrence locale et à la survie globale, le CpG 110 est associé à la survenue de métastases et à la survie (...). **Dans ces deux sarcomes (LMS et US), l'hypométhylation du promoteur de *PLAGLI* est un facteur de mauvais pronostic.**

L'association entre certains CpG et des facteurs cliniques alors que ces CpG ne sont pas corrélés à l'expression de *PLAGLI* peut s'expliquer par l'hypothèse selon laquelle des facteurs de transcription se fixeraient à la fois au promoteur de *PLAGLI* et à celui d'autres

gènes, l'expression des autres gènes donnant le phénotype observé (Figure 101). Le niveau de méthylation de ces CpG ne serait donc qu'un marqueur et *PLAGL1* ne serait pas la cause du phénomène observé. De plus, il a été montré que des facteurs de transcription fixés à un promoteur peuvent 1) réguler plusieurs gènes régulés par méthylation et situés sur le même chromosome (Movassagh et al., 2010), 2) interagir physiquement avec le promoteur de gènes situés sur d'autres chromosomes et en conditionner l'expression (Zhao et al., 2006).

La plupart des études portant sur le lien entre méthylation de l'ADN et facteurs cliniques établit une association entre méthylation globale et facteurs cliniques. Par exemple, Veek *et al.*, en 2008 montrent que la méthylation de *DKK3* est un facteur pronostique de la survie globale dans le cancer du sein. La survie à 10 ans est de 54 % pour les patients *DKK3* méthylés contre 97 % pour les patients *DKK3* non méthylés (Veeck et al., 2009). Le même type d'étude a été fait sur le cancer de la prostate et a révélé que la méthylation du gène APC était un facteur de mauvais pronostic en augmentant significativement la mortalité de ce type de cancer (Richiardi et al., 2009). Cependant, la plupart des études montrant une association entre la méthylation et des facteurs cliniques était réalisée par MSP ou puces-méthylation, techniques ne permettant pas de quantifier la méthylation de chaque CpG d'un îlot et donc de déterminer quels sites de méthylation sont plus particulièrement reliés à ces facteurs cliniques.

Le développement de techniques plus résolutive, comme le pyroséquençage et le séquençage, permet en théorie une analyse plus fine de la méthylation. Pourtant, à ce jour, les analyses effectuées par pyroséquençage n'ont pas permis de définir des sites précis de méthylation corrélés à des facteurs cliniques, seul la méthylation globale de quelques CpG a été prise en compte. Ceci est à l'image de l'article publié en 2010 qui met en évidence un lien entre méthylation des gènes *ABCBI*, *GSTP1* et *FOXCI* et la survie des patients traités par doxorubicine dans le cancer du sein (Dejeux et al., 2010) ou celui d'Hernandez-Vargas *et al.*, 2010 qui associe la méthylation de plusieurs CpG à la survie dans carcinome hépatocellulaire (Hernandez-Vargas et al., 2010). Peu d'études à ce jour déterminent des CpG spécifiquement associés à des facteurs cliniques, l'une d'elles est une étude réalisée par Lucie Karayan-Tapon qui montre que seuls certains CpG du promoteur du gène *MGMT*, déjà connu pour être un marqueur de l'efficacité de certaines chimiothérapies, peuvent prédire la survie de patients atteint de glioblastomes (Karayan-Tapon et al., 2010).

Notre travail s'inscrit dans cette évolution technique et conceptuelle qui, par l'utilisation du pyroséquençage, permet de définir précisément les CpG d'intérêt corrélés à des facteurs cliniques.

.2.8 Conclusion

En conclusion, ce travail a permis de montrer que :

- 1) seules quelques positions de méthylation étaient impliquées dans le contrôle de l'expression de *PLAGL1*,
- 2) certains CpG étaient différentiellement méthylés dans le tissu sain et dans le tissu tumoral et pourraient faciliter le diagnostic
- 3) des CpG pouvaient être reliés à certains facteurs cliniques diagnostiques ou pronostiques
- 4) la spécificité de méthylation de certains CpG en fonction du type de sarcome considéré.

Nos résultats suggèrent que des **altérations épigénétiques** pourraient être utilisées comme **marqueurs moléculaires** d'agressivité tumorale et permettre un meilleur diagnostic, un meilleur pronostic et orienter la prise en charge (chimiothérapie, radiothérapie) en fonction de la probabilité de rechute ou de l'agressivité tumorale par exemple.

L'étude de la méthylation du promoteur de *PLAGL1* dans les LMS et les US a révélé que sa méthylation était un **facteur de mauvais pronostic**, tout comme le montraient les analyses d'expression de l'ARNm de *PLAGL1* dans ces types tumoraux. Les différences sont statistiquement beaucoup plus significatives dans les études de méthylation que dans les études transcriptomiques, ce qui tend à montrer que la *PLAGL1* serait un marqueur plus sensible ou plus précoce que l'ARNm. Ceci est en accord avec les connaissances actuelles qui tendent à montrer que des **épimutations** (mutations au niveau épigénétique, variation de la méthylation de l'ADN) seraient des **phénomènes précoces de la tumorigenèse**. Cela a surtout été envisagé pour les gènes d'empreinte *IGF2* et *H9*, il n'est donc pas impossible qu'une épimutation de *PLAGL1* soit également un phénomène précoce de l'oncogenèse.

Nous avons également montré que le même gène pouvait être un facteur de bon et de mauvais pronostic selon le type de tumeur. En effet, L'expression de *PLAGL1* est de **bon pronostic** dans les GIST, de mauvais pronostic dans les LMS et les US. Alors que la méthylation des CpG corrélés à l'expression de *PLAGL1* est de mauvais pronostic dans les LMS et les US.

Dans les sarcomes, *PLAGLI* semblerait avoir deux fonctions : **oncogène et tumeur suppresseur**, en fonction du contexte cellulaire ; ce que certains articles sur *PLAGLI* tendent déjà à montrer. En effet, si le rôle de suppresseur de tumeur est établi pour *PLAGLI* dans les cancers hormono-dépendants comme le sein, le pancréas, l’ovaire ; des articles sur les glioblastomes et les neuroblastomes suggèrent que *PLAGLI* puisse agir comme un oncogène. Le contexte cellulaire pourrait conditionner les voies de signalisation stimulant l’expression de *PLAGLI*. Il est également probable que la détermination du rôle de *PLAGLI* dépende de cofacteurs protéiques spécifiques, interagissant avec *PLAGLI* dans chaque type de cancer.

Dans les LPS, l’analyse effectuée, qu’elle soit sur la corrélation entre l’expression de *PLAGLI* et les facteurs cliniques ou sur la méthylation du promoteur de *PLAGLI* et des facteurs cliniques, n’a pas révélé de rôle pronostic ou diagnostique de *PLAGLI*. Il est probable que *PLAGLI* n’ait aucune fonction dans ce type de cancer ou qu’il y ait une absence de protéine et donc de conséquence de l’expression de l’ARNm sur le phénotype.

Dans les GIST, seul un site de méthylation a pu être relié à la classification de Miettinen mais il ne l’est pas avec l’expression de *PLAGLI*. Il est possible que l’échantillon trop faible de tumeurs (10 dans chaque cohorte) conduise à une mauvaise balance des groupes lors de la comparaison entre la méthylation des CpG et les différents facteurs cliniques. Il paraît donc nécessaire d’augmenter le nombre de GIST à analyser pour pouvoir déterminer si certains CpG sont pronostiques ou diagnostiques.

.2.9 Perspectives

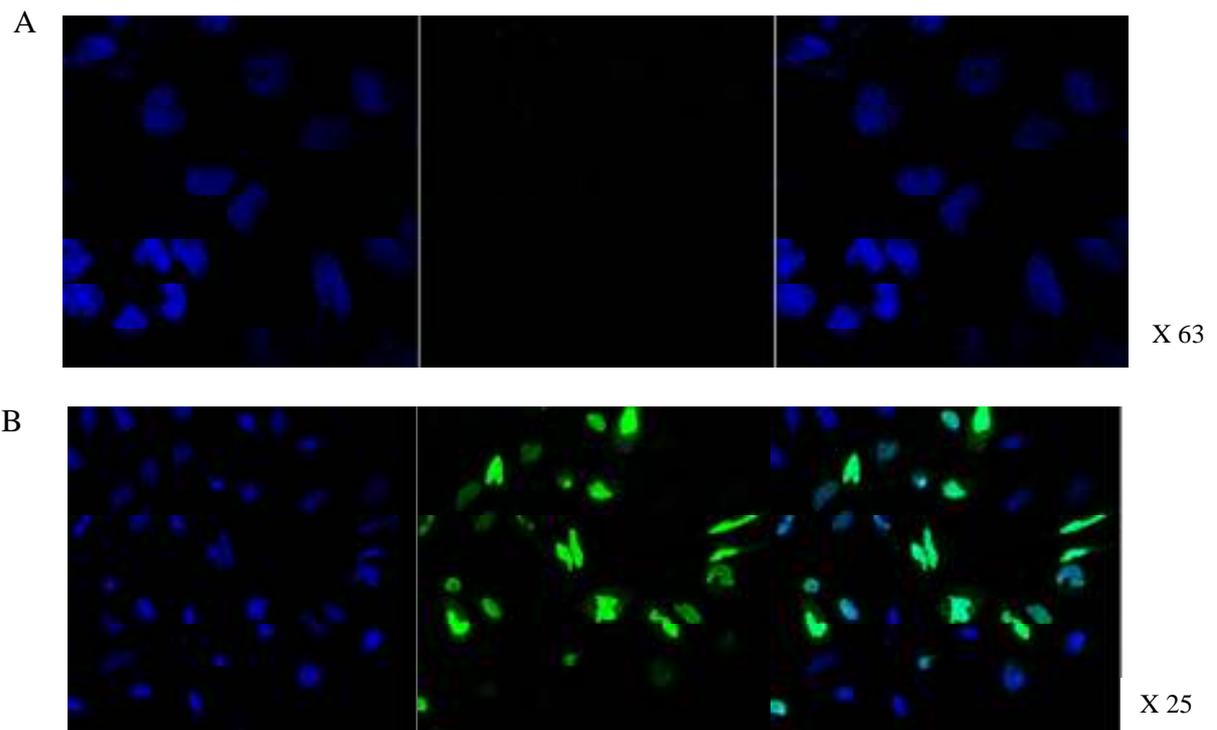
Pour valider ce travail, il serait intéressant de faire une étude similaire sur un ou plusieurs **autres types de cancers** comme le cancer du sein et / ou de l’ovaire pour savoir si, comme dans les sarcomes, seuls quelques CpG conditionnent l’expression de *PLAGLI*, si *PLAGLI* peut être utilisé comme facteur clinique et si certains CpG sont pronostiques de l’agressivité ou de la survie dans plusieurs cancers.

D’un point de vue plus fondamental, il serait intéressant d’identifier les facteurs de transcription qui guide l’expression de *PLAGLI* et qui seraient sensibles au niveau de méthylation des CpG corrélés à l’expression ou aux facteurs cliniques.

Par la suite, il semble indispensable de tester l'action des **agents déméthylants** comme la 5 aza-deoxycytidine, (décitabine) utilisée en clinique principalement sur les cancers hématopoïétiques pour tester leurs actions sur des lignées de sarcomes. D'une part, il serait intéressant de connaître l'influence de ces drogues sur la prolifération et l'apoptose, et déterminer si ces traitements sont pertinents dans ce type tumoral. D'autre part, il serait intéressant de vérifier la sensibilité à la méthylation de l'ADN, des facteurs de transcription se fixant aux CpG corrélés à l'expression de *PLAGL1*.

Nous avons déjà testé un agent déméthylant combiné ou non avec un inhibiteur d'histone deacétylase (5AZdC ± TSA) selon différentes cinétiques et à différentes concentrations sur 3 lignées (MFH148, LPS78 et LPS80) sans avoir pu mettre en évidence de déméthylation du promoteur de *PLAGL1* par pyroséquençage. Il est possible que ces lignées soient « réfractaires » à la 5AZdC. Une alternative à l'utilisation d'agents déméthylants serait d'utiliser des siRNA dirigés contre les DNMT1 et 3a / b afin de bloquer la méthylation de l'ADN.

**Deuxième partie : régulation post-
transcriptionnelle de PLAGL1, dans les
sarcomes**



**Figure 102 : immunofluorescence sur HeLa non transfectées (A) ou transfectées avec pRK7-ZAC (B).
Marquage de PLAGL1 en vert et des noyaux au Hoechst 33258**

.1 Résultats de la partie : régulation post-transcriptionnelle

.1.1 Rappel sur l'expression du transcrit de *PLAGL1* dans les sarcomes

Comme abordé dans la première partie des résultats, les analyses par puces transcriptomiques ont permis de mettre en évidence une expression variable de l'ARNm de *PLAGL1* dans quatre types de sarcomes et quatre lignées de sarcomes.

A ce jour, peu d'articles ont été publiés sur l'expression de la protéine PLAGL1 endogène dans différents types cellulaires. L'un des objectifs de notre travail a donc été de caractériser l'expression protéique de PLAGL1 dans les sarcomes : dans des tumeurs et dans des lignées afin de mettre en évidence d'éventuels mécanismes de régulation post-transcriptionnelle épigénétique.

Pour cela, le niveau d'expression de l'ARNm de *PLAGL1*, quantifié par puce Affymetrix ou Agilent, a été confirmé par qRT-PCR dans les quatre lignées de sarcomes et dans les cellules HeLa. Ces cellules ont été utilisées pour les expériences de surexpression en raison de leur grande facilité et efficacité de transfection. Ces qRT-PCR ont montré que les cellules MFH128 exprimaient fortement l'ARNm de *PLAGL1*, contrairement aux cellules MFH148 qui ne l'expriment pas du tout. Les cellules LPS78 et LPS80 expriment l'ARNm de *PLAGL1* à un niveau similaire et intermédiaire par rapport aux cellules MFH128 et MFH148.

.1.2 Expression de la protéine PLAGL1

.1.2.1 Lignées

Une fois l'expression du transcrit *PLAGL1* caractérisée, l'expression de la protéine PLAGL1 a été évaluée par immunofluorescence et western-blot.

L'immunofluorescence a tout d'abord été mise au point sur des cellules HeLa, transfectées avec pRK7-ZAC, un plasmide codant pour la forme longue de PLAGL1 (Figure 102).

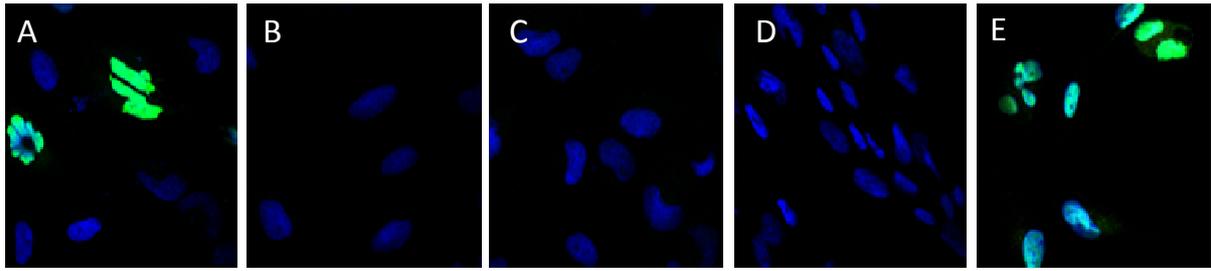


Figure 103: expression de la protéine PLAGL1 (en vert) dans les cellules : A : MFH128, B : MFH148, C : LPS78, D : LPS80, E : HeLa transfectées avec pRK7-ZAC, noyaux des cellules marqués au Hoechst 33258 (en bleu)

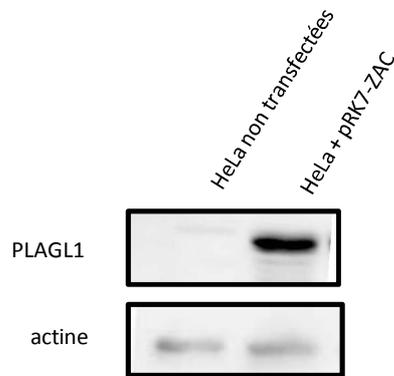


Figure 104 : validation de l'anticorps anti-PLAGL1 en western blot, expression de la protéine PLAGL1 dans les cellules HeLa transfectées avec pRK7-ZAC et dans les cellules HeLa non transfectées (marquage de l'actine a été utilisé comme témoin de charge)

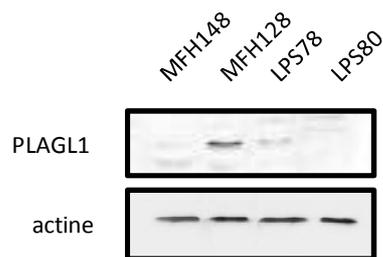


Figure 105: expression de la protéine PLAGL1 dans les lignées de sarcomes visualisée par western-blot

Plusieurs anticorps ont été testés, mais seulement deux anticorps (un monoclonal de souris de chez ABnova et un polyclonal de chez Santa Cruz, qui reconnaissent tous deux les deux isoformes de la protéine PLAGL1) ont permis de mettre en évidence une expression nucléaire et homogène de la protéine PLAGL1.

Une fois l'immunofluorescence mise au point, l'expression de la protéine PLAGL1 a été recherchée dans les quatre lignées de sarcomes. Comme on peut l'observer sur la Figure 103, les cellules MFH128 expriment la protéine PLAGL1 dans le noyau, à un niveau quasi-identique à celui des cellules HeLa transfectées avec la construction pRK7-ZAC. Ceci est en accord avec les résultats obtenus lors de l'approche transcriptomique de PLAGL1 dans cette lignée. Les cellules MFH148, qui n'expriment pas l'ARNm de PLAGL1, n'expriment pas la protéine. En revanche, les lignées LPS78 et LPS80 issues de liposarcomes expriment l'ARNm de PLAGL1, mais aucune expression de la protéine PLAGL1 n'a pu être constatée en immunofluorescence.

Pour confirmer les données d'immunofluorescence, le niveau d'expression de la protéine PLAGL1 a également été évalué par western-blot. Dans la littérature aucun western blot n'avait été fait sur la protéine PLAGL1 endogène. La mise en évidence de l'expression de PLAGL1 avait exclusivement été faite sur cellules transfectées avec un plasmide codant pour PLAGL1 couplé à une étiquette.

Le but de notre travail étant de mettre en évidence l'expression endogène de PLAGL1 dans des lignées de sarcomes, il a fallu dans un premier temps mettre au point les conditions du western-blot.

Cette mise au point, comme celle de l'immunofluorescence, a été faite sur des cellules HeLa transfectées avec pRK7-ZAC. L'utilisation d'un anticorps à façon (Eurogentec) a permis de mettre en évidence la présence d'une bande à 50 kDa correspondant à la protéine PLAGL1 dans les cellules HeLa transfectées avec pRK7-ZAC, bande absente dans les cellules HeLa non transfectées (Figure 104).

Une fois la technique de western-blot mise au point, l'expression de la protéine PLAGL1 a été recherchée dans les lignées de sarcomes, les cellules HeLa transfectées avec pRK7-PLAGL1 ont servi de contrôle positif. Les résultats obtenus en Western-blot ont confirmé ceux de l'immunofluorescence : seule la lignée MFH128 exprime la protéine PLAGL1 à 50 kDa. L'utilisation d'un anticorps différent pour l'immunofluorescence et le western blot permet d'écarter l'hypothèse selon laquelle la protéine PLAGL1 ne serait pas visualisable dans les lignées de sarcomes LPS78 ou LPS80 car tronquée dans la partie reconnue par l'anticorps.

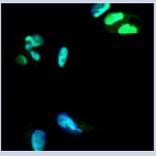
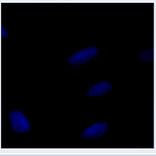
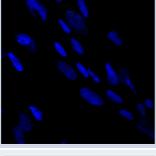
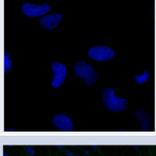
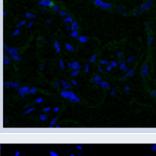
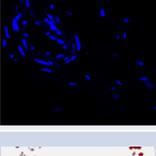
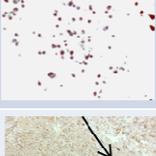
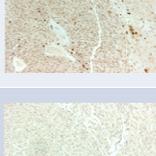
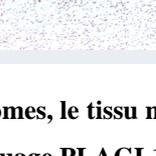
	CGH array	microarray	qPCR	immuno
MFH128	2.179	12.63	15	
MFH148	0.93	2.7	26.5	
LPS78	4.652	7.97	18.9	
LPS80	1.797	8.32	19.1	
Tissu mammaire			21.7	
Tissu placentaire			16.7	
HeLa transfectées avec pRK7-ZAC			8	
GIST			15	
GIST			17.6	
LPS	1.41	13.66		

Tableau 36 : tableau récapitulatif des données obtenues sur les lignées de sarcomes, le tissu mammaire et placentaire, ainsi que sur deux GIST et un LPS. Immunofluorescence : marquage PLAGL1 en vert et marquage des noyaux en bleu- Hoeschst. Immunocytochimie : marquage PLAGL1 en DAB

De façon inattendue, on observe que les LPS78 et 80, bien qu'exprimant l'ARNm de PLAGL1, n'expriment pas la protéine.

.1.2.2 Tumeurs

Afin de connaître le niveau d'expression de la protéine PLAGL1 dans des tumeurs de patients, l'immunohistochimie sur coupes de paraffine a été mise au point. Pour cela, l'anticorps utilisé pour les immunocytofluorescences a été testé sur des cellules HeLa transfectées avec pRK7-ZAC et incluses en paraffine (Tableau 36). L'anticorps Santa Cruz utilisé en immunofluorescence a permis de visualiser l'expression de la protéine PLAGL1 dans les cellules HeLa transfectées et incluses en paraffine.

Ensuite, cet anticorps a été testé sur des tissus inclus en paraffine décrits dans la littérature comme exprimant l'ARNm de PLAGL1 en très grande quantité, et donc susceptibles d'exprimer la protéine. Ainsi une immunofluorescence a été réalisée sur du tissu mammaire et du tissu placentaire (cliniscentes) inclus en paraffine. De façon surprenante, les immunofluorescences réalisées sur ces deux tissus n'ont pas permis de visualiser la protéine PLAGL1 (Tableau 36). Toutefois, il paraît nécessaire d'effectuer ces immunofluorescences sur plusieurs échantillons de tissus mammaires et placentaires avant de tirer des conclusions quant à l'expression de la protéine PLAGL1 dans ces tissus. En effet, il est possible que dans le placenta, l'expression de la protéine soit variable en fonction du stade de développement de ce tissu.

Des immunomarquages ont été effectués sur deux GIST et un liposarcome pour lesquels le niveau d'expression de l'ARNm de PLAGL1 était connu. Ainsi, nous avons choisi un LPS qui exprimait fortement l'ARNm de PLAGL1, deux GIST exprimant, l'un faiblement et l'autre fortement l'ARNm de PLAGL1 (Tableau 36).

De façon inattendue, le LPS exprimant fortement l'ARNm n'exprimait pas la protéine et le seul GIST pour lequel une expression protéique a pu être constatée était celui qui exprimait faiblement l'ARNm de PLAGL1. Pour ces tumeurs, et à l'image de ce qui a été observé pour les lignées, il n'y a pas de corrélation entre les profils transcriptomique et protéique.

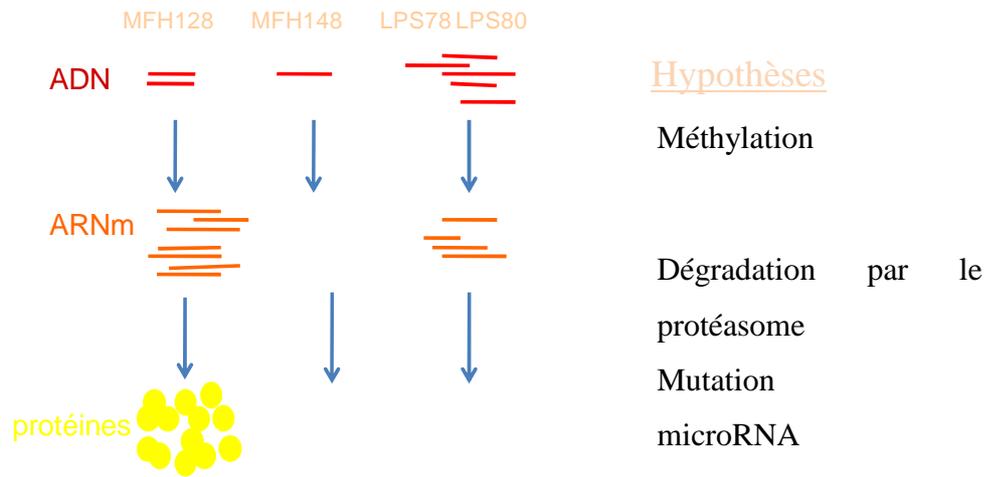


Figure 106: schéma récapitulatif et hypothèses de travail

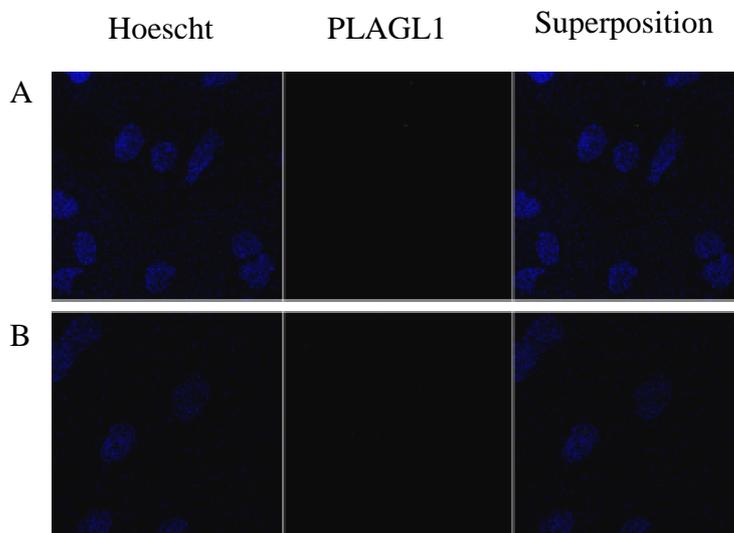


Figure 107 : immunofluorescence, marquage de PLAGL1 dans les LPS78 (A) non traitées et dans les LPS78 traitées 24h au MG132 à 5µM (B)

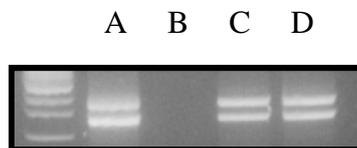


Figure 108: visualisation des produits de RT-PCR sur gel d'agarose mettant en évidence l'amplification des deux isoformes d'ARNm de PLAGL1 dans les MFH128 (A), les MFH148 (B), les LPS78 (C) et les LPS80 (D)

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence d'expression protéique de PLAGL1 dans les cellules ou les tumeurs exprimant le transcrite de PLAGL1 :

- une mauvaise conformation de la protéine qui engendrerait une dégradation de la protéine par le protéasome,
- Une mutation qui modifierait la demi-vie de la protéine,
- Une inhibition de la traduction par des microRNA.

.1.3 Hypothèses pouvant expliquer la dichotomie des profils transcriptomiques et protéiques de PLAGL1 dans les sarcomes

.1.3.1 Hypothèse d'une modification de la demi-vie de PLAGL1

Si des altérations de la méthylation du promoteur de *PLAGL1* expliquent l'inadéquation entre les profils génomique et transcriptomique des lignées et des tumeurs, nous avons exploré plusieurs hypothèses pour comprendre l'inadéquation entre le profil transcriptomique et protéique des lignées et des tumeurs (récapitulées sur la Figure 106).

Pour déterminer si l'absence de protéine PLAGL1 était due à une dégradation de la protéine par le protéasome, les cellules LPS78 et LPS80 (exprimant l'ARNm de *PLAGL1*) ont donc été traitées 24 h avec 1, 5 ou 25 μ M de MG132 (un inhibiteur du protéasome). L'expression de PLAGL1 a ensuite été recherchée par immunofluorescence. Mais, aucune augmentation du signal n'a pu être constatée. Une dégradation par le protéasome n'expliquerait donc pas l'absence de protéine PLAGL1 dans les LPS78 et 80 (Figure 107).

.1.3.2 Hypothèse de mutations de PLAGL1

La deuxième hypothèse pour expliquer l'absence de protéine PLAGL1 dans les lignées LPS78 et 80 est une mutation dans les séquences reconnues par les anticorps utilisés aussi bien en immunofluorescence qu'en western-blot. Pour savoir si la protéine PLAGL1 est mutée dans les lignées de sarcomes, la séquence de l'ARNm a été clonée grâce au système TOPO-TA (Invitrogen) puis séquencée.

Les ARNm de chaque lignée : MFH128, MFH148, LPS78, LPS80, ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces choisies en amont du codon START et en aval du codon STOP de la

```

PLAGL1 native 1 mathspqkshqcacaktefnrkdhlknhlqthdnpkmafgeecgkkyntmlgykrhlaalhaassgdltcgvcalelgstevlldhikahaekppsgtk
PLAGL1 mutée 1 .....

PLAGL1 native 101 ekkhqcdhcercfytrkdvrhlvvhgtgckdficqfcaqrfgkrkdhltrhtkkthsqelmkeslqtgdllstfhtispsfqlkaaalppfplgasaqngl
PLAGL1 mutée 101 .....

PLAGL1 native 201 asslpaevhsitlspeqaqaqpmqplpeslaslhpsvsvsgspppplpnhkynttstsysplaslpkadtkgfcnislfedlpqepqspqklnpgfdla
PLAGL1 mutée 201 .....

PLAGL1 native 301 kgmagkvnlpkelpadavnltipasldlspllgfwqlpppatqntfgnstlalgpgeslphrlscigqqqqepplamgtvslgqlplppiphvfsagtgs
PLAGL1 mutée 301 .....

PLAGL1 native 401 ailphfhafr
PLAGL1 mutée 401 .....

```

Figure 109: comparaison des séquences protéiques de PLAGL1 sauvage et de PLAGL1 traduite dans les LPS78

séquence codante de *PLAGL1*. Le contrôle sur gel, a permis de confirmer que la lignée MFH148 n'exprimait absolument pas l'ARNm de *PLAGL1*. En revanche, deux amplicons ont pu être obtenus pour les trois autres lignées (Figure 108). Les deux amplicons correspondent aux deux isoformes d'ARNm permettant la traduction des formes courte et longue de la protéine *PLAGL1*. Les deux amplicons obtenus ont donc été clonés en TOPO TA et séquencés avec des amorces universelles s'hybridant sur le plasmide.

Il apparaît que les lignées MFH128 et LPS80 ne présentent aucune mutation de l'ARNm de *PLAGL1*. En revanche, la lignée LPS78 présente une mutation ponctuelle d'une cytosine en thymine aboutissant à la synthèse d'une valine à la place d'une alanine en position 220 de la forme courte et 272 de la forme longue de la protéine *PLAGL1*. Cette mutation est retrouvée dans les 3 clones séquencés pour chaque forme protéique, courte et longue, de *PLAGL1* (Figure 109). Cette substitution reste un acide aminé non polaire et ne semble pas expliquer l'absence de protéine en immunofluorescence et western-blot.

L'absence de la protéine *PLAGL1* dans les cellules LPS78 et LPS80 ne peut être expliquée ni par une demi-vie courte de la protéine, ni par une mauvaise conformation engendrant sa dégradation par le protéasome, ni par une mutation qui empêcherait une détection par les anticorps utilisés en immunofluorescence ou en western blot.

Pour écarter totalement cette dernière hypothèse, il aurait été nécessaire de cloner l'ADNc de la forme mutée en aval d'un promoteur fort et de transfecter des cellules HeLa par exemple pour voir si la protéine même mutée pouvait s'exprimer.

.1.4 Identification de microRNA pouvant potentiellement cibler *PLAGL1*

La dernière hypothèse envisagée était celle d'une régulation par des microRNA. La surexpression de certains microRNA dans les lignées LPS78 et LPS80 pourrait expliquer pourquoi la protéine ne s'exprime pas alors qu'il y a transcription de l'ARNm de *PLAGL1*. A l'inverse une sous-expression de ces microRNA serait responsable de la forte expression protéique de *PLAGL1* dans les MFH128.

Comme nous avons pu le récapituler plus haut, (Tableau 36 et Figure 106) les données obtenues dans les lignées MFH128 et MFH148 montrent une corrélation entre l'expression transcriptionnelle et protéique de *PLAGL1*. En revanche, dans les lignées LPS78 et LPS80, on observe une expression de l'ARNm de *PLAGL1* mais pas de la protéine.

Les microRNA sont de courtes séquences ARN qui se fixent aux régions 3'UTR de leurs gènes cibles et entraînent une inhibition de leur traduction. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris de transfecter des cellules exprimant *PLAGL1* avec des microRNA. Si ces microRNA régulent *PLAGL1* alors l'expression de la protéine *PLAGL1* devrait diminuer.

Or, à ce jour, près d'un millier de microRNA ont été identifiés dans les cellules humaines. Il a donc fallu identifier les microRNA pouvant cibler *PLAGL1*. Pour cela, nous avons interrogé plusieurs bases de données en libre accès sur internet pour savoir s'il existait des microRNA qui pouvaient, en théorie, se fixer à la région 3'UTR de *PLAGL1*. En effet, plusieurs bases de données prédisent la fixation de microRNA aux régions 3'UTR en utilisant chacun un algorithme propre. Le recoupement des informations provenant de plusieurs bases de données permet de fiabiliser les résultats obtenus.

Ainsi, une analyse bioinformatique sur différentes bases de données a donc été réalisée à l'aide de plusieurs logiciels :

- PicTar et DIANA qui reposent sur une étude thermodynamique pour déterminer les microRNA pouvant se lier au 3'UTR d'intérêt (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) (Grün et al., 2005), (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>) (Kiriakidou et al., 2004).

miRNA	Séquence	base de données	autres cibles	locus
hsa-miR 015a	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	target scan, Pic Tar	PLAG1	13q14.3
hsa-miR 015b	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	target scan, Pic Tar	PLAG1	3q26.1
hsa-miR 016-1	UAGCAGCACGUAAAUUUGGCG	target scan, Pic Tar	PLAG1	3q26.1, 13q14.3
hsa-miR 023a	AUCACAUUGCCAGGGAUUUC	miRBase, Pic Tar, target scan		19p13.12
hsa-miR 023b	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC	Pic Tar		9q22.32
hsa-miR 034a	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	miRBase, Pic Tar	PLAG1	1p36.22
hsa-miR 034b*	UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG	miRBase	PLAG1	11q23.1
hsa-miR 96	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU	Pic Tar, target scan		7q32.2
hsa-miR 101	UACAGUACUGUGAUAAACUGAA	miRBase		9p24.1, 1p31.3
hsa-miR 103	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	miRDB		5q35.1
hsa-miR 105	UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU	miRDB		Xq28
hsa-miR 107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	miRDB		10q23.31
hsa-miR 125a	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	Pic Tar, target scan	PLAGL2	19q13.33
hsa-miR 125b	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA	Pic Tar, target scan	PLAGL2	11q24.1
hsa-miR 128-a	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	miRDB, DIANA		2q21.3
hsa-miR 128-b		DIANA		
hsa-miR 135a	UAUGGCUUUUUAUUCUUAUGUGA	miRBase, miRDB		3p21.1
hsa-miR 135b	UAUGGCUUUUCAUUCUUAUGUGA	miRDB, miRBase		1q31.1
hsa-miR 137	UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	miRBase		1p21.3
hsa-miR 146b 5p	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU	miRBase		10q24.32
hsa-mir 154	UAGGUUAUCCGUGUUGCCUUCG	miRDB		14q32.31
hsa-miR 181a	ACCAUCGACCGUGAUUGUACC	miRBase	PLAG1	
hsa-mir 195	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	target scan, Pic Tar		17p13.1
hsa-miR 216b	AAAUCUCUGCAGGCAAUGUGA	miRBase		2p16.1
hsa-miR 222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	miRBase		11Xp3
hsa-miR 297	AUGUAUGUGUGCAUGUGCAUG	miRBase		chromosome 4
hsa-miR 351		target scan		
hsa-miR 424	CAGCAGCAAUUCUUGUUUUGAA	target scan	PLAG1	Xq26.3
hsa-miR 490-3p	CAACCUGGAGGACUCCAUGCUG	miRDB		7q33
hsa-miR 497	CAGCAGCACACUGUGGUUUGU	target scan		17p13.1
hsa-miR 503	UAGCAGCGGGAACAGUUCUGCAG	target scan	PLAG1	Xq26.3
hsa-miR 510	UACUCAGGAGAGUGGCAAUCAC	miRBase		Xq27.3
hsa-miR 520d 3p	AAAGUGCUUCUCUUUGGUGGGU	miRBase		19q13.41
hsa-miR 523	GAACGCGCUUCCCUAUAGAGGGU	miRBase		19q13.41
hsa-miR 573	CUGAAGUGAUGUGUAACUGAUCAG	miRBase, miRDB		4p15.2
hsa-miR 578	CUUCUUGUGCUCUAGGAUUGU	miRDB		4q32.3
hsa-miR 587	UUUCCAUAAGGUGAUGAGUCAC	DIANA		6q21
hsa-miR 606	AAACUCUGAAAAUCAAGAU	DIANA		10q22.2
hsa-miR 618	AAACUCUACUUGUCCUUCUGAGU	miRBase		12q21.31
hsa-miR 633	CUAAUAGUAUCUACCACAAUAAA	miRBase		17q23.2
hsa-miR 801	GAUUGCUCUGCGUGCGGAAUCGAC	miRBase		1p35.3
hsa-miR 888*	GACUGACACCUCUUUGGGUGAA	miRBase		Xq27.3
hsa-miR 1254	AGCCUGGAAGCUGGAGCCUGCAGU	miRDB		10q21.3
hsa-mir-1271	CUUGGCACCUAGCAAGCACUCA	target scan		5q35.1
hsa-miR 1279	UCAUAUUGCUUCUUUCU	miRDB (60)		chromosome 12

Tableau 37 : récapitulatif des microRNA pouvant théoriquement se fixer au 3'UTR de *PLAGL1* obtenu auprès de plusieurs bases de données, leur séquence, leurs cibles connues faisant partie de la famille de *PLAGL1* et leur locus dans le génome humain

- miRBase (anciennement Sanger), repose sur une étude de la complémentarité pour déterminer les microRNA pouvant se lier à la région 3'UTR d'intérêt (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>) (Griffiths-Jones et al., 2008)
- TargetScan, repose sur une étude de complémentarité du « seed » pour déterminer les microRNA pouvant se lier à la région 3'UTR d'intérêt (<http://www.targetscan.org/>) (Lewis et al., 2003)

Cette analyse a permis de prédire la fixation de 45 microRNA sur la région 3'UTR de *PLAGL1*. Parmi ces microRNA potentiels, quatre ont été choisis d'après leur récurrence dans les bases de données et leurs cibles déjà connues (ont été sélectionnés des microRNA qui ciblaient également les deux autres gènes de la famille de *PLAGL1* : *PLAG1* et *PLAGL2*) : **les microRNA 15a, 15b, 16, et 424**, qui de façon intéressante appartiennent tous à la même famille de microRNA : mir 15/107.

.1.5 Test en cytométrie

.1.5.1 Principe du test

Pour savoir si l'expression protéique de *PLAGL1* est régulée par ces microRNA, nous avons développé un test en cytométrie permettant de visualiser la capacité de fixation d'un microRNA donné sur un ARNm.

Classiquement, pour tester la fixation de microRNA à la région 3'UTR d'un gène, le fragment 3'UTR est cloné en aval de la luciférase. La transfection des cellules exprimant le ou les microRNA avec cette construction ou le plasmide contenant uniquement la luciférase peut avoir deux issues.

- Soit le(s) microRNA(s) ne s'est pas fixé alors il n'y a pas de différence de luminescence entre les cellules exprimant la luciférase seule et celles exprimant la luciférase couplée au 3'UTR.

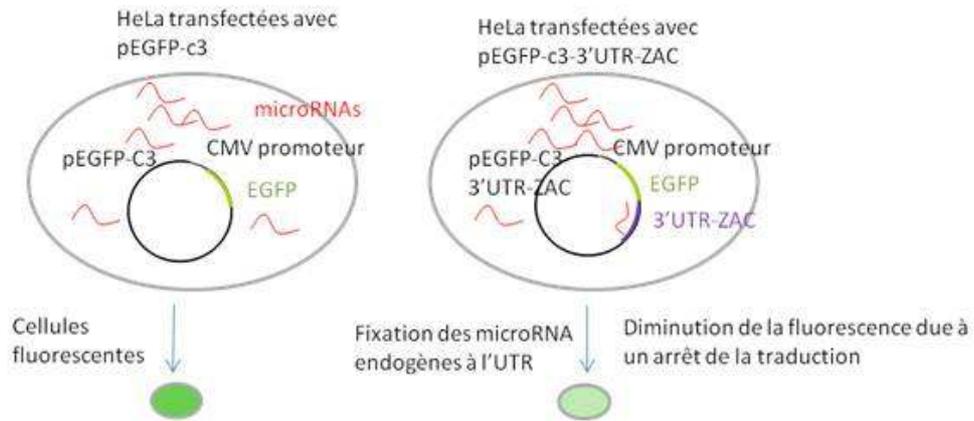


Figure 110 : principe du test en cytométrie permettant de quantifier la capacité de certains microRNA à se fixer au 3'UTR de *PLAGL1*

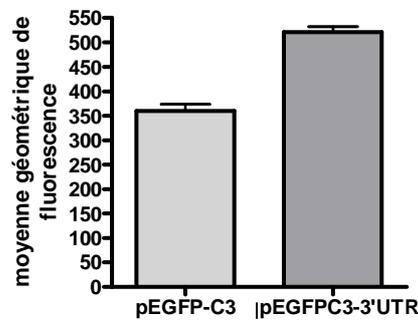


Figure 111 : différence de fluorescence de l'EGFP après ajout du 3'UTR de *PLAGL1*

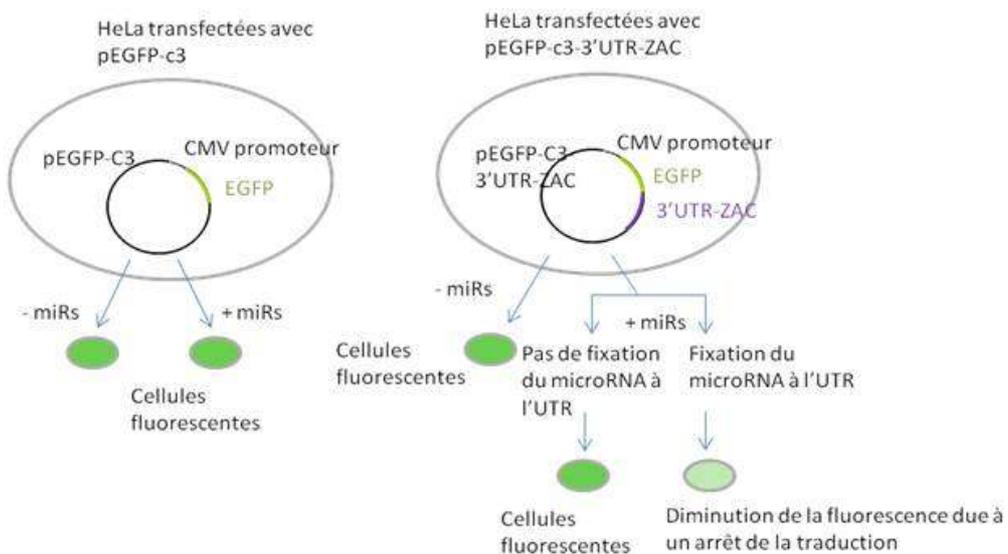


Figure 112 : principe du test en cytométrie permettant de quantifier la capacité de certains microRNA à se fixer au 3'UTR de *PLAGL1* avec ajout des microRNA d'intérêt

- soit le(s) microRNA(s) s'est fixé au 3'UTR et il y a une diminution de la luciférase dans les cellules exprimant la luciférase couplée au 3'UTR et celles exprimant la luciférase seule (Boutla et al., 2003).

Ce test a été adapté pour une analyse en cytométrie de flux. En effet, le 3'UTR de *PLAGL1* a été cloné en aval de l'EGFP dans le plasmide pEGFP-C3. Les cellules HeLa ont été choisies pour effectuer ce test car elles se transfectent facilement et présentent un fort taux de transfection de l'ordre de 90 % avec l'agent de transfection Exgen (Euromedex) (Figure 110).

D'après les bases de données et la littérature, les cellules HeLa expriment les microRNA 15a, 15b et 16. Nous les avons donc transfectées avec pEGFP-C3 ou pEGFP-3'UTR-*PLAGL1* pour savoir si les microRNA 15a, 15b et 16 endogènes étaient capables d'inhiber la traduction de l'EGFP dans les cellules transfectées avec pEGFP-*PLAGL1*.

La fluorescence a été analysée 24 h après les transfections. La fluorescence émise par l'EGFP est bien plus importante dans les cellules exprimant l'EGFP-3'UTR par rapport aux cellules exprimant l'EGFP seule (Figure 111). Ceci peut s'expliquer par l'action généralement stabilisatrice des régions 3'UTR. En effet, la séquence en 3'UTR des ARNm assure la stabilité de l'ARNm grâce à la présence de la queue poly(A). De plus, l'utilisation de plasmide ayant un promoteur fort induit une forte quantité de protéine formée, la quantité de microRNA endogène doit être très importante pour que l'effet soit observable.

Nous avons donc choisi de comparer la fluorescence de cellules co-transfectées avec pEGFP-3'UTR-*PLAGL1* et des siRNA contrôle négatif aux cellules co-transfectées avec pEGFP-3'UTR-*PLAGL1* et le(s) microRNA(s) à tester, pour s'affranchir de ce biais (Figure 112).

.1.5.2 Quantification de l'efficacité et de la spécificité de transfection des microRNA

Les microRNA utilisés pour le test en cytométrie sont des microRNA double brins, commercialisés par la société Qiagen, identiques aux microRNA matures endogènes. Afin de vérifier l'efficacité de transfection ainsi que l'augmentation spécifique de la quantité des microRNA transfectés dans les cellules, des qRT-PCR selon le protocole miScript qPCR system de Qiagen, ont été réalisées.

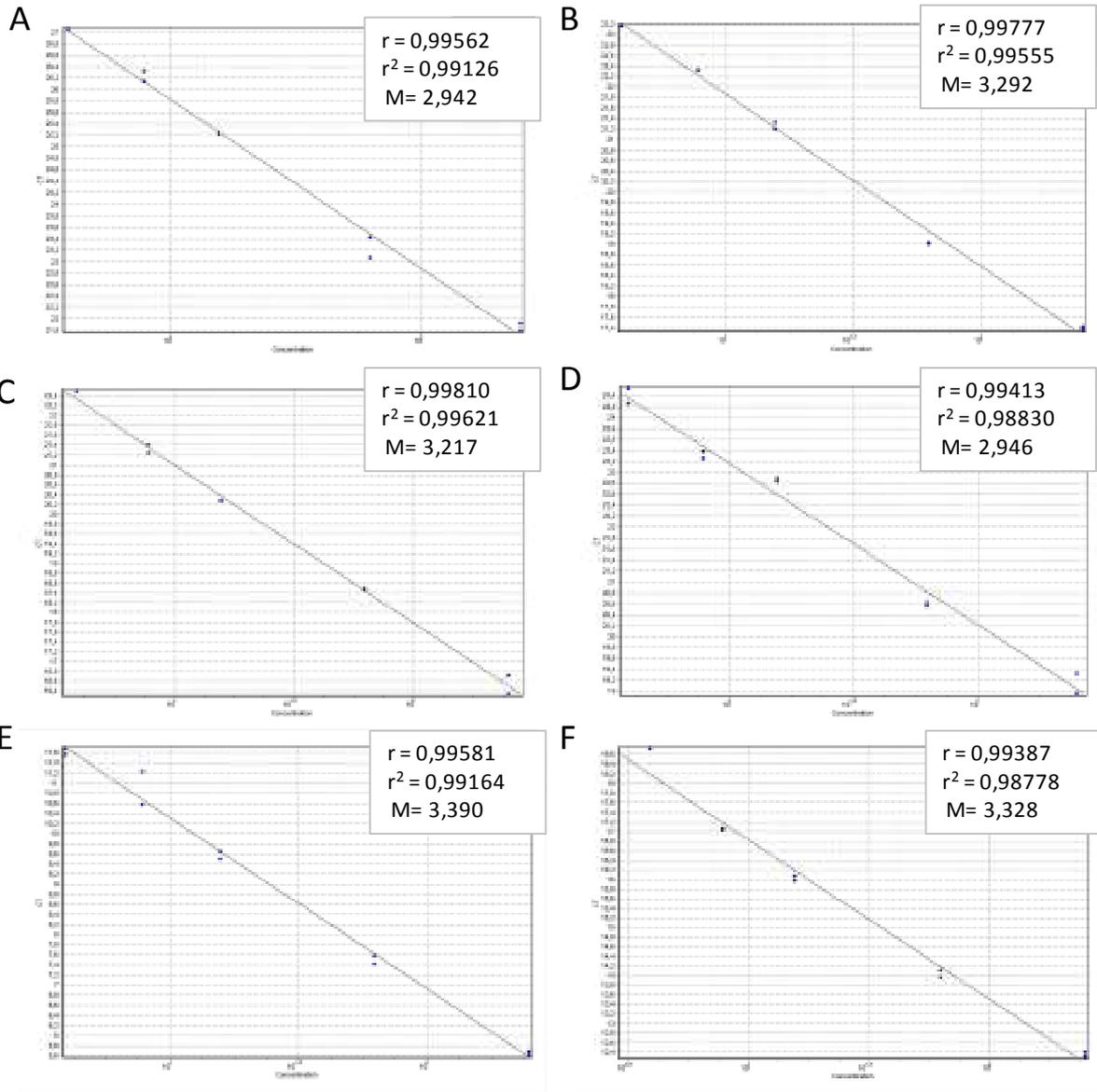


Figure 113 : calcul de l'efficacité des amorces utilisées pour la qRT-PCR des microRNA, A : amorce mir15a, B : amorce mir15b, C : amorce mir16, D : amorce 424, E : amorce rnu1a1, F : amorce snoRA73a

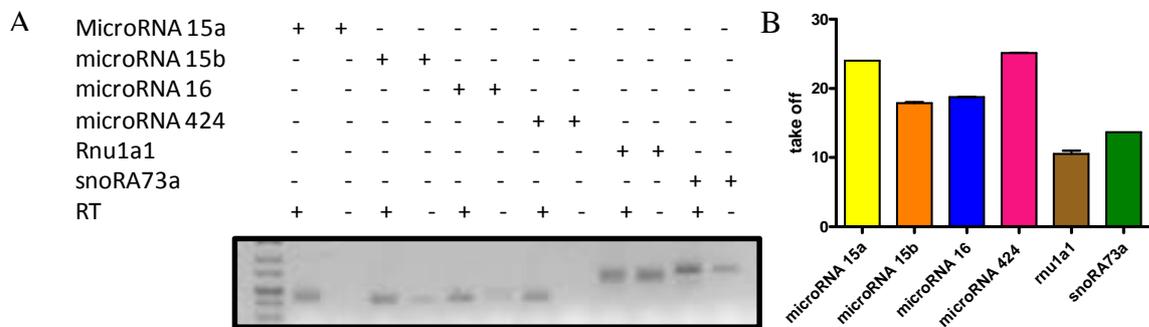


Figure 114 : A : gel de migration des produits de qPCR sur microRNA, B : quantification des microRNA dans les HeLa par qRT-PCR

Dans un premier temps, nous avons quantifié, par qRT-PCR, l'expression endogène des microRNA 15a, 15b, 16 et 424 dans les cellules HeLa ainsi que deux petits ARN : RNU1a1 et snoRA73a qui ont servi de gènes de ménages (préconisés par Qiagen). Des dilutions en série d'ADNc de cellules HeLa ont également été faites afin de vérifier la qualité des amorces de qRT-PCR.

Les efficacités des amorces utilisées pour les qRT-PCR sur les microRNA sont reportées sur la Figure 113. Les standards étant des dilutions de 10 en 10, la pente théorique (M) de cette courbe est de -3,3. Selon des recommandations publiées (van der Velden et al., 2003), des pentes comprises entre -3 et -3,9 avec un $r^2 > 0,95$ sont acceptables. Un $r^2 > 0,98$ permet cependant de s'assurer d'une meilleure précision (Branford et al., 2006). Les six amorces utilisées sont donc tout à fait acceptables.

Une fois les amorces validées pour la quantification des microRNA par qRT-PCR, le niveau d'expression des microRNA dans les cellules HeLa a été quantifié. Les 4 microRNA et les 2 gènes de ménage ont été amplifiés par qRT-PCR afin de connaître le niveau basal de leur expression.

L'observation de la température de fusion (melt) et la réalisation d'un gel d'agarose après l'amplification par PCR a permis de vérifier qu'un seul produit avait été amplifié (Figure 114). La taille des micro-ARN a également pu être vérifiée. En effet, un micro-ARN fait environ 25 nucléotides, mais chaque micro-ARN amplifié a une taille de 100 pb, due à l'ajout de la queue polyT et du « tag » lors de la transcription inverse (cf. Figure 49). La présence de produit dans les puits « -RT », pour lesquels la transcription inverse n'a pas été faite, indique la présence d'ADN résiduel mais le « take off » (équivalent du Ct) de ces contrôles se situe entre 30-35, ce qui n'a pas de conséquence sur la validité des résultats obtenus.

Ainsi, on obtient dans les cellules HeLa, une répartition des quantités de micro-ARN endogènes suivante : miR15b>miR16>>miR15a>miR424.

Les cellules HeLa ont été transfectées 24 h avec 5 nM de microRNA. Après extraction et transcription inverse, la quantité de chaque microRNA a été évaluée par qRT-PCR. Pour chaque microRNA spécifique de *PLAGL1* transfecté, les quatre microRNA d'intérêt ont été

quantifiés, afin de vérifier la spécificité de détection des amorces. Parallèlement, les petits ARN RNU1a1 et snoRA73a ont été quantifiés et ont servi de gènes de ménage.

La transfection des cellules HeLa avec le microRNA 15a induit une augmentation d'un facteur 349,71 de la quantité de ce même microRNA (par rapport aux cellules transfectées avec un siRNA CTL) ; le microRNA 15b une augmentation d'un facteur 315,17 ; le microRNA 16 une augmentation d'un facteur 103,97 ; le microRNA 424 une augmentation d'un facteur 588,13. La quantité des autres microRNA ne varie pas (Tableau 36).

Ces expériences ont permis de mettre en évidence l'augmentation spécifique de la quantité d'un microRNA donné après sa transfection dans les cellules HeLa.

.1.5.3 Effet des microRNA sur l'expression de l'EGFP par leur fixation au 3'UTR de PLAGL1

Pour étudier la capacité de fixation des microRNA au 3'UTR de *PLAGL1*, le test en cytométrie décrit ci-dessous a été réalisé.

Ce test en cytométrie consiste à co-transfecter pEGFP-3'UTR-*PLAGL1* et un des microRNA potentiel. La fluorescence des cellules transfectées avec cette construction et un microRNA donné, est mesurée en cytométrie. Si un microRNA se fixe au 3'UTR de *PLAGL1*, une diminution de la fluorescence due à l'inhibition de la traduction de l'EGFP sera observée par rapport aux cellules transfectées avec des siRNA contrôles. La fluorescence des cellules a été mesurée après 24 h de transfection avec 5, 10, 20 et 30 nM de microRNA. Un contrôle supplémentaire a également été effectué, consistant à co-transfecter les cellules HeLa avec le vecteur pEGFP-C3 et un microRNA donné pour vérifier que l'effet sur la fluorescence était bien dû à la fixation du microRNA au 3'UTR et non à un effet indirect pouvant résulter de la fixation du microRNA sur l'ARNm d'une protéine influençant l'expression de l'EGFP ou sur l'ARNm de l'EGFP.

Les quatre concentrations de microRNA testées ne diminuent pas la fluorescence des cellules HeLa transfectées avec pEGFP-C3, et cela quelque soit le microRNA transfecté (Figure 116). Donc les microRNA ne se fixent pas au transcrite de l'*EGFP* ou à celui d'un gène pouvant réguler l'expression de l'EGFP.

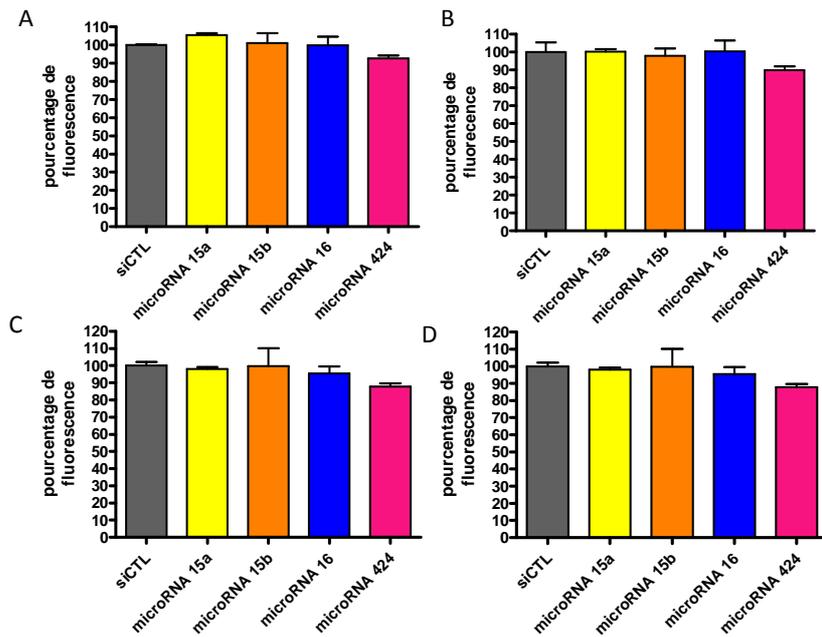


Figure 116: moyenne de fluorescence des HeLa transfectées avec pEGFP-C3 et un microRNA à 5 nM (A), 10 nM (B), 20 nM (C), et 30 nM (D) pendant 24 h

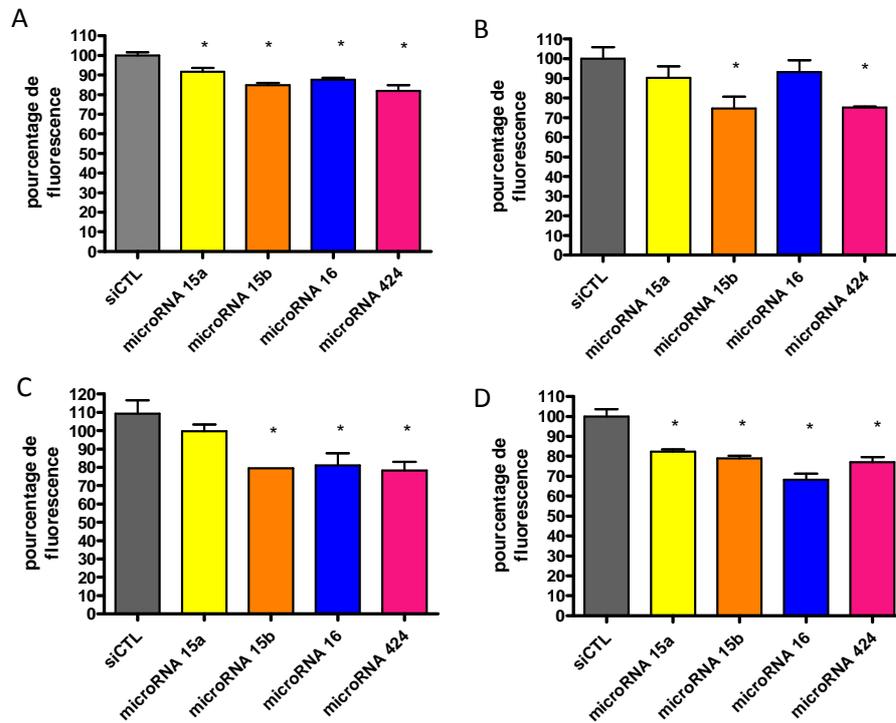


Figure 117: variations de fluorescence observées dans les HeLa co-transfectées avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1 et un microRNA à 5 nM (A), 10 nM (B), 20 nM (C), et 30 nM (D) pendant 24 h.

Comme rapporté sur la Figure 117, les cellules HeLa transfectées avec l'EGFP-3'UTR-*PLAGL1* présentent une diminution significative de la fluorescence pour :

- les microRNA 15a (p-value = 0,0292), 15b (p-value = 0,0012), 16 (p-value = 0,0027) et 424 (p-value = 0,0054) à 5 nM,
- les microRNA 15b (p-value = 0,0386) et 424 (p-value = 0,0450) à 10 nM
- les microRNA 15b (p-value = 0,050), 16 (p-value = 0,0463) et 424 (p-value = 0,0233) à 20 nM,
- les microRNA 15a (p-value = 0,0099), 15b (p-value = 0,0221), 16 (p-value = 0,0026) et 424 (p-value = 0,0070) à 30 nM.

Ceci montre que ces quatre microRNA se fixent au 3'UTR de *PLAGL1* et sont susceptibles de réguler son expression.

Ce test a également été effectué à 48 et 72 h de transfection. Dans ces conditions, certains microRNA induisaient une diminution de la fluorescence de l'EGFP dans les cellules HeLa transfectées avec le plasmide pEGFP-C3 sans 3'UTR, suggérant que ces microRNA ciblent également des protéines de la machinerie de transcription (non montré).

Nos résultats montrent que les cellules exprimant à la fois l'EGFP-3'UTR *PLAGL1* et les miR15a et 15b, 16 et 424 présentent une diminution significative et spécifique de fluorescence de l'EGFP à 24 h, suggérant que l'expression de *PLAGL1* est régulée *in vitro* au moins par ces quatre microRNA.

Afin de valider nos résultats et prouver que l'effet observé était bien dû à la fixation de ces microRNA au 3'UTR de *PLAGL1* et non à un effet indirect, nous avons réalisé deux nouvelles constructions plasmidiques à partir du pEGFP-3'UTR-*PLAGL1*. En effet, ces quatre microRNA se fixent tous à la même séquence du 3'UTR : la séquence de fixation varie légèrement d'un microRNA à l'autre, mais le « seed » (site déterminant pour l'hybridation du microRNA au 3'UTR) reste le même. Ces microRNA ont deux sites potentiels de fixation au 3'UTR. Nous avons donc délété ces sites de fixation, de façon indépendante ou combinée (Figure 118).

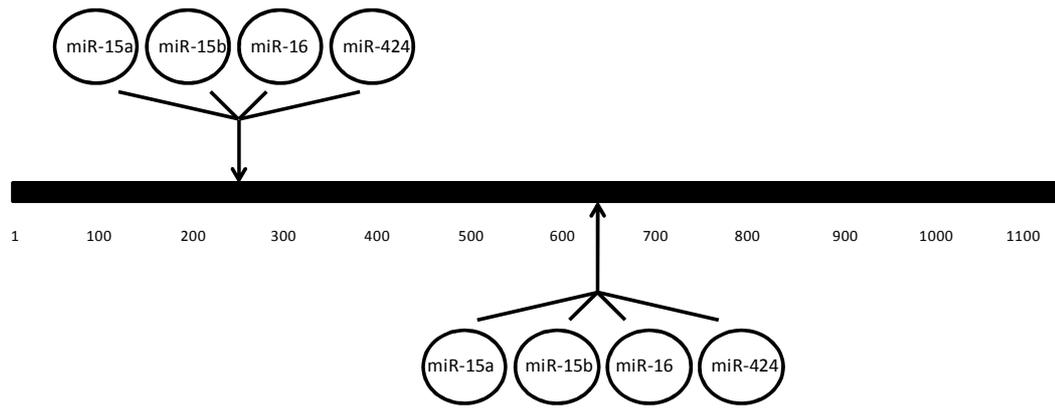


Figure 118: représentation schématique du 3'UTR de PLAGL1 avec la localisation des deux sites de fixation des microRNA d'intérêt

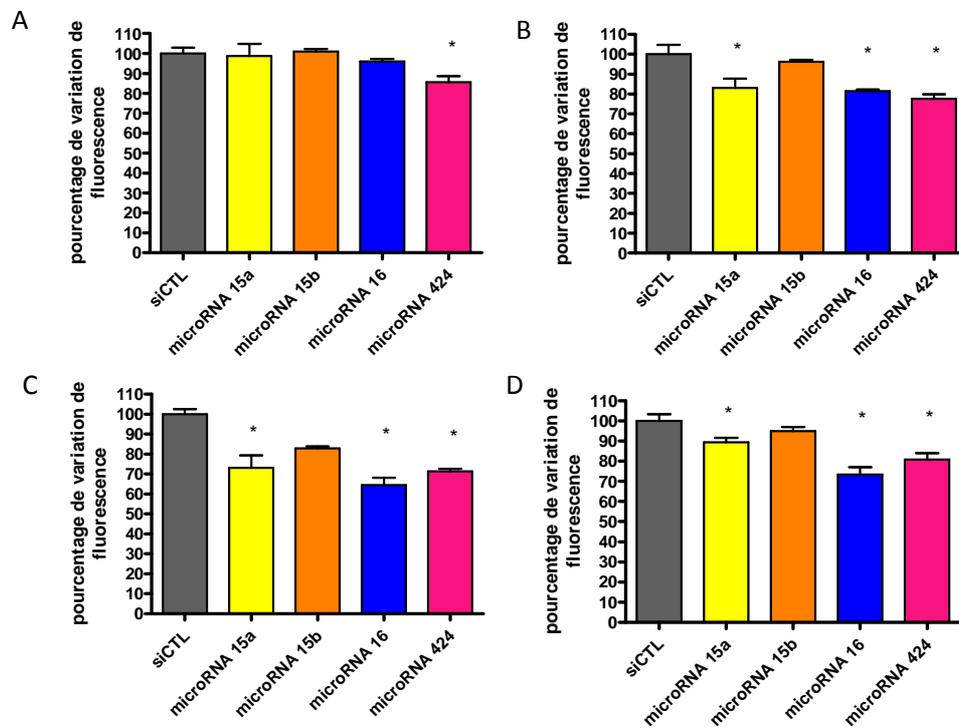


Figure 119 : variations de fluorescence observées dans les HeLa co-transfectées avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir1 et un microRNA à 5 nM (A), 10 nM (B), 20 nM (C), et 30 nM (D) pendant 24 h.

Ainsi nous avons construit :

- pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir1 : délété des 5 paires de bases du « seed » du premier site de fixation : GCUGCUA en 267-271 du 3'UTR de *PLAGL1*,
- pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir2 : délété des 5 paires de bases du « seed » du deuxième site de fixation: GCUGCUA en 872-878 du 3'UTR de *PLAGL1*,
- pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir1+2 : délété des 5 paires de bases du « seed » du premier et du deuxième site de fixation: GCUGCUA en 267-271 et 872-878 du 3'UTR de *PLAGL1*.

L'expérience sur les cellules HeLa transfectées avec le pEGFP-3'UTR-PLAGL1 natif, a montré une diminution de la fluorescence par fixation de certains microRNA sur l'un ou les deux sites de fixation de ces microRNA.

Dans un premier temps, nous avons co-transfectées les cellules HeLa avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir1 et quatre concentrations croissantes de microRNA 15a, 15b, 16 et 424 (Figure 119) :

- la co-transfection des cellules HeLa avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir1 et le microRNA 15a n'induit pas de variation de la fluorescence de l'EGFP à 5 nM, par contre il y a une diminution de la fluorescence à 10 nM, 20 nM et 30 nM.
- la co-transfection des cellules HeLa avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir1 et le microRNA 15b n'induit pas de variation de la fluorescence de l'EGFP.
- la co-transfection des cellules HeLa avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir1 et le microRNA 16 n'induit pas de variation de la fluorescence de l'EGFP à 5 nM, par contre il y a une diminution significative de la fluorescence à 10 nM, 20 nM et 30 nM.
- la co-transfection des cellules HeLa avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir1 et le microRNA 424 induit une diminution significative de la fluorescence de l'EGFP à toutes les concentrations testées.

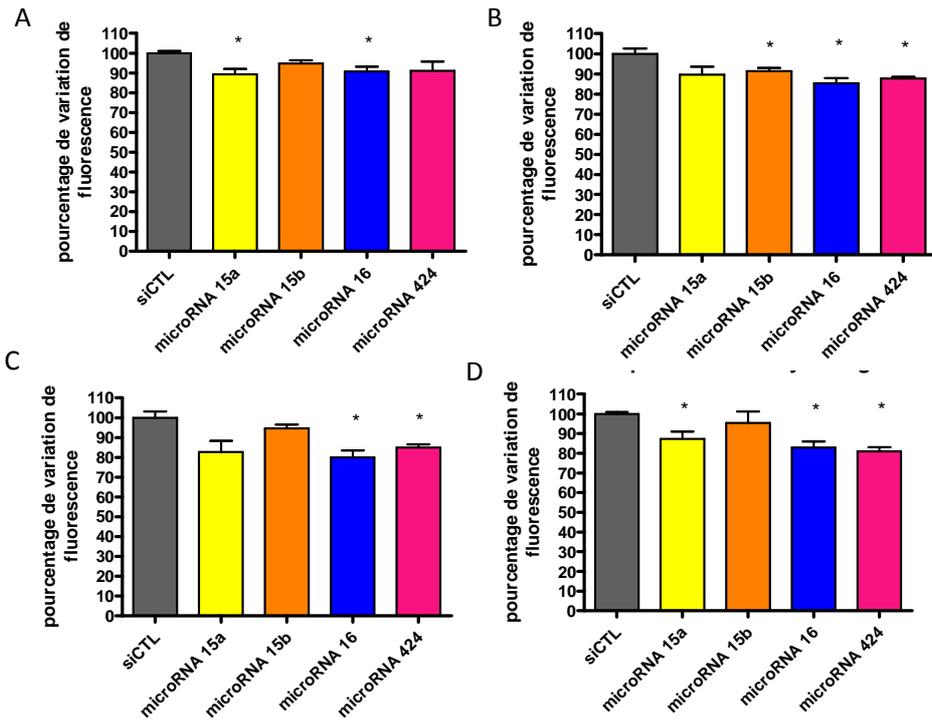


Figure 120 : variations de fluorescence observées dans les HeLa co-transfectées avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir2 et un microRNA à 5 nM (A), 10 nM (B), 20 nM (C), et 30 nM (D) pendant 24 h.

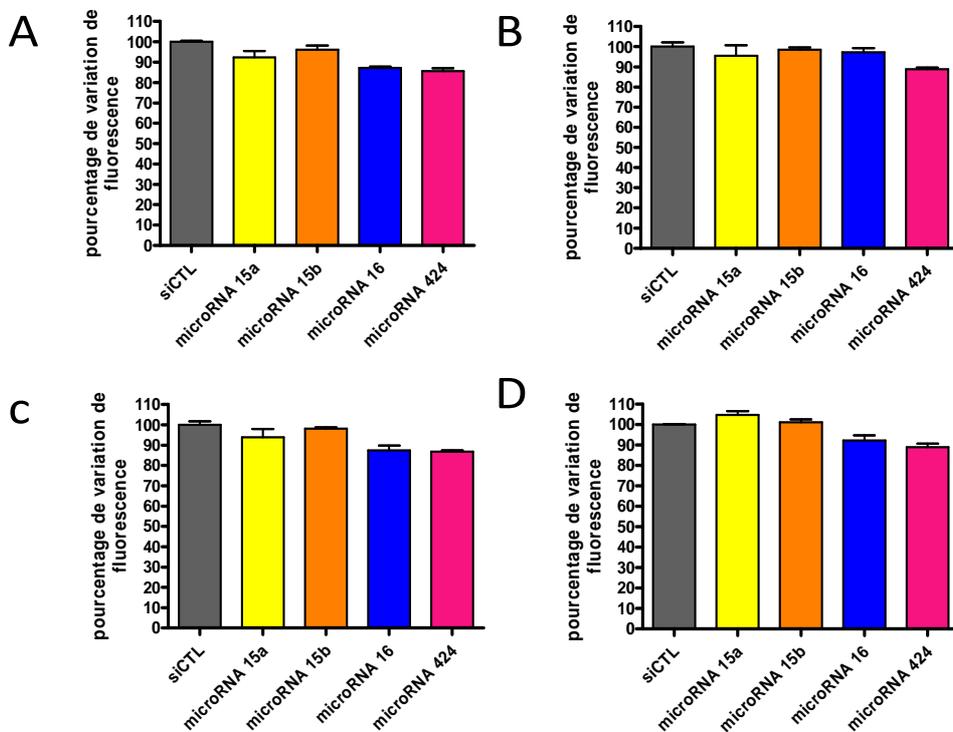


Figure 121 : variations de fluorescence observées dans les HeLa co-transfectées avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1- mir1+2 et un microRNA à 5 nM (A), 10 nM (B), 20 nM (C), et 30 nM (D) pendant 24 h.

Seul le microRNA 424 à 5 nM a permis de diminuer la fluorescence de l'EGFP lorsque le premier seed est délété, ce qui suggère que les deux sites sont nécessaires pour diminuer de façon significative l'expression de l'EGFP par les microRNA 15a, 15b et 16. Pour ces microRNA, de plus fortes concentrations sont nécessaires pour observer une diminution de la fluorescence.

Les cellules HeLa ont été transfectées avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir2 et quatre concentrations différentes de microRNA (Figure 120) :

- la co-transfection des cellules HeLa avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir2 et le microRNA 15a n'induit pas de variation de la fluorescence de l'EGFP à 10 nM et 20 nM, par contre il y a une diminution significative de la fluorescence à 5 nM et 30 nM.
- la co-transfection des cellules HeLa avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir2 et le microRNA 15b n'induit pas de variation de la fluorescence de l'EGFP à 5 nM, 20 nM et 30 nM, par contre il y a une diminution significative de la fluorescence à 10 nM.
- la co-transfection des cellules HeLa avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir2 et le microRNA 16 induit une diminution significative de la fluorescence de l'EGFP à toutes les concentrations testées.
- la co-transfection des cellules HeLa avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir2 et le microRNA 424 induit une diminution significative de la fluorescence de l'EGFP à 10 nM, 20 nM et 30 nM.

La co-transfection des cellules HeLa avec pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir1+2 et les quatre microRNA à 5, 10, 20 et 30 nM n'engendre pas de diminution de la fluorescence (Figure 121).

Les expériences de co-transfection de cellules HeLa avec : pEGFP-C3, pEGFP-3'UTR-PLAGL1, pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir1, pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir2 et pEGFP-3'UTR-PLAGL1-mir1+2, ont été répétées trois fois pour valider les résultats obtenus.

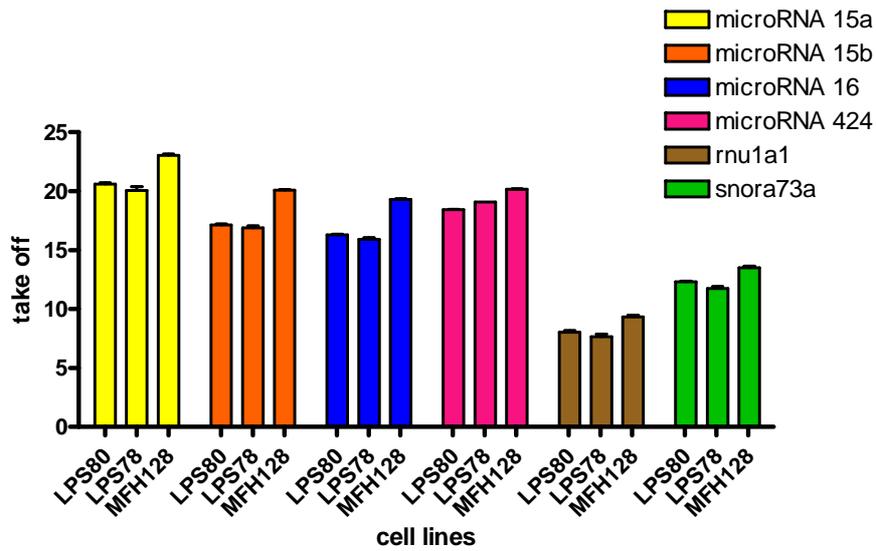


Figure 122: quantification des microRNA d'intérêt et des gènes de ménage dans les lignées MFH128, LPS78 et LPS80 par qRT-PCR

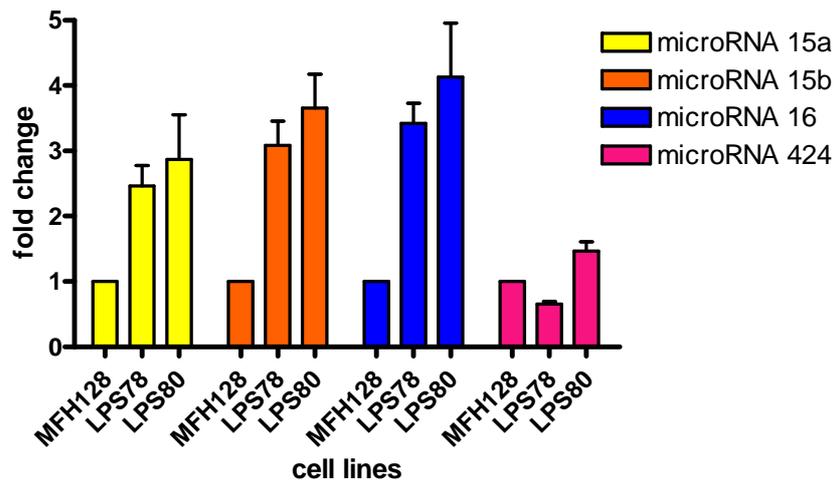


Figure 123 : expression relative des quatre microRNA d'intérêt dans les lignées LPS78 et LPS80 par rapport à la lignée MFH128 (calcul basé sur l'équation $2^{\Delta\Delta Ct}$, cf. Équation 2, page 207) à partir des résultats de la Figure 122

La mutation d'un des deux sites n'empêche pas l'action des microRNA. Ils peuvent toujours diminuer la fluorescence de l'EGFP mais lorsque les deux sites de fixation sont absents, les microRNA n'induisent plus de diminution de la fluorescence prouvant que l'effet des microRNA est bien dû à une action directe de ceux-ci sur le 3'UTR de *PLAGL1*.

Ceci permet donc d'affirmer que les microRNA 15a, 15b, 16 et 424 se fixent spécifiquement au 3'UTR de *PLAGL1* et peuvent réguler l'expression de *PLAGL1*.

.1.6 Expression des microRNA d'intérêt dans les lignées de sarcomes

Nous avons montré précédemment que certains microRNA pouvaient se fixer au 3'UTR de *PLAGL1* et donc potentiellement réguler son expression. Notre objectif a ensuite été de savoir si une telle régulation pouvait expliquer l'absence de protéine *PLAGL1* dans les cellules LPS78 et LPS80 issues de liposarcomes, alors qu'elles expriment l'ARNm. L'expression de ces microRNA dans les trois lignées de sarcomes a donc été quantifiée afin de savoir si ces microRNA étaient sous-exprimés dans les cellules MFH128, qui expriment la protéine *PLAGL1*, et surexprimés dans les cellules LPS78 et 80, qui n'expriment pas la protéine *PLAGL1*.

Les résultats de qRT-PCR (Figure 122) montrent que les gènes de ménages, *RNU1a1* et *snoRA73a*, sont présents dans les lignées LPS78 et LPS80 en quantité quasiment identique avec un « take off » de l'ordre de 8-9 pour le gène *RNU1a* et de l'ordre de 12-13 pour le gène *SNORA73a*. Néanmoins, les take off de ces deux gènes sont plus importants dans la lignée MFH128. Cela peut être dû soit à une expression moindre de ces deux petits ARN soit à un problème de dosage. Cependant, pour le calcul du ratio d'expression des microRNA d'intérêt, leur niveau d'expression dans les trois lignées est normalisé par l'expression des gènes de ménage. On peut donc conclure de cette qRT-PCR que les microRNA 15a, 15b, 16 et 424, sont présents dans les trois lignées de sarcomes à des concentrations variables. D'une manière générale, il apparaît que les lignées LPS80 et LPS78 expriment des quantités de microRNA plus importantes que la lignée MFH128. Le microRNA 15a est 2 à 3 fois plus exprimé dans les cellules LPS78 et LPS80 que dans les MFH128. De même, les microRNA 15b et 16 sont 3 à 4 fois plus exprimés dans les cellules LPS78 et 80

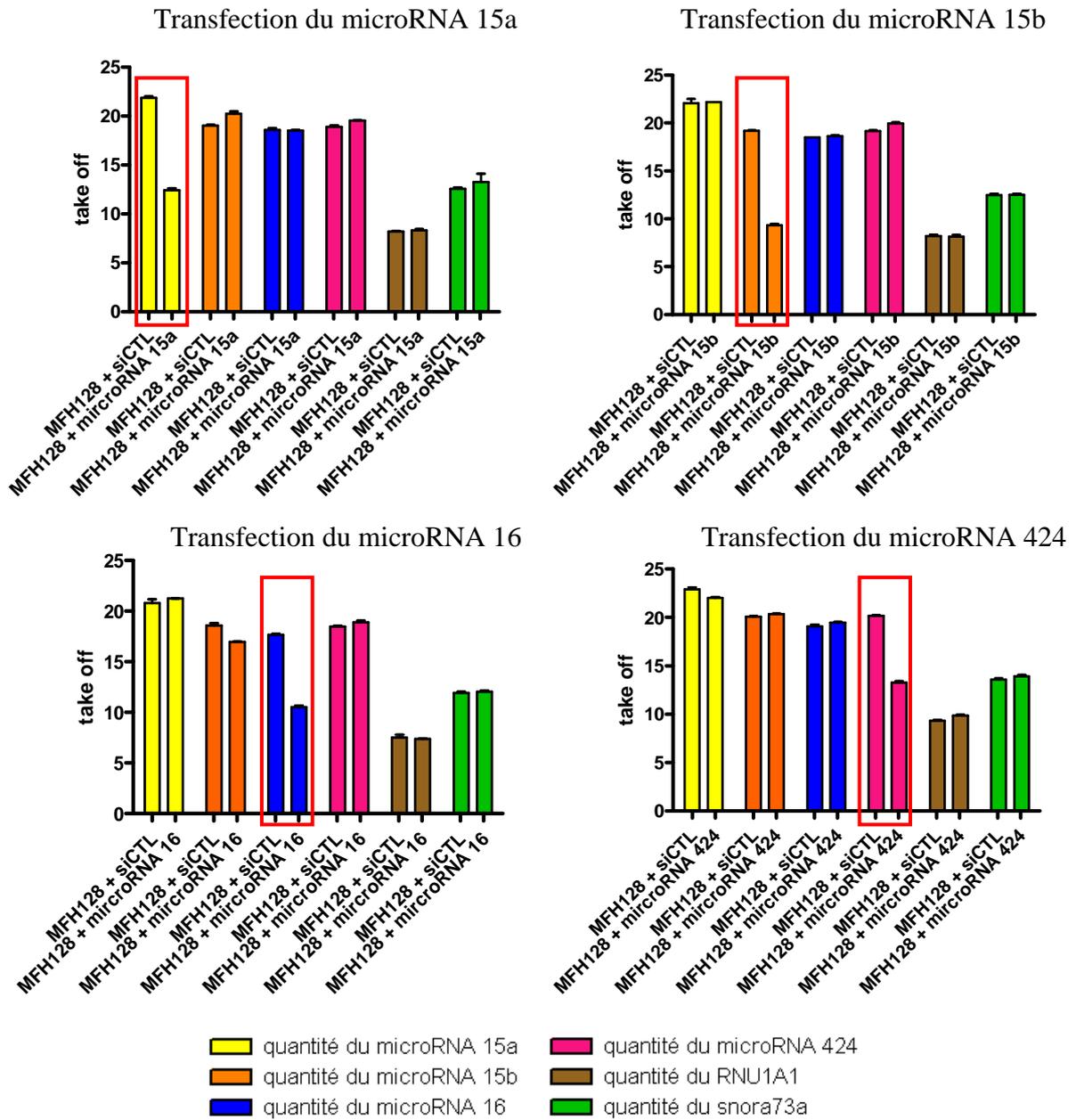


Figure 124: quantifications par qRT-PCR de tous les microRNA suite à la transfection d'un microRNA dans les cellules MFH128 afin de vérifier la spécificité de l'amplification

microRNA transfecté	take off du microRNA après transfection avec le siCTL	take off du microRNA après transfection avec ce même	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
microRNA 15a	21,867 ±0,145 n=3	12,433 ±0,186 n=3	741,34
microRNA 15b	19,2 ±0,058 n=3	9,333 ±0,133 n=3	893,3
microRNA 16	17,667 ±0,088 n=3	10,533 ±0,133 n=3	128,89
microRNA 424	20,167 ±0,067 n=3	13,367 ±0,145 n=3	177,29

Tableau 39 : quantification des microRNA suite à leurs transfection dans les MFH128

que dans les cellules MFH128. En revanche, les trois lignées MFH128, LPS78 et LPS80 expriment les microRNA 424 dans les mêmes proportions (Figure 123).

La forte quantité de micro-ARN retrouvée dans les lignées LPS78 et LPS80 pourrait expliquer l'absence d'expression protéique de PLAGL1.

.1.7 Effet de l'ajout des microRNA sur l'expression de PLAGL1 dans les MFH128

.1.7.1 Validation des microRNA dans les cellules MFH128

L'expression endogène de chaque microRNA ayant été quantifiée dans les lignées, nous avons étudié l'impact de l'ajout de ces microRNA sur l'expression de *PLAGL1* dans les MFH128, seules cellules à exprimer l'ARNm et la protéine PLAGL1.

Si les microRNA se fixent sur le 3'UTR de *PLAGL1*, on doit observer une diminution de l'expression de la protéine.

Dans un premier temps, l'augmentation spécifique du niveau des quatre microRNA, suite à leur transfection dans les cellules MFH128 a été vérifiée par qRT-PCR.

Les microRNA ont été transfectés à 5 nM pendant 24 h comme préconisé par le fournisseur. Les résultats des qRT-PCR montrent que seule la quantité du microRNA transfecté augmente dans les cellules.

En effet, la transfection des cellules MFH128 avec le microRNA 15a induit une augmentation d'un facteur 741,34 de la quantité de ce même microRNA (par rapport aux cellules transfectées avec les siRNA CTL) ; le microRNA 15b une augmentation d'un facteur 893,30 ; le microRNA 16 une augmentation d'un facteur 128,89 ; le microRNA 424 une augmentation d'un facteur 177,29. La quantité des autres microRNA ne varie pas.

La transfection des MFH128 avec les microRNA permet d'augmenter spécifiquement la quantité du microRNA transfecté.

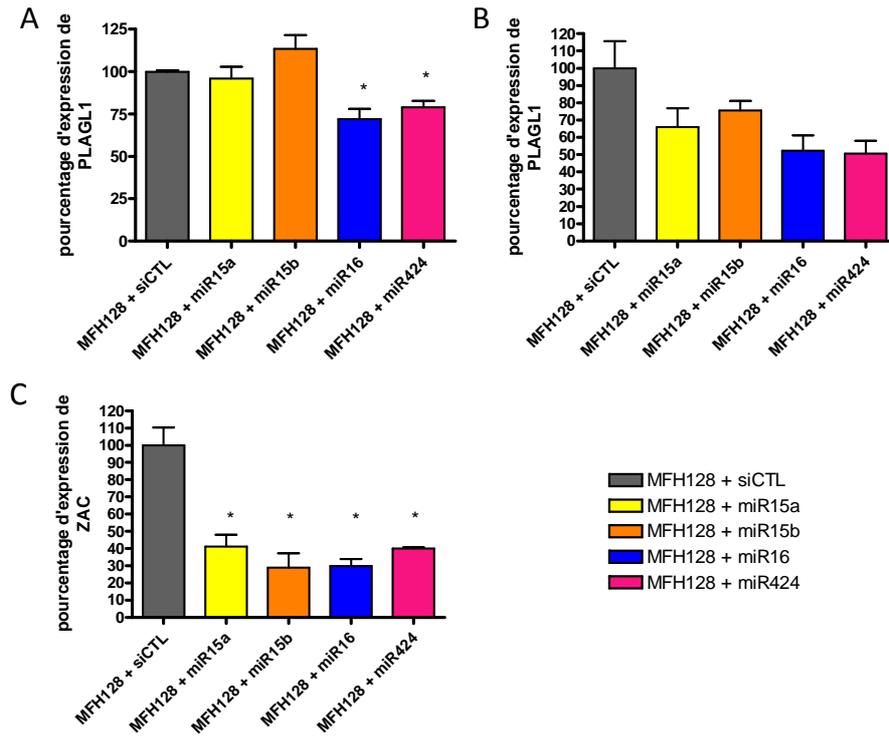


Figure 125: variation de l'expression de la protéine PLAGL1 suite à la transfection des quatre microRNA à 5 nM (A), 10 nM (B) et 20 nM (C) pendant 24 h

.1.7.2 Effet des microRNA sur l'expression du transcrit PLAGL1

Une fois les transfections effectuées et validées, nous avons quantifié par qRT-PCR les variations de quantité d'ARNm de *PLAGL1*. Aucun des quatre microRNA à 5 nM et après 24 h de transfection, n'a permis d'observer de diminution de la quantité de transcrit de *PLAGL1* (non montré).

.1.7.3 Effet des microRNA sur l'expression de la protéine PLAGL1

L'absence de variation de la quantité d'ARNm de *PLAGL1* suite à la transfection des microRNA peut signifier que ces microRNA ne dégradent pas l'ARNm mais le séquestrent dans des sous domaines cytosoliques. En revanche, quelque soit le mécanisme mis en jeu, dégradation ou séquestration de l'ARNm, l'expression de la protéine doit être diminuée. L'expression de la protéine *PLAGL1* a donc été quantifiée dans les cellules MFH128 transfectées avec les quatre microRNA.

Les cellules MFH128 ont été transfectées pendant 24 h avec les microRNA 15a, 15b, 16 et 424 à plusieurs concentrations 5 nM, 10 nM, 20 nM et 30 nM, puis une immunocytofluorescence sur cellules en suspension a été réalisée, enfin la fluorescence a été mesurée par cytométrie de flux.

A 5 nM, les seuls microRNA à permettre une diminution de l'expression de la protéine *PLAGL1* sont les microRNA 16 (p-value = 0,0446) et 424 (p-value = 0,0223). A 10 nM tous les microRNA permettent de diminuer la quantité de protéine *PLAGL1* mais cette diminution n'est jamais significative car la variation entre les triplicats de la condition MFH128 + si CTL est trop importante. A 20 nM, les quatre microRNA permettent de diminuer la quantité de protéine *PLAGL1*, avec le microRNA 15a la p-value est de 0,0155, avec le microRNA 15b la p-value est de 0,0132, avec le microRNA 16 la p-value est de 0,005 et avec le microRNA 424 la p-value est de 0,0047. A 30 nM, les siCTL et les microRNA ont trop d'effets cytotoxiques. Cette expérience a été répétée trois fois pour valider les résultats obtenus.

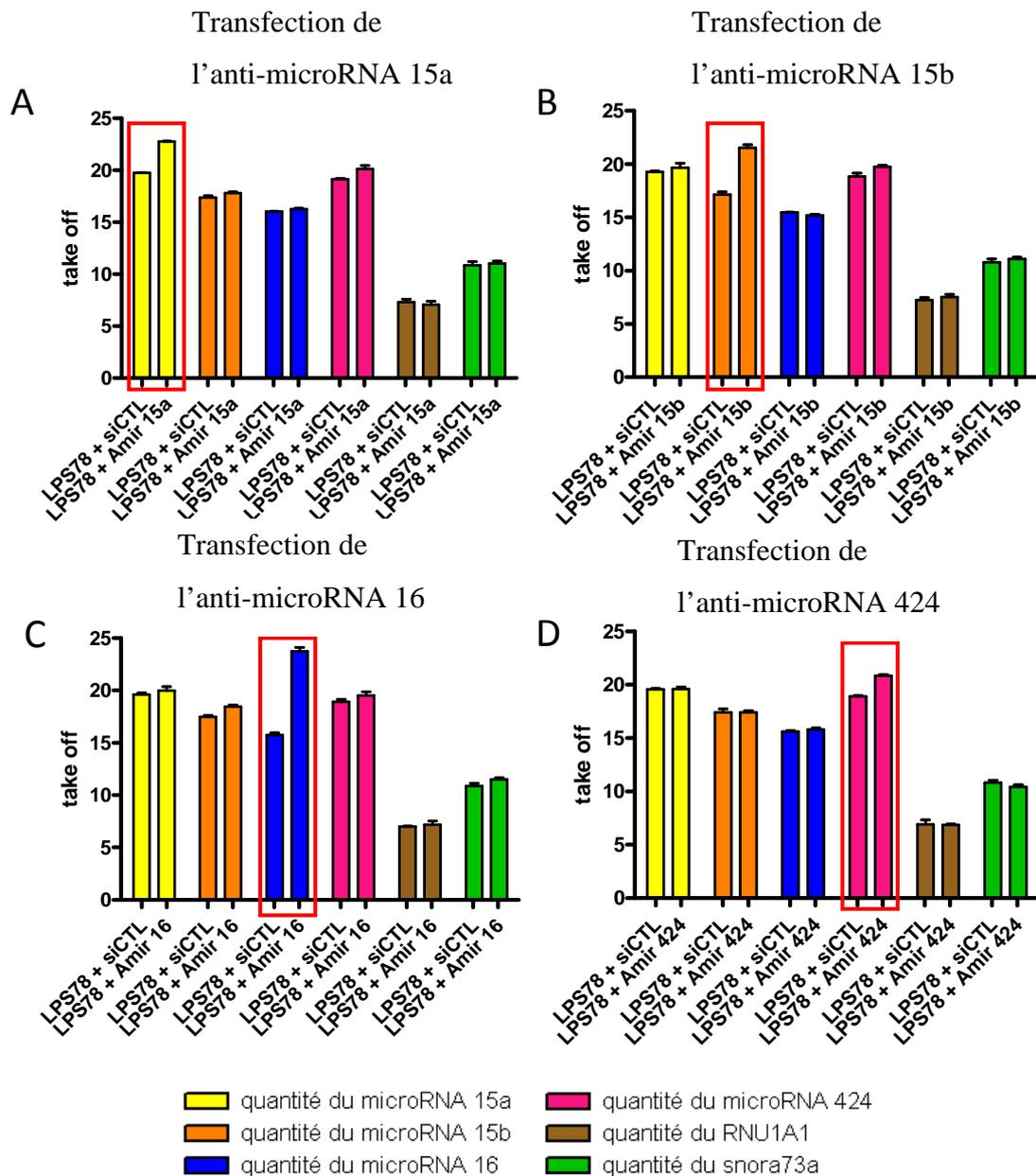


Figure 126 : résultats des qRT-PCR montrant la diminution de la quantité des microRNA suite à la transfection de leur anti-microRNA correspondant dans les cellules LPS78

microRNA transfecté	take off du microRNA après transfection avec le siCTL	take off du microRNA après transfection avec ce même microRNA	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
anti-microRNA 15a	19,733 ± 0,033 n=3	22,767 ± 0,033 n=3	9,65
anti-microRNA 15b	17,133 ± 0,273 n=3	21,533 ± 0,285 n=3	17,63
anti-microRNA 16	15,733 ± 0,218 n=3	23,733 ± 0,371 n=3	222,86
anti-microRNA 424	18,900 ± 0,100 n=3	20,833 ± 0,120 n=3	3,89

Tableau 40 : quantification des microRNA suite à la transfection d'anti-microRNA dans les LPS78

L'ajout des microRNA dans les MFH128 a montré que les microRNA permettaient de diminuer, de façon très significative, l'expression de la protéine PLAGL1. Ceci suggère que PLAGL1 puisse être régulé de manière post-transcriptionnelle par des microRNA dans les sarcomes.

.1.8 Effet de l'utilisation d'anti-microRNA sur l'expression de PLAGL1 dans les LPS78 et LPS80

Afin de compléter cette étude, nous avons étudié l'effet de l'ajout d'anti-microRNA dans les cellules LPS78 et LPS80 sur l'expression du transcrit et de la protéine PLAGL1. Un anti-microRNA est un petit ARN, complémentaire exact d'un microRNA, la liaison de l'anti-microRNA au microRNA cible abolit l'action de ce dernier en induisant sa dégradation.

.1.8.1 Validation des anti-microRNA dans les lignées LPS78 et LPS80

Comme pour les microRNA, une validation de l'efficacité des anti-microRNA à diminuer spécifiquement le niveau des microRNA cibles a été effectuée par qRT-PCR.

Pour cela, les cellules LPS78 et LPS80 ont été transfectées pendant 24 h avec les anti-microRNA à 50 nM comme préconisé par le fournisseur (Qiagen) puis les microRNA d'intérêt ont été quantifiés par qRT-PCR.

Dans les cellules LPS78, les résultats de qRT-PCR montrent que l'anti-microRNA 15a induit une diminution d'un facteur 9,65 de la quantité du microRNA cible (par rapport aux cellules transfectées avec les siRNA CTL) ; l'anti-microRNA 15b : une diminution d'un facteur 17,63 ; l'anti-microRNA 16 : une diminution d'un facteur 222,86 ; l'anti-microRNA 424 : une diminution d'un facteur 3,89. La quantité des autres microRNA ne varie pas (Figure 126, Tableau 40).

La transfection des LPS80 avec l'anti-microRNA 15a induit une diminution d'un facteur 1,52 de la quantité de son microRNA cible ; l'anti-microRNA 15b une diminution d'un facteur 5,59 ; l'anti-microRNA 16 une diminution d'un facteur 61,10 ; l'anti-microRNA 424 une diminution d'un facteur 2,25. La quantité des autres microRNA ne varie pas (Figure 127, Tableau 41).

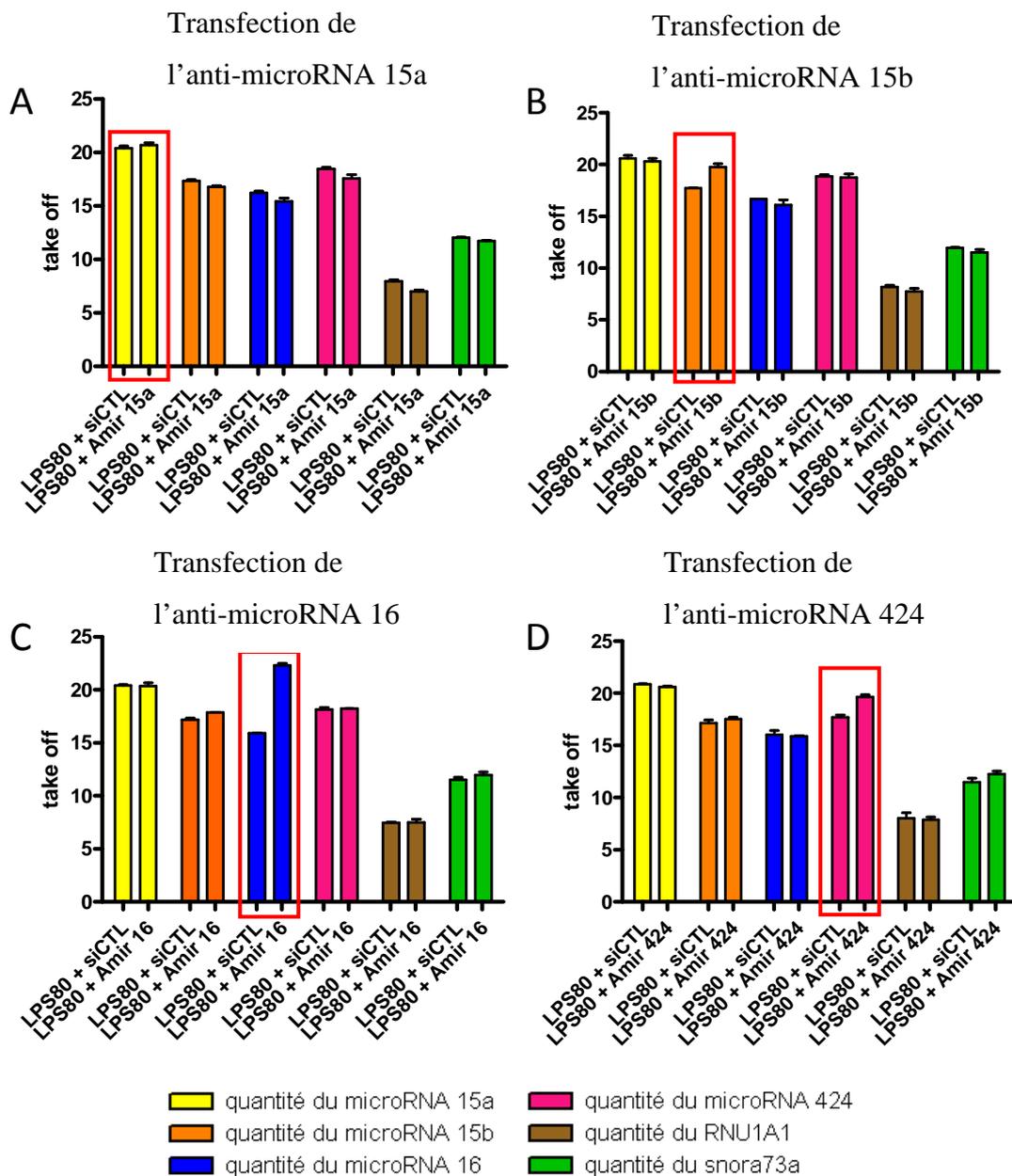


Figure 127: résultats des qRT-PCR montrant la diminution de la quantité des microRNA suite à la transfection de leur anti-microRNA correspondant dans les cellules LPS80

microRNA transfecté	take off du microRNA après transfection avec le siCTL	take off du microRNA après transfection avec ce même microRNA	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
anti-microRNA 15a	20,400 ± 0,208 n=3	20,200 ± 0,033 n=3	1,52
anti-microRNA 15b	17,733 ± 0,033 n=3	19,750 ± 0,350 n=2	5,59
anti-microRNA 16	15,900 ± 0,058 n=3	22,30 ± 0,200 n=3	61,1
anti-microRNA 424	17,70 ± 0,231 n=3	19,667 ± 0,176 n=3	2,25

Tableau 41 : quantification des microRNA suite à la transfection d'anti-microRNA dans les LPS80

Ainsi, tous les anti-microRNA testés permettent de diminuer spécifiquement la quantité de leur microRNA cible, mais dans des proportions très variables puisque la gamme de diminution s'étend de 1,52 à 222,86.

Globalement, l'efficacité des anti-microRNA est meilleure dans les cellules LPS78 que dans les cellules LPS80. Ceci est certainement dû au fait que les cellules LPS78 se transfectent mieux que les cellules LPS80, comme nous l'avons constaté lors des transfections avec des siRNA ou des plasmides.

Les microRNA 16 et 15b sont ceux qui permettent la plus grande diminution de quantité de microRNA mais ce sont également les plus abondants dans ces lignées, il est donc plus facile d'en quantifier la diminution.

Les résultats de qRT-PCR valident l'utilisation des anti-microRNA pour diminuer la quantité de microRNA, dans les lignées LPS78 et LPS80, même si les diminutions observées sont variables.

.1.8.2 Effet des anti-microRNA sur l'expression du transcrit PLAGL1

Après avoir validé l'efficacité des anti-microRNA, leur effet sur l'expression du transcrit PLAGL1 a été mesuré par qRT-PCR. Le niveau d'expression de l'ARNm de *PLAGL1* a été quantifié par qRT-PCR dans les cellules LPS78 et 80 transfectées pendant 24 h avec 50 nM d'anti-microRNA mais aucune variation d'expression de PLAGL1 n'a pu être mise en évidence (non montré).

.1.8.3 Effet des anti-microRNA sur l'expression de la protéine PLAGL1

Nous avons recherché si la transfection des cellules LPS78 et LPS80 avec les anti-microRNA permettait d'augmenter la quantité de protéine PLAGL1 synthétisée en levant l'inhibition de la traduction par les microRNA.

Les cellules LPS78 et LPS80 ont été transfectées pendant 24 h avec les quatre anti-microRNA à deux concentrations 50 nM et 100 nM. Une immunocytofluorescence et une quantification

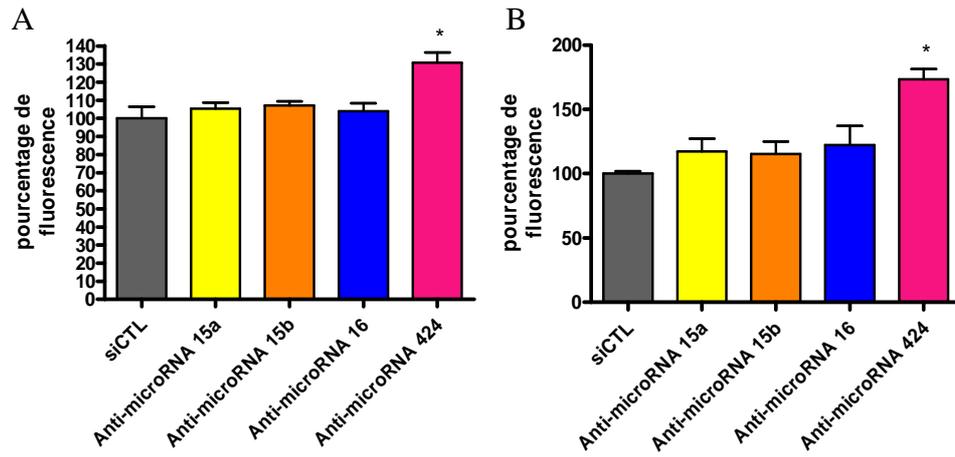


Figure 128: quantification de l'expression protéique de PLAGL1 par cytométrie des LPS78 transfectées avec 50 nM (A) et 100 nM (B) d'anti-miRNA pendant 24 h

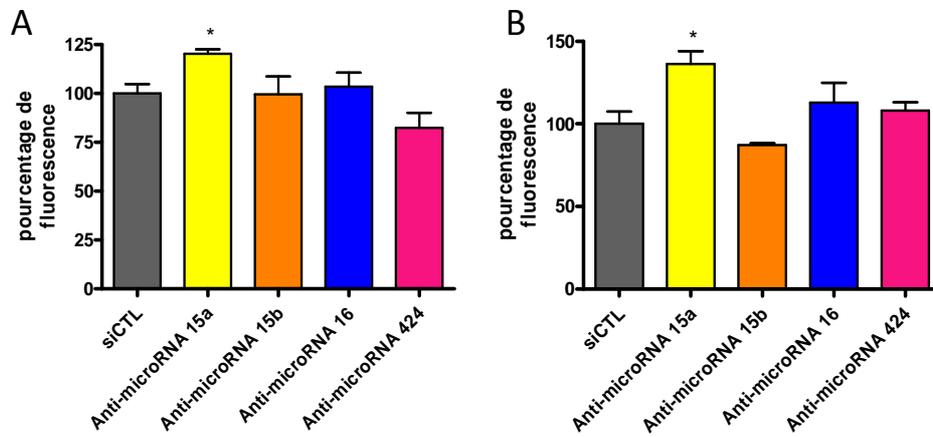


Figure 129: quantification de l'expression protéique de PLAGL1 par cytométrie des LPS80 transfectées avec 50 nM (A) et 100 nM (B) d'anti-miRNA pendant 24 h

de la protéine PLAGL1 par cytométrie de flux (Figure 128 et Figure 129) ont ensuite été réalisées.

Les immunocytofluorescences ont permis de mettre en évidence une augmentation significative de l'expression de PLAGL1 dans les cellules LPS78 transfectées pendant 24 h avec l'anti-microRNA 424 à 50 nM (p value = 0,0448) et 100 nM (p value = 0,0009).

De même, dans les cellules LPS80, une augmentation de l'expression protéique de PLAGL1 après transfection pendant 24 h avec l'anti-microRNA 15a à 50 nM (p value = 0,0188) et à 100 nM (p value = 0,0479) a pu être constatée. Ces expériences ont été faites deux fois afin de fiabiliser les résultats obtenus.

L'absence de variation de la quantité d'ARNm de *PLAGL1* suite à la transfection des anti-microRNA peut signifier que ces microRNA ne dégradent pas l'ARNm mais le séquestrent dans des sous domaines cytosoliques.

Quelque soit le mécanisme mis en jeu, dégradation ou séquestration de l'ARNm, l'expression de la protéine PLAGL1 a été diminuée, dans les cellules LPS80 et LPS78, avec les anti-microRNA 15a et 424 (respectivement).

.2 Etudes fonctionnelles de PLAGL1

.2.1 Effet de la transfection de PLAGL1 dans des cellules HeLa sur l'apoptose

.2.1.1 Mesure de l'apoptose en cytométrie

PLAGL1 est un suppresseur de tumeur ayant pour rôle principal d'arrêter le cycle cellulaire en G0/G1 et de déclencher l'apoptose. Dans un premier temps, nous avons souhaité confirmer le rôle pro-apoptotique de PLAGL1, dans la lignée HeLa. Nous avons donc transfecté les HeLa avec le plasmide pTRACER exprimant la GFP, ou les constructions réalisées au laboratoire :

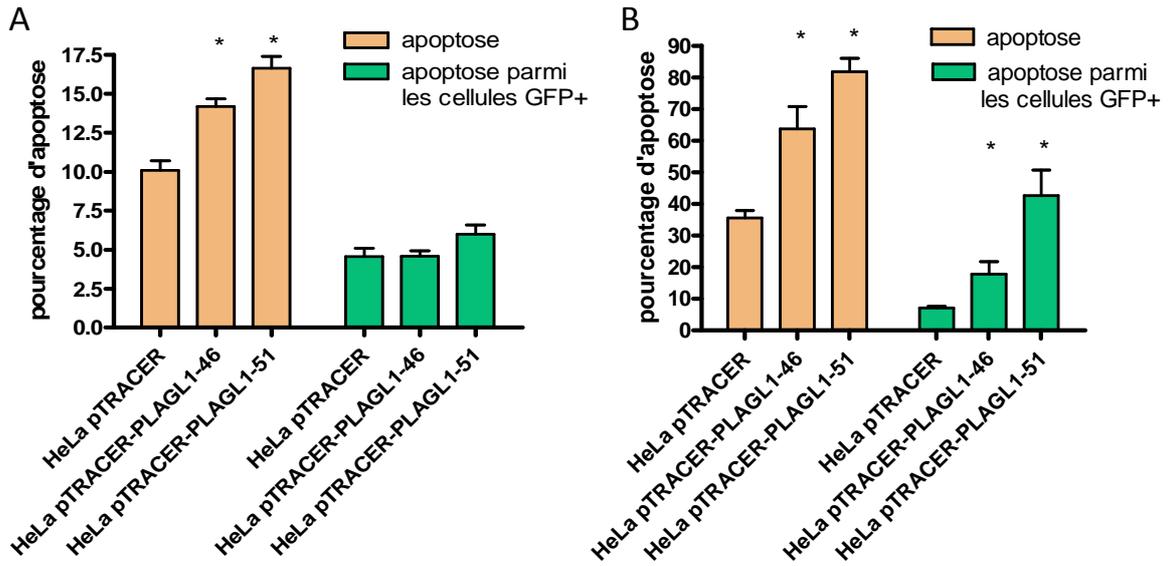


Figure 130 : cytométrie en flux : mesure de l'apoptose induite par la transfection de pTRACER-PLAGL1-46 ou pTRACER-PLAGL1-51 dans des HeLa pendant 24 h (A) ou 48 h (B)

- pTRACER-PLAGL1-46, vecteur pTRACER dans lequel nous avons cloné la forme courte de l'ADNc de *PLAGL1* (codant pour la forme courte de la protéine PLAGL1 de 46kDa)
- pTRACER-PLAGL1-51, vecteur pTRACER dans lequel nous avons cloné la forme longue de l'ADNc de *PLAGL1* (codant pour la forme longue de la protéine PLAGL1 de 51kDa)

Puis nous avons marqué les cellules au TMRM (sonde mitochondriale fluorescente permettant la mesure de l'apoptose précoce) avant d'analyser la fluorescence émise par cytométrie en flux.

Après 24 h de transfection, le pourcentage de cellules GFP positives est faible (15 - 20 %). Toutefois, la transfection avec les constructions pTRACER-PLAGL1-46 ou pTRACER-PLAGL1-51 permet d'augmenter le pourcentage d'apoptose par rapport aux cellules HeLa transfectées avec le plasmide pTRACER natif. Ainsi, le pourcentage d'apoptose est significativement plus important lorsque les cellules HeLa expriment la forme courte de la protéine PLAGL1 (p-value = 0,00004), ou la forme longue de la protéine PLAGL1 (p-value < 0,0001). Lorsque l'on considère uniquement les cellules GFP positives, le pourcentage de cellules apoptotiques est quasiment identique pour les trois constructions, vraisemblablement à cause de faible taux de transfection (Figure 130).

Après 48 h de transfection, le pourcentage de cellules GFP positives est meilleur qu'à 24 h (30 - 50 %). Comme après 24 h de transfection, la transfection des cellules HeLa pendant 48 h avec les constructions pTRACER-PLAGL1-46 ou pTRACER-PLAGL1-51 permet d'augmenter le pourcentage d'apoptose par rapport aux cellules transfectées avec le plasmide pTRACER natif (p-value = 0,0035 et p-value = < 0,0001 ; respectivement). Lorsque l'on considère uniquement les cellules GFP positives, le pourcentage de cellules apoptotiques est significativement plus important dans les cellules HeLa exprimant la forme courte de la protéine PLAGL1 (p-value = 0,0167) ou les cellules HeLa exprimant la forme longue de la protéine PLAGL1 (p-value = 0,0008) par rapport aux cellules n'exprimant pas PLAGL1 (Figure 130). L'expression des formes courte et longue de PLAGL1 permet d'induire l'apoptose.

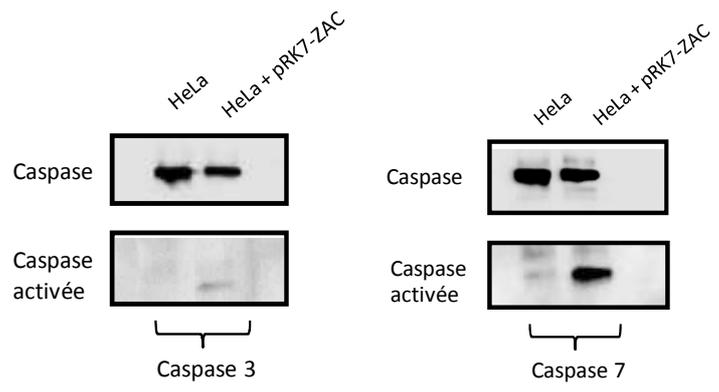


Figure 131 : western blot : activation des caspases 3 et 7 suite à la transfection de HeLa pendant 24 h avec pRK7-ZAC

Afin de valider ces résultats avec une autre technique, nous avons analysé par western blot, l'activation des caspases effectrices 3 et 7 sur cellules transfectées avec pRK7-ZAC.

Une fois l'apoptose mise en évidence, nous avons mesuré l'activation des caspases en western blot afin de connaître le mécanisme par lequel l'apoptose était déclenchée.

.2.1.2 Mécanisme apoptotique mis en jeu dans les HeLa

Les protéines totales de cellules HeLa transfectées avec un vecteur vide ou transfectées avec pRK7-ZAC pendant 24 h ont été extraites par congélation-décongélation puis un western blot a été réalisé.

Nous avons mesuré l'activation des caspases 3 et 7 à l'aide d'anticorps anti-caspase 3 totale (Cell signaling) ou caspase 7 totale (Abcam). Les cellules HeLa transfectées avec pRK7-ZAC présentent une activation des caspases 3 (faible) et 7 (forte) contrairement aux cellules HeLa transfectées avec le vecteur vide (Figure 131).

Nous confirmons que la transfection des cellules HeLa avec un vecteur permettant l'expression de PLAGL1 permet d'induire l'apoptose selon un mécanisme dépendant des caspases.

.2.2 Effet de la transfection de PLAGL1 dans des cellules HeLa sur le cycle cellulaire

Après avoir confirmé le rôle pro-apoptotique de PLAGL1 dans les cellules HeLa, nous avons, dans un deuxième temps, souhaité confirmer le rôle de PLAGL1 sur le cycle cellulaire.

Ainsi, les cellules HeLa ont été transfectées avec un plasmide codant pour PLAGL1. Le pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été quantifié par cytométrie en flux, après avoir marqué l'ADN à l'iodure de propidium. La surexpression de PLAGL1 dans les cellules HeLa n'induit pas d'arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 (non montré). Néanmoins, il paraît indispensable de confirmer ces résultats dans un autre modèle cellulaire, notamment une lignée cellulaire exprimant P53.

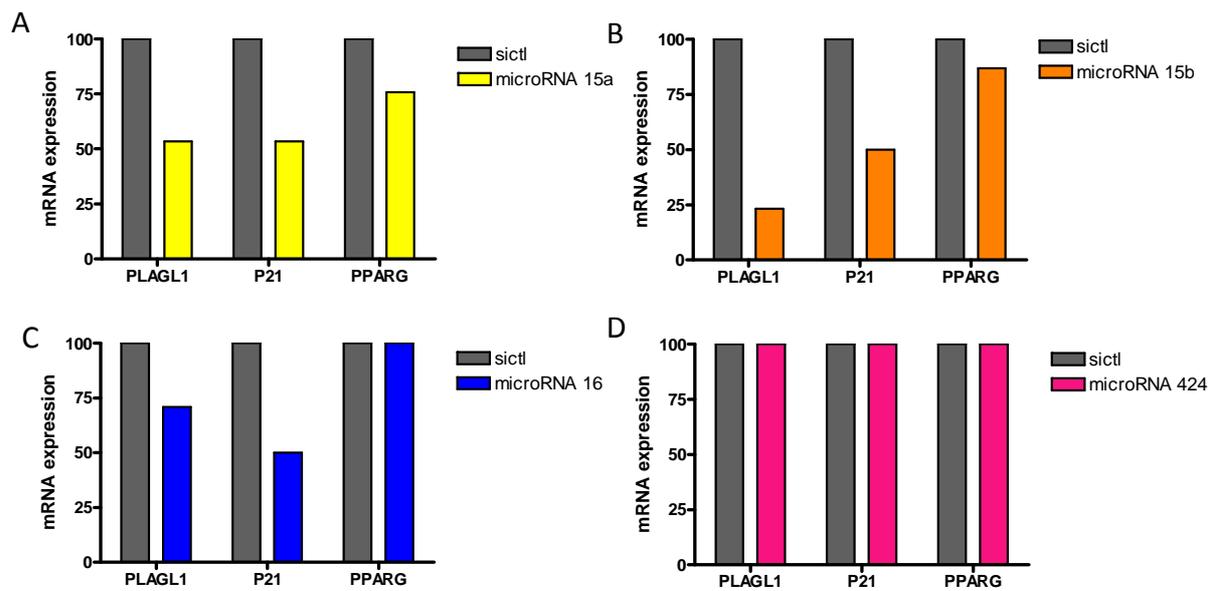


Figure 132: diminution de l'expression de certains gènes cibles de PLAGL1 suite à l'ajout des microRNA 15a (A), 15b (B), 16 (C) ou 424 (D)

.2.3 Effet de l'utilisation de miRNA dans les MFH128 sur le cycle cellulaire et l'apoptose

Après avoir validé le rôle de PLAGL1 dans un modèle de cellules surexprimant PLAGL1, nous avons ensuite recherché les conséquences fonctionnelles de la transfection des microRNA dans les MFH128. Les résultats précédents ont mis en évidence une diminution maximale de traduction de PLAGL1 lorsque les cellules étaient transfectées avec les quatre microRNA à 20 nM pendant 24 h. Nous avons donc effectué des mesures de l'apoptose et du cycle cellulaire en cytométrie en flux dans ces conditions.

Lors de la réalisation de ces expériences nous nous sommes heurtés à plusieurs problèmes techniques qui ont rendu impossible l'analyse du cycle cellulaire ou de l'apoptose.

En effet, les cellules MFH128 sont constituées d'une population cellulaire hétérogène en taille et multinucléé. Ces cellules sont caractérisées par un défaut de cytodièrese en fin de mitose qui aboutit au développement de cellules contenant un nombre variable de noyau (entre 1 et 8 environ).

D'une part, ces cellules ont un temps de doublement inhabituellement long, difficilement compatible avec le temps d'expérimentation. La mesure de l'apoptose ou du cycle cellulaire intervenant 24 h ou 48h après la transfection des microRNA et les cellules doublant en 30 jours, il était impossible d'observer un ralentissement de la prolifération lorsque la mesure était faite par comptage cellulaire. D'autre part, la présence de plusieurs noyaux par cellule rend l'analyse du cycle en cytométrie de flux impossible, car la mesure du pourcentage de cellules dans les différentes phases du cycle est faite grâce à un agent intercalent.

.2.4 Conséquences de l'ajout des microRNA dans les cellules MFH128 sur l'expression des gènes cibles de *PLAGL1*

Comme nous n'avons pas pu étudier les effets sur l'apoptose et le cycle cellulaire de l'inhibition de PLAGL1 par des microRNA dans les MFH128, nous avons recherché d'autres critères d'évaluation du rôle de PLAGL1 dans les MFH128, comme l'induction de l'expression de certains de ses gènes cibles.

Les analyses par immunocytofluorescence ont permis de montrer la plus forte diminution de l'expression protéique de *PLAGL1* lorsque les MFH128 étaient transfectées avec 20 nM de microRNA. Afin d'observer les conséquences fonctionnelles de l'inhibition de la traduction de *PLAGL1* suite à la transfection de microRNA dans les cellules MFH128, l'expression de trois gènes cibles connus de *PLAGL1* a été quantifié par qRT-PCR : *P21*, *PPARG* et *APAF-1* (*TP53* n'a pas été quantifié car la lignée MFH128 est délétée pour ce gène). Les microRNA permettant de diminuer la quantité de protéine *PLAGL1*, l'expression de ses gènes cibles doit également diminuer.

A 48 h, la transfection du microRNA 15a permet une diminution de l'expression de *PLAGL1* de 50 %, de *P21* (50 %) et de *PPARG* (25 %). Le microRNA 15b permet de diminuer l'expression de *PLAGL1* de 30 % et celle de *P21* de 65 %, mais n'engendre pas de diminution de *PPARG*. Le microRNA 16 permet de diminuer l'expression de *PLAGL1* de 30 %, de *P21* de 50 % mais n'engendre pas de diminution de *PPARG*. Le microRNA 424 n'a aucun effet sur l'expression de *PLAGL1* ou sur ses gènes cibles.

Nous avons également noté que les MFH128 n'exprimaient pas *APAF-1*.

.2.5 Conclusions générales

Ce travail nous a permis de mettre en évidence que *PLAGL1* pouvait être régulé par des microRNA dans les sarcomes.

- Les microRNA 15a, 15b, 16 et 424 se fixent sur des séquences du 3'UTR de *PLAGL1*,
- La fixation des microRNA sur un seul site suffit à inhiber la traduction,
- Les lignées LPS78 et LPS80, qui n'expriment pas la protéine *PLAGL1* expriment plus les microRNA 15a, 15b et 16 que la lignée MFH128 qui exprime la protéine *PLAGL1*,
- Les microRNA 15a, 15b, 16 et 424 permettent de diminuer la quantité de protéine *PLAGL1* dans les cellules MFH128, sans avoir d'effet direct sur l'ARNm. Ces microRNA agiraient donc plus par séquestration que par dégradation,
- Les anti-microRNA 424 et 15a permettent d'augmenter significativement l'expression de la protéine *PLAGL1* dans les LPS78 et LPS80, sans avoir d'effet direct sur l'ARNm, argument supplémentaire en faveur d'une régulation des microRNA par séquestration de l'ARNm de *PLAGL1* et non par dégradation,
- L'inhibition de la traduction de *PLAGL1* par des microRNA engendre une diminution de la transcription de certains gènes cibles de *PLAGL1*.

.3 Discussion de la partie : régulation post-transcriptionnelle

.3.1 Etat des connaissances sur PLAGL1

Le gène *PLAGL1* code pour deux isoformes protéiques, de 46 et 51 kDa. La protéine PLAGL1 est un facteur de transcription contenant 7 doigts de zinc de type C₂H₂ qui régule notamment l'expression de *TP53*, *P21^{cip1}*, *PPARG* et *APAF-1*. **PLAGL1 est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 et dans l'apoptose** (Hoffmann and Spengler, 2008), (Liu et al., 2008), (Spengler et al., 1997). Des expériences de cytométrie en flux réalisées sur des cellules exprimant artificiellement PLAGL1, traitées avec différents inhibiteurs de caspases ont permis de montrer que PLAGL1 déclenchait l'apoptose par un **mécanisme dépendant des caspases**. Ces expériences ont mis en évidence l'implication de PLAGL1 dans les deux **voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque** (Kamikihara et al., 2005).

Cependant, les études menées sur *PLAGL1/ZAC/LOT1* ont souvent été transcriptomiques. L'expression basale de la protéine PLAGL1 a été recherchée dans des tumeurs ou dans des cellules tumorales dans peu d'étude notamment : par western blot chez le rat (Hide et al., 2009) (Ciani et al., 2003) ; par immunohistochimie et /ou western blot chez l'Homme (Pagotto et al., 2000), (Bilanges et al., 2001), (Lanaspa et al., 2009). Chez l'Homme, ces études portent sur un petit nombre d'échantillons tumoraux et montrent souvent une perte d'expression de *PLAGL1* dans les cellules cancéreuses ovariennes ou mammaires par exemple.

L'un des objectifs de notre travail a donc été de rechercher l'expression de la protéine PLAGL1 par western blot et immunofluorescence dans les lignées de sarcomes et dans les tumeurs de patients.

.3.2 Expression de PLAGL1 dans les sarcomes

Des marquages par immunofluorescence et western blot de PLAGL1 sur les quatre lignées de sarcomes ont été effectués en prenant comme contrôle positif des cellules HeLa transfectées avec un plasmide codant pour PLAGL1. Ces marquages ont permis de constater que la protéine PLAGL1 était exprimée dans les cellules MFH128, qui expriment l'ARNm de

PLAGL1, à un niveau comparable à celui des cellules transfectées. La lignée MFH148 n'exprimant pas ou très peu l'ARNm de *PLAGL1* n'exprime pas non plus la protéine. En revanche, de façon surprenante, les lignées LPS78 et LPS80, qui exprime l'ARNm de *PLAGL1*, n'expriment pas la protéine correspondante.

Dans les tumeurs, l'expression de la protéine *PLAGL1* a pu être mise en évidence sur un GIST exprimant l'ARNm de *PLAGL1* (données de qRT-PCR), ce qui **valide l'immunohistochimie avec l'anticorps anti-*PLAGL1***. En revanche, les immunomarquages réalisés sur un autre GIST et un LPS, exprimant également l'ARNm de *PLAGL1* n'ont pas permis de mettre en évidence la protéine *PLAGL1*.

Ces marquages ont également été faits sur du tissu mammaire et du tissu placentaire, généralement utilisés comme contrôles positifs dans les expériences de transcriptome, et n'ont pas permis de visualiser la protéine *PLAGL1*. Mais, l'expression de la protéine *PLAGL1* n'a jamais été recherchée dans ces deux tissus. L'absence de marquage de la protéine *PLAGL1* peut être due à une absence réelle de la protéine ou à un problème de l'échantillon. En effet, le tissu mammaire utilisé est issu d'un individu qui peut avoir la particularité de ne pas exprimer *PLAGL1*. De même, le tissu placentaire utilisé correspond à un stade de développement précis. Or, on sait que *PLAGL1* est exprimé dans les cellules au cours du développement embryonnaire mais qu'il est perdu au fur et à mesure de la différenciation des cellules. L'absence de protéine *PLAGL1* dans cet échantillon peut être due au stade de développement du placenta.

De plus, pour être certain que l'absence de détection de la protéine ne venait pas d'un défaut de reconnaissance de l'anticorps, nous avons utilisé un deuxième anticorps réagissant avec un épitope différent et le même profil d'expression de la protéine *PLAGL1* a pu être mis en évidence.

Globalement, il y n'y a **pas de corrélation entre les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine *PLAGL1***. En effet, le GIST exprimant la protéine *PLAGL1*, n'est pas la tumeur dans laquelle le niveau d'ARNm de *PLAGL1* est le plus important. L'expression de la protéine *PLAGL1* n'a pu être recherchée que dans un petit nombre d'échantillon. Il est donc nécessaire d'effectuer une étude à plus grande échelle, sur les sarcomes mais également sur des tissus normaux adultes et embryonnaires à différents stades.

Plusieurs raisons peuvent expliquer le profil protéique de *PLAGL1*, parmi lesquelles : une **mutation ponctuelle** qui altérerait la conformation de la protéine, ou diminuerait sa demi-vie, bien qu'aucune mutation de *PLAGL1* n'ait été mise en évidence jusqu'à aujourd'hui (Kamiya et al., 2000), ou encore une régulation par des **microRNA**.

La lignée MFH148 n'exprimant pas l'ARNm de *PLAGL1*, seules les isoformes courtes et longues d'ARNm de *PLAGL1* des autres lignées (LPS78, LPS80 et MFH128) ont été amplifiées par PCR, puis séquencées afin d'identifier une éventuelle mutation. Les lignées MFH128 et LPS80 exprimaient la forme sauvage des deux ARNm de *PLAGL1*, alors que la lignée LPS78 présentait une **mutation sur l'acide nucléique 658** qui induisait l'incorporation d'une valine au lieu d'une alanine. Cet acide aminé de substitution restant un acide aminé non polaire, il est peu probable qu'il engendre un changement de conformation de la protéine qui la rendrait indétectable par les anticorps utilisés en immunofluorescence ou western blot. La mutation observée dans la lignée LPS78, est la **première mutation connue de *PLAGL1***.

Néanmoins, pour écarter de façon certaine cette hypothèse, il serait nécessaire de cloner la forme mutée de l'ARNm dans un vecteur d'expression et de transfecter des cellules pour vérifier l'expression de la protéine. Toutefois, la lignée LPS80 ne présente pas de mutation de la région codant de *PLAGL1*, donc l'hypothèse d'une mutation, qui empêcherait la visualisation de la protéine *PLAGL1*, n'explique pas l'absence de marquage en immunofluorescence et en western blot dans cette lignée.

Pour vérifier que l'absence de protéine *PLAGL1* n'était pas due à une modification de la demi-vie de la protéine, nous avons traité les cellules avec un **inhibiteur du protéasome**. Cela n'a pas permis de restaurer l'expression protéique de *PLAG1* dans les LPS78 et les LPS80.

Au vu de ces résultats, **nous avons envisagé l'existence d'une régulation de *PLAGL1* par des microRNA**.

.3.3 Régulation par des microRNA

Une analyse des bases de données permettant de déterminer les microRNA susceptibles de se fixer à une séquence, a permis d'identifier **une cinquantaine de microRNA pouvant, théoriquement, se fixer au 3'UTR de *PLAGL1***. Parmi ces microRNA, quatre ont été sélectionnés pour une analyse *in vitro* : **les microRNA 15a, 15b, 16, et 424**. Ces microRNA ont été sélectionnés en fonction de leur récurrence dans plusieurs bases de données et parce qu'ils ciblaient également *PLAG1* et/ou *PLAGL2*, les deux autres membres de la famille de *PLAGL1*. Or, les deux autres membres de la famille de *PLAGL1* sont des oncogènes, alors que *PLAGL1* est décrit comme un gène suppresseur de tumeur. Ce critère de sélection a pu introduire un biais et sélectionner des microRNA suppresseurs de tumeur car ciblant en général des oncogènes. En effet, traditionnellement, un même microRNA peut réguler un groupe de gènes ayant la même fonction, ainsi, les microRNA 15 et 16 régulent des gènes impliqués dans la prolifération et dans l'arrêt de l'apoptose et donc mis en jeu dans la tumorigenèse (Bonci et al., 2008).

Un **test en cytométrie** reposant sur la transfection simultanée d'un des quatre microRNA et d'un plasmide codant pour l'EGFP fusionnée au 3'UTR de *PLAGL1*, région généralement ciblée par les microRNA, a permis de mettre en évidence une diminution de la fluorescence de l'EGFP et donc **une fixation du microRNA au 3'UTR de *PLAGL1* pour les microRNA 15a, 15b, 16 et 424**. Ces microRNA appartiennent tous à la même famille de microRNA : la **famille mir15/107** qui compte les microRNA 107, 103, 15a, 15b, 16, 195, 497, 503, 424 et 646. Ces microRNA n'ont pas tous exactement la même séquence de fixation mais partagent tous le même « seed » de type AGCAGC également appelé AGCx2 et sont donc susceptibles de réguler les mêmes gènes. De façon à prouver que la diminution de la fluorescence observée était due à la fixation d'un microRNA au 3'UTR de *PLAGL1* et non à un mécanisme indirect, nous avons délété le 3'UTR de *PLAGL1* des deux régions complémentaires du « seed ». Nous avons pu constater que **la délétion d'un seul site n'abolit pas la diminution de la fluorescence contrairement à la délétion des deux sites de reconnaissance**. Ceci montre que les quatre microRNA se fixent au 3'UTR de *PLAGL1* et que cette fixation se fait indépendamment sur les deux sites.

Il semble que *PLAGL1* puisse être régulé, *in vitro*, par certains microRNA. **Nous avons ensuite recherché si ce mécanisme de régulation était impliqué dans la répression de l'expression de *PLAGL1* dans les sarcomes.**

La quantification de l'expression des quatre microRNA d'intérêt dans les lignées de sarcomes MFH128, LPS78 et LPS80, par qRT-PCR, montre que toutes les lignées expriment ces microRNA. Cependant, **les cellules LPS78 et LPS80 expriment ces microRNA en plus grande quantité que les cellules MFH128**, ce qui pourrait expliquer l'absence de protéine dans les lignées LPS78 et LPS80 alors que la lignée MFH128 exprime la protéine *PLAGL1*.

Par la suite, l'efficacité des microRNA à réguler l'expression de *PLAGL1* a été testée dans les MFH128 d'une part, et dans les LPS78 et LPS80 d'autre part. Ainsi, la transfection des microRNA 15a, 15b, 16 et 424 permet de diminuer l'expression protéique de *PLAGL1* selon un effet dose dans les cellules MFH128. Dans les cellules LPS78 et LPS80, certains anti-microRNA permettent d'augmenter l'expression de la protéine *PLAGL1*. Dans les cellules LPS78, seul l'anti-microRNA 424 a permis d'augmenter la quantité de protéine *PLAGL1*, alors que dans les cellules LPS80, seul l'anti-microRNA 15a induit une levée de l'inhibition de la traduction de *PLAGL1*. Donc ces microRNA influent sur l'expression endogène de la protéine *PLAGL1*.

Bien que des différences statistiquement significatives aient été obtenues pour les cellules LPS78 et LPS 80 transfectées avec ces anti-microRNA par rapport à leur transfection avec des siCTL, ces différences sont faibles. Ceci peut être dû au mécanisme d'action des anti-microRNA. En effet, les anti-microRNA se fixent aux microRNA libres et les complexes ainsi formés sont dégradés. En revanche, les microRNA déjà liés à des ARNm ne sont pas accessibles aux anti-microRNA. Or le mécanisme de régulation majeur des microRNA chez les mammifères est une inhibition de la traduction par séquestration des ARNm cibles dans des sous-domaines cytosoliques et non une dégradation. **L'utilisation des anti-microRNA ne permet de dégrader qu'une petite partie des microRNA et ne permet donc qu'une faible variation du niveau protéique.**

L'effet de la transfection des trois lignées de sarcomes avec des microRNA et des anti-microRNA, sur l'expression de l'ARNm de *PLAGL1*, a également été quantifié par qRT-PCR.

Pour les cellules transfectées 24 h avec les microRNA ou leurs inhibiteurs, aucune variation quantitative d'ARNm de *PLAGL1* n'a pu être constatée. Comme évoqué plus haut, chez les mammifères, les microRNA inhibent l'expression protéique par séquestration de l'ARNm plus que par dégradation. Ceci peut expliquer le fait qu'à des temps courts de transfection, il y n'ait aucune variation du niveau d'ARNm. En revanche lorsque les cellules sont transfectées avec des microRNA pendant 48 h, on peut constater une **diminution de l'expression de l'ARNm de *PLAGL1***. Deux mécanismes peuvent expliquer cette diminution : soit un mécanisme direct, la quantité d'ARNm dégradée par la complémentarité parfaite avec les microRNA, trop faible après 24h de transfection, est désormais quantifiable en qRT-PCR ; soit un mécanisme indirect, les microRNA inhibent l'expression de la protéine *PLAGL1* mais également d'autres protéines potentiellement régulatrices de l'expression du gène *PLAGL1*, c'est cette inhibition qui engendrerait une diminution de la transcription de *PLAGL1*.

Les **conséquences fonctionnelles** de la transfection des microRNA dans les cellules MFH128, ont ensuite été recherchées. Des qRT-PCR ont été faites pour quantifier le niveau d'expression de certains gènes cibles de *PLAGL1*. Ceci a permis de montrer que les microRNA régulant *PLAGL1* avaient des conséquences fonctionnelles puisque les cellules transfectées avec **les microRNA 15a, 15b et 16 induisent une diminution significative de l'expression des gènes *PPARG* et *P21***. L'influence de ces microRNA sur l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire induit par *PLAGL1* n'a pu être constatée dans la lignée MFH128 en raison de sa complexité de manipulation. Nous envisageons donc de transfecter des cellules (HeLa par exemple) avec un plasmide codant pour *PLAGL1*-3'UTR sous la dépendance d'un promoteur faible. Les conséquences, sur l'apoptose et le cycle cellulaire, de l'ajout des microRNA dans ces cellules pourront donc être mesurées.

Ces résultats mettent en évidence pour la première fois que *PLAGL1* peut être régulé par des microRNA. **Dans les sarcomes, *PLAGL1* est régulé par les microRNA 15a, 15b, 16 et 424.** De façon intéressante, ces microRNA appartiennent tous à la superfamille des microRNA 15/107 comprenant les microRNA 15a, 15b, 16, 103, 107, 195, 497, 503, 646 et 424, ayant le même site de reconnaissance de type AGCx2 ou AGCAGC (Finnerty et al., 2010). Cette superfamille est composée de deux familles de microRNA : la famille 16 (15a, 15b, 195 et 16) et la famille 103/107 (103, 107, 497, 503 et 646). Tous ces microRNA peuvent se fixer

sur la même séquence d'ARNm et partagent de nombreuses cibles communes. Les microRNA de la famille 16 ciblent préférentiellement des gènes régulant le cycle cellulaire. Ainsi la transfection des microRNA 15a et 16, par exemple, induit un arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 (Linsley et al., 2007).

Les microRNA de la famille 16 (15a, 15b et 16) ont été initialement décrits comme des suppresseurs de tumeur pour plusieurs raisons : d'une part car ils régulent par exemple les oncogènes *BCL2*, *MCL1*, *CCND1* et *WNT3A* et parce que d'autre part, ils sont sous-exprimés dans certains cancers comme la leucémie lymphoïde chronique (Calin et al., 2005) ou le cancer de la prostate (Bonci et al., 2008), (Takeshita et al., 2010). De plus, il a été montré que l'oncogène *PLAG1* était régulé par des microRNA de la famille 15/107 notamment le microRNA 424. Ainsi, dans la leucémie lymphoïde chronique, mir424 est sous exprimé ce qui engendre une surexpression de l'oncogène *PLAG1* (Pallasch et al., 2009).

Cependant, d'autres études ont mis en évidence une **surexpression des microRNA de la famille 16 dans certains cancers** comme le mélanome, le cancer du côlon, ou celui de la tête et du cou, et ont émis l'hypothèse que **ces microRNA pourraient également être des oncogènes** (Hui et al., 2010), (Wang et al., 2010), (Satzger et al., 2010). **Le rôle des microRNA de la famille 16 dans l'oncogenèse dépendrait du type cellulaire considéré.**

Le gène codant pour le microRNA 15a et le microRNA 16 est situé en 13q14.3, celui codant pour le microRNA 15b se situe en 3q26.1. Pour finir le microRNA 424 est exprimé à partir d'un gène en Xq26.3. Les gènes codant pour des microRNA sont souvent retrouvés dans des **régions chromosomiques instables** et fréquemment remaniées dans les cancers. Ainsi, il a été montré que la région 13q14.3 pouvait être amplifiée dans certains rhabdomyosarcomes (Weber-Hall et al., 1996) (Weber-Hall et al., 1996) ; ou des cancers du poumon (Balsara et al., 1997). La région 3q26, contenant le gène codant pour les microRNA 15b et 16, est amplifiée dans certains types de lymphomes (Monni et al., 1998), dans le cancer du poumon (Brass et al., 1996), de l'utérus (Soder et al., 1997), et plus rarement dans des ostéosarcomes, des neurofibromes et des GIST (el-Rifai et al., 1996). Le locus Xq26.3 contenant le gène codant pour le microRNA 424 est délété dans le cancer du sein (Tsuji et al., 2010) et amplifié dans le lymphome non Hodgkinien (Renedo et al., 2001).

Il est possible que ces régions soient remaniées dans les sarcomes et surtout dans les liposarcomes, ce qui pourrait causer une augmentation de l'expression de ces microRNA et expliquer la perte d'expression protéique de *PLAGL1*.

Enfin, *PLAGL1* induit l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 tout comme P53. Des travaux ont démontré le lien étroit entre les deux facteurs pro-apoptotiques. En effet, P53 est capable d'activer la traduction du gène *PLAGL1* en se fixant à son promoteur et réciproquement *PLAGL1* peut induire l'expression de *TP53* par liaison au promoteur de *TP53* (Rozenfeld-Granot et al., 2002). Dans les sarcomes, le rôle de P53 sur *PLAGL1* est moins évident. En effet, la lignée MFH128 est déléetée pour TP53. La transfection de P53 n'induit pas d'augmentation de l'expression de *PLAGL1*.

Nous avons émis l'hypothèse que, dans les sarcomes, *PLAGL1* pourrait être un doublon fonctionnel de P53, activé en cas de déficience de P53. De façon intéressante, les microRNA ciblant *PLAGL1* ne ciblent pas P53 et inversement. En revanche, le microRNA 107 appartenant à la famille 15/107 est une cible de p53. On peut émettre l'hypothèse que p53 puisse induire l'expression de microRNA de la famille 15/107 et réguler négativement *PLAGL1*.

Conclusion générale et Perspectives

PLAGL1 est un **gène suppresseur de tumeur** qui code pour un facteur de transcription impliqué dans **l'apoptose** et **l'arrêt du cycle cellulaire**. L'expression de *PLAGL1* a été très étudiée dans les **cancers épithéliaux** mais jusqu'à ce jour, jamais dans les **sarcomes**. *PLAGL1* est régulé par un mécanisme épigénétique appelé « **empreinte parentale** » qui permet une expression monoallélique en conditions physiologiques. Dans les cancers, *PLAGL1* subit une modification de l'empreinte qui altère son expression. La quasi-totalité des articles parus sur ce sujet ont relié le niveau global de méthylation d'une dizaine de CpG du promoteur de *PLAGL1* à l'expression de son transcrite. D'ailleurs, de façon générale toutes les études portant sur la méthylation de l'ADN mettent en parallèle, la méthylation globale, extrapolée à partir de mesures faites sur quelques sites de méthylation, avec l'expression de l'ARNm. L'accessibilité grandissante à des techniques permettant une étude plus exhaustive de la méthylation de l'ADN a permis très récemment de corréliser seulement certains sites de méthylation d'un îlot CpG entier à l'expression ou à des facteurs cliniques. Ceci suggère donc l'existence de véritables **signatures de méthylation**. Notre étude s'inscrit dans cette évolution technologique et conceptuelle de la méthylation de l'ADN.

En effet, nous avons développé une méthodologie permettant l'analyse de la méthylation sur de grand fragment d'ADN par **pyroséquençage** et pouvant **quantifier de façon précise la méthylation de chaque CpG le long de tout un îlot**. En comparant la méthylation de chaque CpG du promoteur P1 entre l'ensemble des tumeurs et des fibroblastes issus de tissu peritumoral normal mis en culture pendant un temps court, nous avons montré qu'il existait des **profils de méthylation différents entre le tissu tumoral et le tissu sain**. Nous avons également observé qu'il existait un **profil de méthylation propre aux différents sous-types tumoraux**. Néanmoins, il apparaît désormais nécessaire de confirmer ces observations en étudiant ces profils de méthylation dans un plus large panel de tumeurs et de tissu sain, bien que le choix du tissu sain dans le cas des sarcomes reste problématique étant donné la diversité de leur tissu originel.

Ces analyses de méthylation ont également permis de montrer que dans les lignées cellulaires, **la méthylation globale** (calculée sur les 118 sites de méthylation) **était parfaitement**

corrélée à l'expression de l'ARNm de *PLAGL1* à la différence des tumeurs pour lesquelles **seuls quelques CpG** ont pu être statistiquement reliés à l'expression du transcrit *PLAGL1*. Le fait que la méthylation globale corrèle à l'expression dans les lignées et non dans les tumeurs, peut être dû à la modification du profil de méthylation 1) lors de la mise en culture et / ou 2) à l'homogénéisation cellulaire (origine monoclonale des lignées ?) et à l'absence de microenvironnement. En effet, il est possible qu'au sein d'une tumeur le profil de méthylation et la méthylation de certains CpG soient conditionnés, au moins en partie, par le microenvironnement tumoral. Si les CpG conditionnant l'expression de *PLAGL1* sont différents selon le type de sarcome, cela sous-entend que les facteurs de transcription, se fixant à ces CpG lorsqu'ils ne sont pas méthylés et régulant l'expression de *PLAGL1*, sont propres à chaque sarcome. Ceci suggère également que *PLAGL1* pourrait être transcrit par l'activation de voies de signalisation différentes s'inscrivant dans l'activation d'un réseau de gènes propres à chaque type de tumeur.

Cette pléiotropie d'inducteurs et d'acteurs possibles pourrait expliquer les **effets antagonistes de *PLAGL1***. En effet, *PLAGL1* est décrit classiquement comme un gène suppresseur de tumeur du fait de son rôle dans l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire et de sa perte dans de nombreux cancers. Néanmoins, certaines études montrent une augmentation de l'expression de *PLAGL1* dans certains cancers, et récemment il a été suggéré que *PLAGL1* pouvait même avoir un **rôle oncogénique dans les glioblastomes**. Ces données suggèrent que le rôle de *PLAGL1* pourrait dépendre du tissu dans lequel il s'exprime. Les données que nous avons obtenus dans les sarcomes corroborent ces observations puisqu'il semble que dans les LMS et les US, l'expression de *PLAGL1* soit de **mauvais pronostic**, alors qu'elle ne semble pas relevante dans les LPS et les GIST. Afin de vérifier cela, il faudrait mesurer les conséquences de la réexpression de *PLAGL1* dans des lignées de LMS, US, GIST ou LPS, sur la prolifération, l'apoptose mais aussi sur la différenciation cellulaire ou la migration.

De plus en plus de travaux montrent que la méthylation peut constituer un nouvel outil clinique, mais la majeure partie de ceux-ci considère la méthylation globale comme marqueur prédictif ou pronostique. Cependant, de très récents articles montrent **qu'un seul site de méthylation peut être prédictif** de la survie ou de la réponse aux traitements. Dans les US et les LMS, nous avons pu relier la méthylation de certains CpG à des paramètres cliniques

comme la survie ou la métastase par exemple : le niveau de méthylation de ces CpG pouvant être indicatifs de l'agressivité tumorale ou de la probabilité de rechute. L'analyse de ces CpG dans les sarcomes pourrait être envisagée, comme **outil diagnostique ou pronostique**. Ceci s'inscrit donc dans la recherche de biomarqueurs prédictifs et / ou pronostiques, dans le but de mieux orienter les traitements médicaux.

Nous avons montré que plusieurs CpG pouvaient être corrélés à des facteurs cliniques différents, laissant supposer que l'influence de la méthylation d'un promoteur donné ne se limite pas à un gène mais peut également conditionner l'expression d'un réseau entier de gènes en favorisant les interactions physiques activatrices ou inhibitrices entre les gènes. Chaque CpG peut théoriquement conditionner un réseau de gènes différents et induire des phénotypes variables.

Nous avons mis en évidence la prépondérance de certains CpG à conditionner l'expression de *PLAGL1* et certains facteurs cliniques, dans les sarcomes. Or, les sarcomes ne représentent qu'1 % de tous les cancers. Il serait intéressant de savoir si ce mode de régulation est propre aux sarcomes ou s'il peut être généralisé aux cancers épithéliaux.

De même, nous avons montré que *PLAGL1* pouvait être régulé, dans les sarcomes, par un autre mécanisme épigénétique : **les microRNA**. La relation entre les microRNA et le cancer est un domaine de recherche très actif depuis plusieurs années. Ainsi, il a été démontré que de nombreux microRNA avaient une expression aberrante dans de multiples cancers ce qui suggère un rôle important de ces petits ARN non codants dans l'oncogénèse. L'expression des microRNA est souvent modifiée dans les cancers car ils sont codés par des gènes situés sur des régions génomiques fragiles, fréquemment remaniées dans les cancers. Les microRNA régulant un gène donné peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre en fonction du niveau d'expression de ces microRNA et du niveau d'expression de leurs cibles. Il est donc possible que la régulation de *PLAGL1* par **les microRNA 15a/15b/16/424 mis en évidence dans cette étude soit spécifique des sarcomes**.

Notre travail a permis de découvrir que les microRNA 15a/15b/16/424 pouvaient se fixer au 3'UTR de *PLAGL1* et inhiber l'expression de la protéine *PLAGL1* dans une lignée de

liposarcome sans avoir de conséquence sur le niveau de son transcrit. L'utilisation d'inhibiteurs de microRNA dans deux autres lignées de liposarcomes a permis d'augmenter l'expression protéique de *PLAGL1*. Les inhibiteurs permettant de faire varier l'expression protéique de *PLAGL1* sont différents dans les deux lignées, illustrant le fait que les microRNA régulant *PLAGL1* puissent être variables d'un type cellulaire à l'autre et donc la difficulté à généraliser le mode d'action d'un microRNA sur une protéine donnée.

Nous avons montré que ***PLAGL1* pouvait être régulé par des microRNA dans des lignées cellulaires de sarcomes (LPS)**. Afin de confirmer l'existence et l'importance en cancérologie de ce mode de régulation, il serait intéressant de faire des **modèles murins de xénogreffes** de cellules exprimant *PLAGL1*-3'UTR. Une fois les cellules exprimant *PLAGL1* greffées dans des souris immunodéprimées, l'injection de microRNA en intra ou péri-tumoral devrait permettre de diminuer l'expression de la protéine *PLAGL1*. Les conséquences de la variation d'expression de *PLAGL1* pourraient alors être quantifiées *in vivo*.

Par ailleurs, il a été mis au point récemment à l'Institut Bergonié la réalisation et l'analyse de puces microRNA sur plateforme Agilent. Aussi, une étude du profil d'expression miRNA d'une quinzaine de LMS a été réalisée sur la puce « Human miRNA Microarray V3 » contenant 866 miRNA humain et 89 miRNA viraux. Une première analyse bioinformatique a mis en évidence une corrélation entre l'expression de l'ARNm de *PLAGL1* et celle du microRNA 181c. Or, les microRNA 181a et b sont connus pour réguler *PLAGL1*, un des deux oncogènes de la famille de *PLAGL1*. Il semblerait donc que *PLAGL1* puisse être régulé par un microRNA dans un autre type de cancer que les liposarcomes. Le même type d'étude que celle que nous avons faite dans les liposarcomes avec les microRNA 15a, 15b, 16 et 424 pourrait être mené dans les LMS avec les microRNA 181c.

Ce travail même s'il n'explique pas tous les mécanismes moléculaires régulant l'expression de *PLAGL1* :

- **a mis en évidence un nouveau mécanisme épigénétique de régulation de l'expression de *PLAGL1* dans les sarcomes : les microRNA,**
- **a affiné les connaissances des mécanismes mis en jeu lors de la méthylation de l'ADN,**
- **a démontré le rôle pronostique et diagnostique de *PLAGL1* dans les sarcomes,**
- **a suggéré que la méthylation de certains sites de méthylation puisse être un nouvel outil clinique pour orienter le diagnostic et le pronostic.**

Références bibliographiques

Abdollahi A, Roberts D, K, Godwin, A, C, Schultz, D, G, Sonoda, R, Testa, J C, Hamilton, T (1997) Identification of a zinc-finger gene at 6q25: a chromosomal region implicated in development of many solid tumors. *Oncogene* 14:1973-1979.

Abdollahi, A., Bao, R Hamilton, T.C (1999) LOT1 is a growth suppressor gene down-regulated by the epidermal growth factor receptor ligands and encodes a nuclear zinc-finger protein. *Oncogene* 18:6477-6487.

Abdollahi, A., Godwin, A, Miller, P, Getts, L, Schultz, D, Taguchi, R, Testa, J Hamilton, T (1997) Identification of a gene containing zinc-finger motifs based on lost expression in malignantly transformed rat ovarian surface epithelial cells. *Cancer Res* 57:2029-2034.

Abdollahi, A., Gruver, B, Patriotis, C Hamilton, T (2003) Identification of epidermal growth factor-responsive genes in normal rat ovarian surface epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 307:188-197.

Abdollahi, A., Pisarcik, D, Roberts, D, Weinstein, J, Cairns, P Hamilton, T (2003) LOT1 (PLAGL1/ZAC1), the candidate tumor suppressor gene at chromosome 6q24-25, is epigenetically regulated in cancer. *J Biol Chem* 278:6041-6049.

Acevedo, C.M., Henríquez, M, Emmert-Buck, M.R Chuaqui, R.F (2002) Loss of heterozygosity on chromosome arms 3p and 6q in microdissected adenocarcinomas of the uterine cervix and adenocarcinoma in situ. *Cancer* 94:793-802.

Agrelo, R., Cheng, W, Setien, F, Ropero, S, Espada, J, Fraga, M, Herranz, M, Paz, M, Sanchez-Cespedes, M, Artiga, M, Guerrero, D, Castells, A, von Kobbe, C, Bohr, V Esteller, M (2006) Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8822-8827.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J, Nicholson, D.W, Salvesen, G, Thornberry, N.A, Wong, W.W Yuan, J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171.

Altuvia, Y., Landgraf, P, Lithwick, G, Elefant, N, Pfeffer, S, Aravin, A, Brownstein, M.J, Tuschl, T Margalit, H (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* 33:2697-2706.

Arima, T., Drewell, R.A, Arney, K.L, Inoue, J, Makita, Y, Hata, A, Oshimura, M, Wake, N Surani, M.A (2001) A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet* 10:1475-1483.

Arima, T., Kamikihara, T, Hayashida, T, Kato, K, Inoue, T, Shirayoshi, Y, Oshimura, M, Soejima, H, Mukai, T Wake, N (2005) ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res* 33:2650-2660.

Attadia, V. (1993) Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on differentiation and oncogene expression in the human monoblastic leukemia cell line U-937. *Leukemia* 7 Suppl 1:9-16.

Attwood, J., Yung, R Richardson, B (2002) DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci* 59:241-257.

- Bakin, A. Curran, T (1999) Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science* 283:387-390.
- Balsara, B.R., Sonoda, G, du Manoir, S, Siegfried, J.M, Gabrielson, E Testa, J.R (1997) Comparative genomic hybridization analysis detects frequent, often high-level, overrepresentation of DNA sequences at 3q, 5p, 7p, and 8q in human non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 57:2116-2120.
- Bandres, E., Agirre, X, Bitarte, N, Ramirez, N, Zarate, R, Roman-Gomez, J, Prosper, F Garcia-Foncillas, J (2009) Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 125:2737-2743.
- Barlow, D., Stöger, R, Herrmann, B, Saito, K Schweifer, N (1991) The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* 349:84-87.
- Barros, S.P. Offenbacher, S (2009) Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res* 88:400-408.
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
- Barz, T., Hoffmann, A, Panhuysen, M Spengler, D (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a Zac target gene mediating Zac antiproliferation. *Cancer Res* 66:11975-11982.
- Basyuk, Z., Coulon, V, Le Digarcher, A, Coisy-Quivy, M, Moles, J, Gandarillas, A Journot, L (2005) The candidate tumor suppressor gene ZAC is involved in keratinocyte differentiation and its expression is lost in basal cell carcinomas. *Mol Cancer Res* 3:483-492.
- Beguinet, L., Yamazaki, H, Pastan, I Johnson, A.C (1995) Biochemical characterization of human GCF transcription factor in tumor cells. *Cell Growth Differ* 6:699-706.
- Bernstein, E., Caudy, A.A, Hammond, S.M Hannon, G.J (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366.
- Bestor, H. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9:2395-2402.
- Bestor, T. (2000) Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *J Clin Invest* 105:409-411.
- Bilanges, B., Varrault, A, Basyuk, E, Rodriguez, C, Mazumdar, A, Pantaloni, C, Bockaert, J, Theillet, C, Spengler, D Journot, L (1999) Loss of expression of the candidate tumor suppressor gene ZAC in breast cancer cell lines and primary tumors. *Oncogene* 18:3979-3988.
- Bilanges, B., Varrault, A, Mazumdar, A, Pantaloni, C, Hoffmann, A, Bockaert, J, Spengler, D Journot, L (2001) Alternative splicing of the imprinted candidate tumor suppressor gene ZAC regulates its antiproliferative and DNA binding activities. *Oncogene* 20:1246-1253.

- Billard, L., Magdinier, F, Lenoir, G.M, Frappart, L Dante, R (2002) MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland. *Oncogene* 21:2704-2712.
- Bird, A. Wolffe, A (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99:451-454.
- Bliek, J., Verde, G, Callaway, J, Maas, S, De Crescenzo, A, Sparago, A, Cerrato, F, Russo, S, Ferraiuolo, S, Rinaldi, M, Fischetto, R, Lalatta, F, Giordano, L, Ferrari, P, Cubellis, M, Larizza, L, Temple, I, Mannens, M, Marcel, M.A, Mackay, D Riccio, A (2009) Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 17:611-619.
- Boatright, K.M. Salvesen, G.S (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15:725-731.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K Gorlich, D (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10:185-191.
- Bonci, D., Coppola, V, Musumeci, M, Addario, A, Giuffrida, R, Memeo, L, D'Urso, L, Pagliuca, A, Biffoni, M, Labbaye, C, Bartucci, M, Muto, G, Peschle, C De Maria, R (2008) The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 14:1271-1277.
- Borchert, G.M., Lanier, W Davidson, B.L (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13:1097-1101.
- Bourc'his, D., Xu, G, Lin, C, Bollman, B Bestor, T (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294:2536-2539.
- Boutla, A., Delidakis, C Tabler, M (2003) Developmental defects by antisense-mediated inactivation of micro-RNAs 2 and 13 in *Drosophila* and the identification of putative target genes. *Nucleic Acids Res* 31:4973-4980.
- Branford, S., Cross, N.C.P, Hochhaus, A, Radich, J, Saglio, G, Kaeda, J, Goldman, J Hughes, T (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 20:1925-1930.
- Brass, N., Ukena, I, Remberger, K, Mack, U, Sybrecht, G.W Meese, E.U (1996) DNA amplification on chromosome 3q26.1-q26.3 in squamous cell carcinoma of the lung detected by reverse chromosome painting. *Eur J Cancer* 32A:1205-1208.
- Brown, K.D. Robertson, K.D (2007) DNMT1 knockout delivers a strong blow to genome stability and cell viability. *Nat Genet* 39:289-290.
- Cai, X., Hagedorn, C.H Cullen, B.R (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10:1957-1966.

- Calin, G.A. Croce, C.M (2007) Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications. *J Clin Invest* 117:2059-2066.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D, Shimizu, M, Bichi, R, Zupo, S, Noch, E, Aldler, H, Rattan, S, Keating, M, Rai, K, Rassenti, L, Kipps, T, Negrini, M, Bullrich, F Croce, C.M (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15524-15529.
- Calin, G.A., Ferracin, M, Cimmino, A, Di Leva, G, Shimizu, M, Wojcik, S.E, Iorio, M.V, Visone, R, Sever, N.I, Fabbri, M, Iuliano, R, Palumbo, T, Pichiorri, F, Roldo, C, Garzon, R, Sevignani, C, Rassenti, L, Alder, H, Volinia, S, Liu, C, Kipps, T.J, Negrini, M Croce, C.M (2005) A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353:1793-1801.
- Calin, G.A., Sevignani, C, Dumitru, C.D, Hyslop, T, Noch, E, Yendamuri, S, Shimizu, M, Rattan, S, Bullrich, F, Negrini, M Croce, C.M (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2999-3004.
- Campanero, M., Armstrong, M Flemington, E (2000) CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6481-6486.
- Carter, S.L., Eklund, A.C, Kohane, I.S, Harris, L.N Szallasi, Z (2006) A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* 38:1043-1048.
- Casorzo, L., Luzzi, C, Nardacchione, A, Picciotto, F, Pisacane, A Risio, M (2005) Fluorescence in situ hybridization (FISH) evaluation of chromosomes 6, 7, 9 and 10 throughout human melanocytic tumorigenesis. *Melanoma Res* 15:155-160.
- Castanier, C. Arnoult, D (2010) [Mitochondrial dynamics during apoptosis.]. *Med Sci (Paris)* 26:830-835.
- Caterino, T.L. Hayes, J.J (2007) Chromatin structure depends on what's in the nucleosome's pocket. *Nat Struct Mol Biol* 14:1056-1058.
- Cattanach, B., Beechey, C Peters, J (2004) Interactions between imprinting effects in the mouse. *Genetics* 168:397-413.
- Cattanach, B., Beechey, C, Rasberry, C, Jones, J Papworth, D (1996) Time of initiation and site of action of the mouse chromosome 11 imprinting effects. *Genet Res* 68:35-44.
- Chang, S., Huang, T, Wang, K, Wang, T, Yang, Y, Chang, M.D, Wu, Y Wang, H (2008) Genetic network analysis of human CD34+ hematopoietic stem/precursor cells. *Taiwan J Obstet Gynecol* 47:422-430.
- Chedin, F., Lieber, M Hsieh, C (2002) The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16916-16921.

- Chen, T., Hevi, S, Gay, F, Tsujimoto, N, He, T, Zhang, B, Ueda, Y Li, E (2007) Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet* 39:391-396.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I, Kumaraswamy, E, Norman, J, Cooch, N, Nishikura, K Shiekhattar, R (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436:740-744.
- Chiarugi, P. Giannoni, E (2008) Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* 76:1352-1364.
- Chibon, F., Lagarde, P, Salas, S, Pérot, G, Brouste, V, Tirode, F, Lucchesi, C, de Reynies, A, Kauffmann, A, Bui, B, Terrier, P, Bonvalot, S, Le Cesne, A, Vince-Ranchère, D, Blay, J, Collin, F, Guillou, L, Leroux, A, Coindre, J Aurias, A (2010) Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nat Med* 16:781-787.
- Chibon, F., Mariani, O, Derré, J, Mairal, A, Coindre, J, Guillou, L, Sastre, X, Pédeutour, F Aurias, A (2004) ASK1 (MAP3K5) as a potential therapeutic target in malignant fibrous histiocytomas with 12q14-q15 and 6q23 amplifications. *Genes Chromosomes Cancer* 40:32-37.
- Chibon, F., Mariani, O, Derré, J, Malinge, S, Coindre, J.M, Guillou, L, Lagacé, R Aurias, A (2002) A subgroup of malignant fibrous histiocytomas is associated with genetic changes similar to those of well-differentiated liposarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 139:24-29.
- Chibon, F., Mariani, O, Mairal, A, Derré, J, Coindre, J, Terrier, P, Lagacé, R, Sastre, X Aurias, A (2003) The use of clustering software for the classification of comparative genomic hybridization data. an analysis of 109 malignant fibrous histiocytomas. *Cancer Genet Cytogenet* 141:75-78.
- Chiosea, S., Jelezcova, E, Chandran, U, Acquafondata, M, McHale, T, Sobol, R.W Dhir, R (2006) Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol* 169:1812-1820.
- Ciani, E., Frenquelli, M Contestabile, A (2003) Developmental expression of the cell cycle and apoptosis controlling gene, *Lot1*, in the rat cerebellum and in cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res Dev Brain Res* 142:193-202.
- Ciani, E., Hoffmann, A, Schmidt, P, Journot, L Spengler, D (1999) Induction of the PAC1-R (PACAP-type I receptor) gene by p53 and Zac. *Brain Res Mol Brain Res* 69:290-294.
- Coindre, J., Mariani, O, Chibon, F, Mairal, A, De Saint Aubain Somerhausen, N, Favre-Guillevin, E, Bui, N.B, Stoeckle, E, Hostein, I Aurias, A (2003) Most malignant fibrous histiocytomas developed in the retroperitoneum are dedifferentiated liposarcomas: a review of 25 cases initially diagnosed as malignant fibrous histiocytoma. *Mod Pathol* 16:256-262.
- Costello, J. Plass, C (2001) Methylation matters. *J Med Genet* 38:285-303.

Costello, J.F., Frühwald, M.C, Smiraglia, D.J, Rush, L.J, Robertson, G.P, Gao, X, Wright, F.A, Feramisco, J.D, Peltomäki, P, Lang, J.C, Schuller, D.E, Yu, L, Bloomfield, C.D, Caligiuri, M.A, Yates, A, Nishikawa, R, Su Huang, H, Petrelli, N.J, Zhang, X, O'Dorisio, M.S, Held, W.A, Cavenee, W.K Plass, C (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 24:132-138.

Cottrell, S.E. Laird, P.W (2003) Sensitive detection of DNA methylation. *Ann N Y Acad Sci* 983:120-130.

Cui, J., Li, Y, Sarkar, A, Brown, J, Tan, Y, Premyslova, M, Michaud, C, Iscove, N, Wang, G Ben-David, Y (2007) Retroviral insertional activation of the Fli-3 locus in erythroleukemias encoding a cluster of microRNAs that convert Epo-induced differentiation to proliferation. *Blood* 110:2631-2640.

De Bruin, E.C. Medema, J.P (2008) Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 34:737-749.

De Sario, A. (2009) Clinical and molecular overview of inherited disorders resulting from epigenomic dysregulation. *Eur J Med Genet* 52:363-372.

DeChiara, T.M., Efstratiadis, A Robertson, E.J (1990) A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345:78-80.

Dejeux, E., Rønneberg, J.A, Solvang, H, Bukholm, I, Geisler, S, Aas, T, Gut, I.G, Børresen-Dale, A, Lønning, P.E, Kristensen, V.N Tost, J (2010) DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumours identifies novel genes associated with survival and treatment response. *Mol Cancer* 9:68.

Deltour, S., Chopin, V Leprince, D (2005) [Epigenetics and cancer]. *Med Sci (Paris)* 21:405-411.

Denli, A.M., Tops, B.B.J, Plasterk, R.H.A, Ketting, R.F Hannon, G.J (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432:231-235.

Deplus, R., Brenner, C, Burgers, W, Putmans, P, Kouzarides, T, de Launoit, Y Fuks, F (2002) Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res* 30:3831-3838.

Desagher, S., Osen-Sand, A, Nichols, A, Eskes, R, Montessuit, S, Lauper, S, Maundrell, K, Antonsson, B Martinou, J.C (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144:891-901.

Diehl, F., Schmidt, K, Choti, M, Romans, K, Goodman, S, Li, M, Thornton, K, Agrawal, N, Sokoll, L, Szabo, S, Kinzler, K, Vogelstein, B Diaz, L (2008) Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 14:985-990.

Dodge, J., Ramsahoye, B, Wo, Z, Okano, M Li, E (2002) De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene* 289:41-48.

- Dodge, J.E., List, A.F Futscher, B.W (1998) Selective variegated methylation of the p15 CpG island in acute myeloid leukemia. *Int J Cancer* 78:561-567.
- Duan, R., Pak, C Jin, P (2007) Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum Mol Genet* 16:1124-1131.
- Dulaimi, E., Uzzo, R.G, Greenberg, R.E, Al-Saleem, T Cairns, P (2004) Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res* 10:1887-1893.
- Dusica, Cvetkovic,, Debra, Pisarcik,, Chan, Lee,, C, Hamilton, Thomas Abbas, Abdollahi, (2004) Altered expression and loss of heterozygosity of the LOT1 gene in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 95:449-455.
- El-Rifai, W., Sarlomo-Rikala, M, Knuutila, S Miettinen, M (1998) DNA copy number changes in development and progression in leiomyosarcomas of soft tissues. *Am J Pathol* 153:985-990.
- Eskes, R., Desagher, S, Antonsson, B Martinou, J.C (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20:929-935.
- Espada, J. Esteller, M (2009) DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin Cell Dev Biol* .
- Esteller, M. (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358:1148-1159.
- Esteller, M. Herman, J (2004) Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 23:1-8.
- Esteller, M., Corn, G, Baylin, P Herman, S (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61:3225-3229.
- Esteller, M., Gaidano, G, Goodman, S, Zagonel, V, Capello, D, Botto, B, Rossi, D, Ghoghini, A, Vitolo, U, Carbone, A, Baylin, S Herman, J (2002) Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 94:26-32.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J, Andion, E, Goodman, S, Hidalgo, O, Vanaclocha, V, Baylin, S Herman, J (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343:1350-1354.
- Fabbri, M., Garzon, R, Cimmino, A, Liu, Z, Zanesi, N, Callegari, E, Liu, S, Alder, H, Costinean, S, Fernandez-Cymering, C, Volinia, S, Guler, G, Morrison, C.D, Chan, K.K, Marcucci, G, Calin, G.A, Huebner, K Croce, C.M (2007) MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15805-15810.
- Falnes, P. Rognes, T (2003) DNA repair by bacterial AlkB proteins. *Res Microbiol* 154:531-538.

Feinberg, P. (2005) A genetic approach to cancer epigenetics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:335-341.

Feng, J. Fan, G (2009) The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders. *Int Rev Neurobiol* 89:67-84.

Ferreri, A., Dell'Oro, S, Capello, D, Ponzoni, M, Iuzzolino, P, Rossi, D, Pasini, F, Ambrosetti, A, Orvieto, E, Ferrarese, F, Arrigoni, G, Foppoli, M, Reni, M Gaidano, G (2004) Aberrant methylation in the promoter region of the reduced folate carrier gene is a potential mechanism of resistance to methotrexate in primary central nervous system lymphomas. *Br J Haematol* 126:657-664.

Ferreri, A.J.M., Dell'Oro, S, Capello, D, Ponzoni, M, Iuzzolino, P, Rossi, D, Pasini, F, Ambrosetti, A, Orvieto, E, Ferrarese, F, Arrigoni, G, Foppoli, M, Reni, M Gaidano, G (2004) Aberrant methylation in the promoter region of the reduced folate carrier gene is a potential mechanism of resistance to methotrexate in primary central nervous system lymphomas. *Br J Haematol* 126:657-664.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N Sonenberg, N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nat Rev Genet* 9:102-114.

Finnerty, J.R., Wang, W, Hébert, S.S, Wilfred, B.R, Mao, G Nelson, P.T (2010) The miR-15/107 Group of MicroRNA Genes: Evolutionary Biology, Cellular Functions, and Roles in Human Diseases. *J Mol Biol* :.

Fire, A., Xu, S, Montgomery, M.K, Kostas, S.A, Driver, S.E Mello, C.C (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.

Fukushima, T., Katayama, Y, Watanabe, T, Yoshino, A, Ogino, A, Ohta, T Komine, C (2005) Promoter hypermethylation of mismatch repair gene hMLH1 predicts the clinical response of malignant astrocytomas to nitrosourea. *Clin Cancer Res* 11:1539-1544.

G, Piras,, A, El Kharroubi,, S, Kozlov,, D, Escalante-Alcalde,, L, Hernandez,, G, Copeland, N, J, Gilbert, D, A, Jenkins, N L, Stewart, C (2000) *Zac1* (*Lot1*), a potential tumor suppressor gene, and the gene for epsilon-sarcoglycan are maternally imprinted genes: identification by a subtractive screen of novel uniparental fibroblast lines. *Mol Cell Biol* 20:3308-3315.

Gabory, A. Dandolo, L (2005) [Epigenetics and development: genomic imprinting]. *Med Sci (Paris)* 21:390-395.

Galluzzi, L., Blomgren, K Kroemer, G (2009) Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* 10:481-494.

Gardner, R.J., Mungall, A.J, Dunham, I, Barber, J.C, Shield, J.P, Temple, I.K Robinson, D.O (1999) Localisation of a gene for transient neonatal diabetes mellitus to an 18.72 cR3000 (approximately 5.4 Mb) interval on chromosome 6q. *J Med Genet* 36:192-196.

Gartler, S. Riggs, A (1983) Mammalian X-chromosome inactivation. *Annu Rev Genet* 17:155-190.

- Gerson, S.L. (2004) MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 4:296-307.
- Gibbons, R., Bachoo, S, Picketts, D, Aftimos, S, Asenbauer, B, Bergoffen, J, Berry, S, Dahl, N, Fryer, A, Keppler, K, Kurosawa, K, Levin, M, Masuno, M, Neri, G, Pierpont, M, Slaney, S, Higgs, D (1997) Mutations in transcriptional regulator ATRX establish the functional significance of a PHD-like domain. *Nat Genet* 17:146-148.
- Glick, D., Barth, S, Macleod, K (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 221:3-12.
- Grady, W.M., Rajput, A, Lutterbaugh, J.D, Markowitz, S.D (2001) Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Res* 61:900-902.
- Graff, J.R., Gabrielson, E, Fujii, H, Baylin, S.B, Herman, J.G (2000) Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem* 275:2727-2732.
- Grant, S, Chapman, V (1988) Mechanisms of X-chromosome regulation. *Annu Rev Genet* 22:199-233.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P, Cooch, N, Shiekhattar, R (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123:631-640.
- Gregory, R.I., Yan, K, Amuthan, G, Chendrimada, T, Doratotaj, B, Cooch, N, Shiekhattar, R (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432:235-240.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K, van Dongen, S, Enright, A.J (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36:D154-8.
- Grün, D., Wang, Y, Langenberger, D, Gunsalus, K.C, Rajewsky, N (2005) microRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets. *PLoS Comput Biol* 1:e13.
- Hammond, S.M., Boettcher, S, Caudy, A.A, Kobayashi, R, Hannon, G.J (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293:1146-1150.
- Han, J., Lee, Y, Yeom, K, Kim, Y, Jin, H, Kim, V.N (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18:3016-3027.
- Han, J., Lee, Y, Yeom, K, Nam, J, Heo, I, Rhee, J, Sohn, S.Y, Cho, Y, Zhang, B, Kim, V.N (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125:887-901.
- Hanahan, D, Weinberg, R.A (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.

- Hansen, L., Jensen, L, Dimitrakakis, C, Michalas, S, Gilbert, F, Barber, H, Overgaard, J, Arzimanoglou, I (2002) Allelic imbalance in selected chromosomal regions in ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 139:1-8.
- Hata, K., Kusumi, M, Yokomine, T, Li, E Sasaki, H (2006) Meiotic and epigenetic aberrations in Dnmt3L-deficient male germ cells. *Mol Reprod Dev* 73:116-122.
- Hata, K., Okano, M, Lei, H Li, E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 129:1983-1993.
- He, L. Hannon, G.J (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5:522-531.
- Healy, E., Belgaid, C, Takata, M, Harrison, D, Zhu, N.W, Burd, D.A, Rigby, H.S, Matthews, J.N Rees, J.L (1998) Prognostic significance of allelic losses in primary melanoma. *Oncogene* 16:2213-2218.
- Heinrich, M.C., Blanke, C.D, Druker, B.J Corless, C.L (2002) Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 20:1692-1703.
- Helman, L.J. Meltzer, P (2003) Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer* 3:685-694.
- Herman, J. (2004) Circulating methylated DNA. *Ann N Y Acad Sci* 1022:33-39.
- Herman, J. Baylin, S (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349:2042-2054.
- Hermann, A., Gowher, H Jeltsch, A (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 61:2571-2587.
- Hernandez-Vargas, H., Lambert, M, Le Calvez-Kelm, F, Gouysse, G, McKay-Chopin, S, Tavtigian, S.V, Scoazec, J Herceg, Z (2010) Hepatocellular carcinoma displays distinct DNA methylation signatures with potential as clinical predictors. *PLoS One* 5:e9749.
- Hide, T., Takezaki, T, Nakatani, Y, Nakamura, H, Kuratsu, J Kondo, T (2009) Sox11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation. *Cancer Res* 69:7953-7959.
- Hoffmann, A. Spengler, D (2008) A new coactivator function for Zc1's C2H2 zinc finger DNA-binding domain in selectively controlling PCAF activity. *Mol Cell Biol* 28:6078-6093.
- Hoffmann, A., Ciani, E, Boeckardt, J, Holsboer, F, Journot, L Spengler, D (2003) Transcriptional activities of the zinc finger protein Zac are differentially controlled by DNA binding. *Mol Cell Biol* 23:988-1003.

Hoffmann, A., Ciani, E, Houssami, S, Brabet, P, Journot, L Spengler, D (1998) Induction of type I PACAP receptor expression by the new zinc finger protein Zac1 and p53. *Ann N Y Acad Sci* 865:49-58.

Hoque, M., Begum, S, Topaloglu, O, Chatterjee, A, Rosenbaum, E, Van Criekinge, W, Westra, W, Schoenberg, M, Zahurak, M, Goodman, S Sidransky, D (2006) Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J Natl Cancer Inst* 98:996-1004.

Hoque, M., Topaloglu, O, Begum, S, Henrique, R, Rosenbaum, E, Van Criekinge, W, Westra, W Sidransky, D (2005) Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects. *J Clin Oncol* 23:6569-6575.

Horvai, A.E., Schaefer, J.T, Nakakura, E.K O'Donnell, R.J (2008) Immunostaining for peroxisome proliferator gamma distinguishes dedifferentiated liposarcoma from other retroperitoneal sarcomas. *Mod Pathol* 21:517-524.

Horvitz, H.R. Sternberg, P.W (1991) Multiple intercellular signalling systems control the development of the *Caenorhabditis elegans* vulva. *Nature* 351:535-541.

Hotchkiss, R.S. Nicholson, D.W (2006) Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 6:813-822.

Hu, J., Khanna, V, Jones, M Surti, U (2001) Genomic alterations in uterine leiomyosarcomas: potential markers for clinical diagnosis and prognosis. *Genes Chromosomes Cancer* 31:117-124.

Huang, S.M., Schönthal, A.H Stallcup, M.R (2001) Enhancement of p53-dependent gene activation by the transcriptional coactivator Zac1. *Oncogene* 20:2134-2143.

Hui, A.B.Y., Lenarduzzi, M, Krushel, T, Waldron, L, Pintilie, M, Shi, W, Perez-Ordóñez, B, Jurisica, I, O'Sullivan, B, Waldron, J, Gullane, P, Cummings, B Liu, F (2010) Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 16:1129-1139.

Hutvagner, G., McLachlan, J, Pasquinelli, A.E, Bálint, E, Tuschl, T Zamore, P.D (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293:834-838.

Höck, J. Meister, G (2008) The Argonaute protein family. *Genome Biol* 9:210.

Ibanez de Caceres, I., Battagli, C, Esteller, M, Herman, J.G, Dulaimi, E, Edelson, M.I, Bergman, C, Ehya, H, Eisenberg, B.L Cairns, P (2004) Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Cancer Res* 64:6476-6481.

Iguchi-Arigo, S. Schaffner, W (1989) CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 3:612-619.

Iorio, M.V., Visone, R, Di Leva, G, Donati, V, Petrocca, F, Casalini, P, Taccioli, C, Volinia, S, Liu, C, Alder, H, Calin, G.A, Ménard, S Croce, C.M (2007) MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 67:8699-8707.

Issa, J. (2007) DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* 13:1634-1637.

Issa, J., Vertino, P, Wu, J, Sazawal, S, Celano, P, Nelkin, B, Hamilton, S Baylin, S (1993) Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 85:1235-1240.

Jaenisch, R. Bird, A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl:245-254.

Jahr, S., Hentze, H, Englisch, S, Hardt, D, Fackelmayer, F, Hesch, R Knippers, R (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 61:1659-1665.

Jenuwein, T. Allis, C (2001) Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.

Jin, P., Alisch, R.S Warren, S.T (2004) RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* 6:1048-1053.

Johnson, A.C., Kageyama, R, Popescu, N.C Pastan, I (1992) Expression and chromosomal localization of the gene for the human transcriptional repressor GCF. *J Biol Chem* 267:1689-1694.

Jones, P.A. Baylin, S.B (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* 128:683-692.

Jones, P.L., Veenstra, G.J, Wade, P.A, Vermaak, D, Kass, S.U, Landsberger, N, Strouboulis, J Wolffe, A.P (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19:187-191.

Jüttermann, R., Li, E Jaenisch, R (1994) Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11797-11801.

Kaludov, N.K. Wolffe, A.P (2000) MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res* 28:1921-1928.

Kamikihara, T., Arima, T, Kato, K, Matsuda, T, Kato, H, Douchi, T, Nagata, Y, Nakao, M Wake, N (2005) Epigenetic silencing of the imprinted gene ZAC by DNA methylation is an early event in the progression of human ovarian cancer. *Int J Cancer* 115:690-700.

Kamiya, M., Judson, H, Okazaki, Y, Kusakabe, M, Muramatsu, M, Takada, S, Takagi, N, Arima, T, Wake, N, Kamimura, K, Satomura, K, Hermann, R, Bonthron, D.T Hayashizaki, Y (2000) The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted--a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. *Hum Mol Genet* 9:453-460.

Kanai, Y., Ushijima, S, Kondo, Y, Nakanishi, Y Hirohashi, S (2001) DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int J Cancer* 91:205-212.

Karayan-Tapon, L., Quillien, V, Guilhot, J, Wager, M, Fromont, G, Saikali, S, Etcheverry, A, Hamlat, A, Loussouarn, D, Campion, L, Campone, M, Vallette, F Gratas-Rabbia-Ré, C (2010) Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol* 97:311-322.

Kas, K., Voz, M, Hensen, K, Meyen, E Van de Ven, W (1998) Transcriptional activation capacity of the novel PLAG family of zinc finger proteins. *J Biol Chem* 273:23026-23032.

Kass, S., Pruss, D Wolffe, A (1997) How does DNA methylation repress transcription?. *Trends Genet* 13:444-449.

Katz, S.C. DeMatteo, R.P (2008) Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcomas. *J Surg Oncol* 97:350-359.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H Currie, A.R (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.

Ketting, R.F., Fischer, S.E, Bernstein, E, Sijen, T, Hannon, G.J Plasterk, R.H (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15:2654-2659.

Kiriakidou, M., Nelson, P.T, Kouranov, A, Fitziev, P, Bouyioukos, C, Mourelatos, Z Hatzigeorgiou, A (2004) A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 18:1165-1178.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S, Behrmann, I, Germer, M, Pawlita, M, Krammer, P.H Peter, M.E (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14:5579-5588.

Klose, R. Bird, A (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31:89-97.

Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E, Green, D.R Newmeyer, D.D (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132-1136.

Kornberg, R. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184:868-871.

Kroemer, G., El-Deiry, W.S, Golstein, P, Peter, M.E, Vaux, D, Vandenabeele, P, Zhivotovsky, B, Blagosklonny, M.V, Malorni, W, Knight, R.A, Piacentini, M, Nagata, S, Melino, G (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1463-1467.

Krol, J., Sobczak, K, Wilczynska, U, Drath, M, Jasinska, A, Kaczynska, D Krzyzosiak, W.J (2004) Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA

biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. *J Biol Chem* 279:42230-42239.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W Tuschl, T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-858.

Lai, E.C. (2002) Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30:363-364.

Lanaspa, M., Andres-Hernando, A, Rivard, C, Dai, Y, Li, N Berl, T (2009) ZAC1 is up-regulated by hypertonicity and decreases sorbitol dehydrogenase expression, allowing accumulation of sorbitol in kidney cells. *J Biol Chem* 284:19974-19981.

Landrette, S.F., Kuo, Y, Hensen, K, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S, Perrat, P.N, Van de Ven, W.J.M, Delwel, R Castilla, L.H (2005) Plag1 and Plagl2 are oncogenes that induce acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfb-MYH11. *Blood* 105:2900-2907.

Larramendy, M.L., Tarkkanen, M, Blomqvist, C, Virolainen, M, Wiklund, T, Asko-Seljavaara, S, Elomaa, I Knuutila, S (1997) Comparative genomic hybridization of malignant fibrous histiocytoma reveals a novel prognostic marker. *Am J Pathol* 151:1153-1161.

Lau, N.C., Lim, L.P, Weinstein, E.G Bartel, D.P (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858-862.

Leal, M.F., Lima, E.M, Silva, P, Assumpção, P, Calcagno, D, Payão, S, Burbano, R Smith, M (2007) Promoter hypermethylation of CDH1, FHIT, MTAP and PLAGL1 in gastric adenocarcinoma in individuals from Northern Brazil. *World J Gastroenterol* 13:2568-2574.

Lee, R.C. Ambros, V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:862-864.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L Ambros, V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854.

Lee, Y., Ahn, C, Han, J, Choi, H, Kim, J, Yim, J, Lee, J, Provost, P, Rådmark, O, Kim, S Kim, V.N (2003) The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-419.

Lee, Y., Hur, I, Park, S, Kim, Y, Suh, M.R Kim, V.N (2006) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 25:522-532.

Lee, Y., Kim, M, Han, J, Yeom, K, Lee, S, Baek, S.H Kim, V.N (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23:4051-4060.

Lemeta, S., Jarmalaite, S, Pylkkänen, L, Böhling, T Husgafvel-Pursiainen, K (2007) Preferential loss of the nonimprinted allele for the ZAC1 tumor suppressor gene in human capillary hemangioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:860-867.

- Lemeta, S., Salmenkivi, K, Pykkänen, L, Sainio, M, Saarikoski, S, Arola, J, Heikkilä, P, Haglund, C, Husgafvel-Pursiainen, K Böhling, T (2006) Frequent loss of heterozygosity at 6q in pheochromocytoma. *Hum Pathol* 37:749-754.
- Lewis, A., Mitsuya, K, Umlauf, D, Smith, P, Dean, W, Walter, J, Higgins, M, Feil, R Reik, W (2004) Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat Genet* 36:1291-1295.
- Lewis, B.P., Shih, I, Jones-Rhoades, M.W, Bartel, D.P Burge, C.B (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115:787-798.
- Li E, Bestor H Jaenisch TR (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926.
- Li, H., Zhu, H, Xu, C.J Yuan, J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Li, L., Okino, S.T, Zhao, H, Pookot, D, Place, R.F, Urakami, S, Enokida, H Dahiya, R (2006) Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17337-17342.
- Lim, L.P., Glasner, M.E, Yekta, S, Burge, C.B Bartel, D.P (2003) Vertebrate microRNA genes. *Science* 299:1540.
- Lingel, A. Sattler, M (2005) Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway. *Curr Opin Struct Biol* 15:107-115.
- Linsley, P.S., Schelter, J, Burchard, J, Kibukawa, M, Martin, M.M, Bartz, S.R, Johnson, J.M, Cummins, J.M, Raymond, C.K, Dai, H, Chau, N, Cleary, M, Jackson, A.L, Carleton, M Lim, L (2007) Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 27:2240-2252.
- Liu, P., Chan, J.Y, Lin, H, Wang, S, Liu, S, Ho, C, Chang, L Huang, S (2008) Modulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1) gene by Zac1 through the antagonistic regulators p53 and histone deacetylase 1 in HeLa Cells. *Mol Cancer Res* 6:1204-1214.
- Lopes, S., Lewis, A, Hajkova, P, Dean, W, Oswald, J, Forné, T, Murrell, A, Constância, M, Bartolomei, M, Walter, J Reik, W (2003) Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Hum Mol Genet* 12:295-305.
- Lopez-Serra, L., Ballestar, E, Roperio, S, Setien, F, Billard, L, Fraga, M.F, Lopez-Nieva, P, Alaminos, M, Guerrero, D, Dante, R Esteller, M (2008) Unmasking of epigenetically silenced candidate tumor suppressor genes by removal of methyl-CpG-binding domain proteins. *Oncogene* 27:3556-3566.
- Lu, J., Getz, G, Miska, E.A, Alvarez-Saavedra, E, Lamb, J, Peck, D, Sweet-Cordero, A, Ebert, B.L, Mak, R.H, Ferrando, A.A, Downing, J.R, Jacks, T, Horvitz, H.R Golub, T.R (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-838.

Lujambio, A., Ropero, S, Ballestar, E, Fraga, M.F, Cerrato, C, Setién, F, Casado, S, Suarez-Gauthier, A, Sanchez-Cespedes, M, Git, A, Spiteri, I, Das, P.P, Caldas, C, Miska, E Esteller, M (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 67:1424-1429.

MANDEL, P. METAIS, P (1948) [Not Available.]. *C R Seances Soc Biol Fil* 142:241-243.

Ma, D., Shield, J.P.H, Dean, W, Leclerc, I, Knauf, C, Burcelin R, R.É, Rutter, G.A Kelsey, G (2004) Impaired glucose homeostasis in transgenic mice expressing the human transient neonatal diabetes mellitus locus, TNDM. *J Clin Invest* 114:339-348.

Ma, L., Cantrup, R, Varrault, A, Colak, D, Klenin, N, Götz, M, McFarlane, S, Journot, L Schuurmans, C (2007) Zac1 functions through TGFbetaII to negatively regulate cell number in the developing retina. *Neural Dev* 2:11.

Mairal, A., Terrier, P, Chibon, F, Sastre, X, Lecesne, A Aurias, A (1999) Loss of chromosome 13 is the most frequent genomic imbalance in malignant fibrous histiocytomas A comparative genomic hybridization analysis of a series of 30 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 111:134-138.

Maniataki, E. Mourelatos, Z (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 19:2979-2990.

Maraschio, P., Zuffardi, O, Dalla Fior, T Tiepolo, L (1988) Immunodeficiency, centromeric heterochromatin instability of chromosomes 1, 9, and 16, and facial anomalies: the ICF syndrome. *J Med Genet* 25:173-180.

Martinez, J., Patkaniowska, A, Urlaub, H, Lührmann, R Tuschl, T (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110:563-574.

Mazière, P. Enright, A.J (2007) Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today* 12:452-458.

McGrath, J. Solter, D (1983) Nuclear transplantation in mouse embryos. *J Exp Zool* 228:355-362.

Medema, J.P., Scaffidi, C, Kischkel, F.C, Shevchenko, A, Mann, M, Krammer, P.H Peter, M.E (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 16:2794-2804.

Meister, G., Landthaler, M, Patkaniowska, A, Dorsett, Y, Teng, G Tuschl, T (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15:185-197.

Michalowski, M., de Fraipont, F, Plantaz, D, Michelland, S, Combaret, V Favrot, M (2008) Methylation of tumor-suppressor genes in neuroblastoma: The RASSF1A gene is almost always methylated in primary tumors. *Pediatr Blood Cancer* 50:29-32.

Miettinen, M. Lasota, J (2001) Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 438:1-12.

- Mishra, P.J. (2009) MicroRNA polymorphisms: a giant leap towards personalized medicine. *Per Med* 6:119-125.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K, Kroh, E.M, Fritz, B.R, Wyman, S.K, Pogosova-Agadjanyan, E.L, Peterson, A, Noteboom, J, O'Briant, K.C, Allen, A, Lin, D.W, Urban, N, Drescher, C.W, Knudsen, B.S, Stirewalt, D.L, Gentleman, R, Vessella, R.L, Nelson, P.S, Martin, D.B Tewari, M (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10513-10518.
- Miyakawa, A., Ichimura, K, Schmidt, E.E, Varmeh-Ziaie, S Collins, V.P (2000) Multiple deleted regions on the long arm of chromosome 6 in astrocytic tumours. *Br J Cancer* 82:543-549.
- Monni, O., Oinonen, R, Elonen, E, Franssila, K, Teerenhovi, L, Joensuu, H Knuutila, S (1998) Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 21:298-307.
- Movassagh, M., Choy, M, Goddard, M, Bennett, M, Down, T Foo, R (2010) Differential DNA methylation correlates with differential expression of angiogenic factors in human heart failure. *PLoS One* 5:e8564.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M, Kischkel, F.C, O'Rourke, K, Shevchenko, A, Ni, J, Scaffidi, C, Bretz, J.D, Zhang, M, Gentz, R, Mann, M, Krammer, P.H, Peter, M.E Dixit, V.M (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827.
- Nabils, N.H., Broaddus, R.R Loose, D.S (2009) DNA methylation inhibits p53-mediated survivin repression. *Oncogene* 28:2046-2050.
- Nakao, M. (2001) Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278:25-31.
- Nan, X. Bird, A (2001) The biological functions of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 and its implication in Rett syndrome. *Brain Dev* 23 Suppl 1:S32-7.
- Nan, X., Ng, H.H, Johnson, C.A, Laherty, C.D, Turner, B.M, Eisenman, R.N Bird, A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386-389.
- Napoli, C., Lemieux, C Jorgensen, R (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289.
- Ng, E., Chong, W, Jin, H, Lam, E.K.Y, Shin, V.Y, Yu, J, Poon, T.C.W, Ng, S.S.M Sung, J.J.Y (2009) Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 58:1375-1381.

Ollikainen, M., Smith, K, Joo, E, Ng, H, Andronikos, R, Novakovic, B, Abdul Aziz, N, Carlin, J, Morley, R, Saffery, R, Craig, J (2010) DNA methylation analysis of multiple tissues from newborn twins reveals both genetic and intrauterine components to variation in the human neonatal epigenome. *Hum Mol Genet* :

Pagotto, U., Arzberger, T, Theodoropoulou, M, Grübler, Y, Pantaloni, C, Saeger, W, Losa, M, Journot, L, Stalla, G, Spengler, D (2000) The expression of the antiproliferative gene ZAC is lost or highly reduced in nonfunctioning pituitary adenomas. *Cancer Res* 60:6794-6799.

Pallasch, C.P., Patz, M, Park, Y.J, Hagist, S, Eggle, D, Claus, R, Debey-Pascher, S, Schulz, A, Frenzel, L.P, Claasen, J, Kutsch, N, Krause, G, Mayr, C, Rosenwald, A, Plass, C, Schultze, J.L, Hallek, M, Wendtner, C (2009) miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 114:3255-3264.

Palmisano, W.A., Divine, K.K, Saccomanno, G, Gilliland, F.D, Baylin, S.B, Herman, J.G, Belinsky, S.A (2000) Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 60:5954-5958.

Pao, M.M., Tsutsumi, M, Liang, G, Uzvolgyi, E, Gonzales, F.A, Jones, P.A (2001) The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells. *Hum Mol Genet* 10:903-910.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J, Slack, F, Martindale, M.Q, Kuroda, M.I, Maller, B, Hayward, D.C, Ball, E.E, Degnan, B, Müller, P, Spring, J, Srinivasan, A, Fishman, M, Finnerty, J, Corbo, J, Levine, M, Leahy, P, Davidson, E, Ruvkun, G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86-89.

Paulsen, M. Ferguson-Smith, A (2001) DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* 195:97-110.

Paz, M., Yaya-Tur, R, Rojas-Marcos, I, Reynes, G, Pollan, M, Aguirre-Cruz, L, García-Lopez, J, Piquer, J, Safont, M, Balaña, C, Sanchez-Cespedes, M, García-Villanueva, M, Arribas, L, Esteller, M (2004) CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res* 10:4933-4938.

Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.

Pipaon, C., Real, P.J, Fernandez-Luna, J.L (2005) Defective binding of transcriptional repressor ZEB via DNA methylation contributes to increased constitutive levels of p73 in Fanconi anemia cells. *FEBS Lett* 579:4610-4614.

Piras, G., El Kharroubi, A, Kozlov, S, Escalante-Alcalde, D, Hernandez, L, Copeland, N, Gilbert, D, Jenkins, N, Stewart, C (2000) *Zac1* (*Lot1*), a potential tumor suppressor gene, and the gene for epsilon-sarcoglycan are maternally imprinted genes: identification by a subtractive screen of novel uniparental fibroblast lines. *Mol Cell Biol* 20:3308-3315.

- Plumb, J.A., Strathdee, G, Sludden, J, Kaye, S.B Brown, R (2000) Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* 60:6039-6044.
- Poulin, H. Labelle, Y (2005) The PLAGL1 gene is down-regulated in human extraskeletal myxoid chondrosarcoma tumors. *Cancer Lett* 227:185-191.
- Pradhan, S. Esteve, P (2003) Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. *Clin Immunol* 109:6-16.
- Prendergast, G. Ziff, E (1991) Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 251:186-189.
- Reik, W. Murrell, A (2000) Genomic imprinting. Silence across the border. *Nature* 405:408-409.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J, Basson, M, Pasquinelli, A.E, Bettinger, J.C, Rougvie, A.E, Horvitz, H.R Ruvkun, G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901-906.
- Renedo, M., Martinez-Delgado, B, Arranz, E, Garcia, M, Urioste, M, Martinez-Ramirez, A, Rivas, C, Cigudosa, J.C Benitez, I (2001) Chromosomal changes pattern and gene amplification in T cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 15:1627-1632.
- Rhee, I., Bachman, K, Park, B, Jair, K, Yen, R, Schuebel, K, Cui, H, Feinberg, A, Lengauer, C, Kinzler, K, Baylin, S Vogelstein, B (2002) DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416:552-556.
- Richiardi, L., Fiano, V, Vizzini, L, De Marco, L, Delsedime, L, Akre, O, Tos, A.G Merletti, F (2009) Promoter methylation in APC, RUNX3, and GSTP1 and mortality in prostate cancer patients. *J Clin Oncol* 27:3161-3168.
- Riggs, A. (2002) X chromosome inactivation, differentiation, and DNA methylation revisited, with a tribute to Susumu Ohno. *Cytogenet Genome Res* 99:17-24.
- Robertson KD, W.A. (2000) DNA methylation in health and disease.. *NATURE REVIEW GENETICS* 1:11.
- Robertson, K. (2002) DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* 21:5361-5379.
- Robertson, K., Uzvolgyi, E, Liang, G, Talmadge, C, Sumegi, J, Gonzales, F Jones, P (1999) The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 27:2291-2298.
- Rotonda, J., Nicholson, D.W, Fazil, K.M, Gallant, M, Gareau, Y, Labelle, M, Peterson, E.P, Rasper, D.M, Ruel, R, Vaillancourt, J.P, Thornberry, N.A Becker, J.W (1996) The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3:619-625.

Rougeulle, C. Heard, E (2002) Antisense RNA in imprinting: spreading silence through Air. *Trends Genet* 18:434-437.

Rozenfeld-Granot, G., Krishnamurthy, J, Kannan, K, Toren, A, Amariglio, N, Givol, D Rechavi, G (2002) A positive feedback mechanism in the transcriptional activation of Apaf-1 by p53 and the coactivator Zac-1. *Oncogene* 21:1469-1476.

Röhrs, S., Dirks, W.G, Meyer, C, Marschalek, R, Scherr, M, Slany, R, Wallace, A, Drexler, H.G Quentmeier, H (2009) Hypomethylation and expression of BEX2, IGSF4 and TIMP3 indicative of MLL translocations in acute myeloid leukemia. *Mol Cancer* 8:86.

Saito, Y. Berk, B (2001) Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol* 33:3-7.

Saito, Y., Liang, G, Egger, G, Friedman, J.M, Chuang, J.C, Coetzee, G.A Jones, P.A (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9:435-443.

Salvesen, G.S. Dixit, V.M (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10964-10967.

Sandberg, A.A. (2004) Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: liposarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 155:1-24.

Sandberg, A.A. (2005) Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: leiomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 161:1-19.

Sandberg, A.A. Bridge, J.A (2002) Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 135:1-22.

Santini, V., Kantarjian, H Issa, J (2001) Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 134:573-586.

Sasaki, T., Shiohama, A, Minoshima, S Shimizu, N (2003) Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics* 82:323-330.

Satzger, I., Mattern, A, Kuettler, U, Weinspach, D, Voelker, B, Kapp, A Gutzmer, R (2010) MicroRNA-15b represents an independent prognostic parameter and is correlated with tumor cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma. *Int J Cancer* 126:2553-2562.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D, Los, M, Wesselborg, S Peter, M.E (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254:439-459.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G, Du, T, Xu, Z, Aronin, N Zamore, P.D (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208.

Shuman, S. (1991) Site-specific interaction of vaccinia virus topoisomerase I with duplex DNA. Minimal DNA substrate for strand cleavage in vitro. *J Biol Chem* 266:20576-20577.

Simons, A., Schepens, M, Jeuken, J, Sprenger, S, van de Zande, G, Bjerkehagen, B, Forus, A, Weibolt, V, Molenaar, I, van den Berg, E, Myklebost, O, Bridge, J, van Kessel, A.G Suijkerbuijk, R (2000) Frequent loss of 9p21 (p16(INK4A)) and other genomic imbalances in human malignant fibrous histiocytoma. *Cancer Genet Cytogenet* 118:89-98.

Sleutels, F., Zwart, R Barlow, D (2002) The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 415:810-813.

Smyth, G. (2005) Limma: linear models for microarray data
. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and* :397-420.

Soder, A.I., Hoare, S.F, Muir, S, Going, J.J, Parkinson, E.K Keith, W.N (1997) Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene* 14:1013-1021.

Sohn, B.H., Park, I.Y, Lee, J.J, Yang, S, Jang, Y.J, Park, K.C, Kim, D.J, Lee, D.C, Sohn, H.A, Kim, T.W, Yoo, H, Choi, J.Y, Bae, Y.S Yeom, Y.I (2010) Functional switching of TGF-beta1 signaling in liver cancer via epigenetic modulation of a single CpG site in TTP promoter. *Gastroenterology* 138:1898-1908.

Sonkoly, E., Wei, T, Janson, P.C.J, Sääf, A, Lundeberg, L, Tengvall-Linder, M, Norstedt, G, Alenius, H, Homey, B, Scheynius, A, Stähle, M Pivarcsi, A (2007) MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis?. *PLoS One* 2:e610.

Spengler, D., Villalba, M, Hoffmann, A, Pantaloni, C, Houssami, S, Bockaert, J Journot, L (1997) Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain. *EMBO J* 16:2814-2825.

Spengler, D., Waeber, C, Pantaloni, C, Holsboer, F, Bockaert, J, Seeburg, P.H Journot, L (1993) Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* 365:170-175.

Steuber, C., Krischer, J, Holbrook, T, Camitta, B, Land, V, Sexauer, C, Mahoney, D Weinstein, H (1996) Therapy of refractory or recurrent childhood acute myeloid leukemia using amsacrine and etoposide with or without azacitidine: a Pediatric Oncology Group randomized phase II study. *J Clin Oncol* 14:1521-1525.

Stirzaker, C., Millar, D.S, Paul, C.L, Warnecke, P.M, Harrison, J, Vincent, P.C, Frommer, M Clark, S.J (1997) Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res* 57:2229-2237.

Subramanian, S., Lui, W.O, Lee, C.H, Espinosa, I, Nielsen, T.O, Heinrich, M.C, Corless, C.L, Fire, A.Z van de Rijn, M (2008) MicroRNA expression signature of human sarcomas. *Oncogene* 27:2015-2026.

Suetake, I., Shinozaki, F, Miyagawa, J, Takeshima, H Tajima, S (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* 279:27816-27823.

Surani, M.A. Barton, S.C (1983) Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science* 222:1034-1036.

Surani, M.A., Barton, S.C Norris, M.L (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308:548-550.

Suster, S. Fisher, C (1997) Immunoreactivity for the human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in lipomatous tumors. *Am J Surg Pathol* 21:195-200.

Svarvar, C., Larramendy, M, Blomqvist, C, Gentile, M, Koivisto-Korander, R, Leminen, A, Bützow, R, Böhling, T Knuutila, S (2006) Do DNA copy number changes differentiate uterine from non-uterine leiomyosarcomas and predict metastasis?. *Mod Pathol* 19:1068-1082.

Takanabe, R., Ono, K, Abe, Y, Takaya, T, Horie, T, Wada, H, Kita, T, Satoh, N, Shimatsu, A Hasegawa, K (2008) Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 376:728-732.

Takeshita, F., Patrawala, L, Osaki, M, Takahashi, R, Yamamoto, Y, Kosaka, N, Kawamata, M, Kelnar, K, Bader, A.G, Brown, D Ochiya, T (2010) Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther* 18:181-187.

Tan, L., Bianco, T Dobrovic, A (2002) Variable promoter region CpG island methylation of the putative tumor suppressor gene Connexin 26 in breast cancer. *Carcinogenesis* 23:231-236.

Tanaka, M., Oikawa, K, Takanashi, M, Kudo, M, Ohyashiki, J, Ohyashiki, K Kuroda, M (2009) Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One* 4:e5532.

Tang, X., Tang, G Ozcan, S (2008) Role of microRNAs in diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1779:697-701.

Taylor, R.C., Cullen, S.P Martin, S.J (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231-241.

Temple, I.K., Gardner, R.J, Robinson, D.O, Kibirige, M.S, Ferguson, A.W, Baum, J.D, Barber, J.C, James, R.S Shield, J.P (1996) Further evidence for an imprinted gene for neonatal diabetes localised to chromosome 6q22-q23. *Hum Mol Genet* 5:1117-1121.

Tessema, M., Willink, R, Do, K, Yu, Y.Y, Yu, W, Machida, E.O, Brock, M, Van Neste, L, Stidley, C.A, Baylin, S.B Belinsky, S.A (2008) Promoter methylation of genes in and around the candidate lung cancer susceptibility locus 6q23-25. *Cancer Res* 68:1707-1714.

Theodoropoulou, M., Tichomirowa, M, Sievers, C, Yassouridis, A, Arzberger, T, Hougrand, O, Deprez, M, Daly, A, Petrossians, P, Pagotto, U, Beckers, A Stalla, G (2009) Tumor ZAC1 expression is associated with the response to somatostatin analog therapy in patients with acromegaly. *Int J Cancer* 125:2122-2126.

Thornberry, N.A. (1998) Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 5:R97-103.

Tibiletti, M.G., Bernasconi, B, Furlan, D, Bressan, P, Cerutti, R, Facco, C, Franchi, M, Riva, C, Cinquetti, R, Capella, C Taramelli, R (2001) Chromosome 6 abnormalities in ovarian surface epithelial tumors of borderline malignancy suggest a genetic continuum in the progression model of ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res* 7:3404-3409.

Tokumaru, Y., Harden, S, Sun, D, Yamashita, K, Epstein, J Sidransky, D (2004) Optimal use of a panel of methylation markers with GSTP1 hypermethylation in the diagnosis of prostate adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 10:5518-5522.

Toyota, M., Suzuki, H, Yamashita, T, Hirata, K, Imai, K, Tokino, T Shinomura, Y (2009) Cancer epigenomics: implications of DNA methylation in personalized cancer therapy. *Cancer Sci* 100:787-791.

Tsang, J. Lo, Y (2007) Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology* 39:197-207.

Tsuji, K., Kawauchi, S, Saito, S, Furuya, T, Ikemoto, K, Nakao, M, Yamamoto, S, Oka, M, Hirano, T Sasaki, K (2010) Breast cancer cell lines carry cell line-specific genomic alterations that are distinct from aberrations in breast cancer tissues: comparison of the CGH profiles between cancer cell lines and primary cancer tissues. *BMC Cancer* 10:15.

Turner, B. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22:836-845.

Turner, B. (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell* 111:285-291.

Vakifahmetoglu, H., Olsson, M Zhiotovskiy, B (2008) Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 15:1153-1162.

Valente, T. Auladell, C (2001) Expression pattern of *Zac1* mouse gene, a new zinc-finger protein that regulates apoptosis and cellular cycle arrest, in both adult brain and along development. *Mech Dev* 108:207-211.

Valente, T., Junyent, F Auladell, C (2005) *Zac1* is expressed in progenitor/stem cells of the neuroectoderm and mesoderm during embryogenesis: differential phenotype of the *Zac1*-expressing cells during development. *Dev Dyn* 233:667-679.

Valleley, E., Cordery, S Bonthron, D (2007) Tissue-specific imprinting of the *ZAC/PLAGL1* tumour suppressor gene results from variable utilization of monoallelic and biallelic promoters. *Hum Mol Genet* 16:972-981.

Van Den Bosch, L., Storkebaum, E, Vleminckx, V, Moons, L, Vanopdenbosch, L, Scheveneels, W, Carmeliet, P Robberecht, W (2004) Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis* 17:21-28.

Van der Velden, V.H.J., Hochhaus, A, Cazzaniga, G, Szczepanski, T, Gabert, J van Dongen, J.J.M (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17:1013-1034.

Van Dyck, F., Declercq, J, Braem, C.V Van de Ven, W.J.M (2007) *PLAG1*, the prototype of the *PLAG* gene family: versatility in tumour development (review). *Int J Oncol* 30:765-774.

Vanhaecke, T., Henkens, T, Kass, G Rogiers, V (2004) Effect of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A on spontaneous apoptosis in various types of adult rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* 68:753-760.

Varrault, A., Bilanges, B, Mackay, D, Basyuk, E, Ahr, B, Fernandez, C, Robinson, D, Bockaert, J Journot, L (2001) Characterization of the methylation-sensitive promoter of the imprinted ZAC gene supports its role in transient neonatal diabetes mellitus. *J Biol Chem* 276:18653-18656.

Varrault, A., Ciani, E, Apiou, F, Bilanges, B, Hoffmann, A, Pantaloni, C, Bockaert, J, Spengler, D Journot, L (1998) hZAC encodes a zinc finger protein with antiproliferative properties and maps to a chromosomal region frequently lost in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8835-8840.

Varrault, A., Gueydan, C, Delalbre, A, Bellmann, A, Houssami, S, Aknin, C, Severac, D, Chotard, L, Kahli, M, Le Digarcher, A, Pavlidis, P Journot, L (2006) Zac1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. *Dev Cell* 11:711-722.

Vasudevan, S., Tong, Y Steitz, J.A (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318:1931-1934.

Vasudevan, S., Tong, Y Steitz, J.A (2008) Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 7:1545-1549.

Vaux, D.L. Korsmeyer, S.J (1999) Cell death in development. *Cell* 96:245-254.

Veeck, J., Wild, P.J, Fuchs, T, Schüffler, P.J, Hartmann, A, Knüchel, R Dahl, E (2009) Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (DKK3) promoter methylation in human breast cancer. *BMC Cancer* 9:217.

Vinodhkumar, R., Song, Y Devaki, T (2008) Romidepsin (depsipeptide) induced cell cycle arrest, apoptosis and histone hyperacetylation in lung carcinoma cells (A549) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression. *Biomed Pharmacother* 62:85-93.

Wallrapp, C., Müller-Pillasch, F, Solinas-Toldo, S, Lichter, P, Friess, H, Büchler, M, Fink, T, Adler, G Gress, T.M (1997) Characterization of a high copy number amplification at 6q24 in pancreatic cancer identifies c-myc as a candidate oncogene. *Cancer Res* 57:3135-3139.

Wang, W., Rajeev, B.W, Stromberg, A.J, Ren, N, Tang, G, Huang, Q, Rigoutsos, I Nelson, P.T (2008) The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci* 28:1213-1223.

Wang, X., Reyes, J.L, Chua, N Gaasterland, T (2004) Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol* 5:R65.

- Wang, Y.X., Zhang, X.Y, Zhang, B.F, Yang, C.Q, Chen, X.M Gao, H.J (2010) Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis. *J Dig Dis* 11:50-54.
- Wassenegger, M., Heimes, S, Riedel, L Sanger, H.L (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76:567-576.
- Weber-Hall, S., Anderson, J, McManus, A, Abe, S, Nojima, T, Pinkerton, R, Pritchard-Jones, K Shipley, J (1996) Gains, losses, and amplification of genomic material in rhabdomyosarcoma analyzed by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 56:3220-3224.
- Weber-Hall, S., McManus, A, Anderson, J, Nojima, T, Abe, S, Pritchard-Jones, K Shipley, J (1996) Novel formation and amplification of the PAX7-FKHR fusion gene in a case of alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 17:7-13.
- Willemze, R., Suci, S, Archimbaud, E, Muus, P, Stryckmans, P, Louwagie, E, Berneman, Z, Tjean, M, Wijermans, P, Dohner, H, Jehn, U, Labar, B, Jaksic, B, Dardenne, M Zittoun, R (1997) A randomized phase II study on the effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine combined with either amsacrine or idarubicin in patients with relapsed acute leukemia: an EORTC Leukemia Cooperative Group phase II study (06893). *Leukemia* 11 Suppl 1:S24-7.
- Wilson, K.P., Black, J.A, Thomson, J.A, Kim, E.E, Griffith, J.P, Navia, M.A, Murcko, M.A, Chambers, S.P, Aldape, R.A, Raybuck, S.A et al. (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370:270-275.
- Wutz, A., Smrzka, O.W, Schweifer, N, Schellander, K, Wagner, E.F Barlow, D.P (1997) Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 389:745-749.
- Yan, Z., Gong, X, Guo, X, Xu, M, Ren, Z Zeng, Y (2009) Association of differential and site-dependent CpG methylation and diverse expression of DNA methyltransferases with the tissue-specific expression of human beta-globin gene in transgenic mice. *Int J Hematol* 89:414-421.
- Yang, J., Liu, X, Bhalla, K, Kim, C.N, Ibrado, A.M, Cai, J, Peng, T.I, Jones, D.P Wang, X (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275:1129-1132.
- Yang, R., Li, W, Hoang, B.H, Kim, H, Banerjee, D, Kheradpour, A, Healey, J.H, Meyers, P.A, Bertino, J.R Gorlick, R (2008) Quantitative correlation between promoter methylation and messenger RNA levels of the reduced folate carrier. *BMC Cancer* 8:124.
- Yeh, A., Wei, M, Golub, S.B, Yamashiro, D.J, Murty, V.V Tycko, B (2002) Chromosome arm 16q in Wilms tumors: unbalanced chromosomal translocations, loss of heterozygosity, and assessment of the CTCF gene. *Genes Chromosomes Cancer* 35:156-163.
- Yi, R., Qin, Y, Macara, I.G Cullen, B.R (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17:3011-3016.

- Yoder, J., Walsh, C Bestor, T (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13:335-340.
- Yokochi, T. Robertson, K (2002) Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *J Biol Chem* 277:11735-11745.
- Yu, F., Thiesen, J Strätling, W (2000) Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Res* 28:2201-2206.
- Yuan, J. Yankner, B.A (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
- Zaid, A., Li, R, Luciakova, K, Barath, P, Nery, S Nelson, B.D (1999) On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes. *J Bioenerg Biomembr* 31:129-135.
- Zatkova, A., Rouillard, J, Hartmann, W, Lamb, B, Kuick, R, Eckart, M, von Schweinitz, D, Koch, A, Fonatsch, C, Pietsch, T, Hanash, S Wimmer, K (2004) Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 39:126-137.
- Zeng, Y. Cullen, B.R (2004) Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 32:4776-4785.
- Zeng, Y., Yi, R Cullen, B.R (2005) Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J* 24:138-148.
- Zhang, Y., Wu, H, Shen, J, Ahsan, H, Wei, Y, Yang, H, Wang, L, Chen, S, Chen, C Santella, R (2007) Predicting hepatocellular carcinoma by detection of aberrant promoter methylation in serum DNA. *Clin Cancer Res* 13:2378-2384.
- Zhao, Z., Tavoosidana, G, Sjölander, M, Göndör, A, Mariano, P, Wang, S, Kanduri, C, Lezcano, M, Sandhu, K.S, Singh, U, Pant, V, Tiwari, V, Kurukuti, S Ohlsson, R (2006) Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet* 38:1341-1347.

Etude de la régulation de l'expression de PLAGL1 par des mécanismes épigénétiques dans les sarcomes

PLAGL1 est un gène soumis à l'empreinte parentale qui code pour une protéine impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. *PLAGL1* est donc soupçonné d'être un gène suppresseur de tumeur localisé en 6q24-25, une région fréquemment délétée dans les cancers. De précédentes études menées sur des cancers d'origine épithéliale ont mis en évidence la perte d'expression du gène *PLAGL1*, soit par perte d'hétérozygotie, soit par méthylation des deux allèles du gène. Néanmoins, les mécanismes de régulation de l'expression de *PLAGL1* restent encore mal connus.

Peu de choses sont connues sur l'étiologie des sarcomes, sauf qu'ils présentent de nombreux remaniements chromosomiques, y compris dans la région contenant le gène *PLAGL1*. Compte-tenu du rôle connu de *PLAGL1*, notre objectif a été d'étudier dans les sarcomes : 1) son profil d'expression et son impact dans la physiopathologie de ces cancers et 2) de caractériser ses mécanismes de régulation épigénétique, comme la méthylation de son promoteur et son éventuelle régulation par des microRNA.

Ainsi nous montrons que 1) *PLAGL1* est différentiellement exprimé selon le type de sarcome considéré, 2) le niveau d'expression de l'ARNm de *PLAGL1* peut être un outil diagnostique et/ou pronostique dans ce type de cancer. Nous avons également mis en évidence pour la première fois, 3) que seuls certains CpG du promoteur de *PLAGL1* conditionnaient sa transcription et 4) que le niveau de méthylation de certains CpG du promoteur de *PLAGL1* pouvait être utilisé comme outil diagnostique ou pronostique. Pour finir, nous avons montré l'existence d'une régulation épigénétique de *PLAGL1* par certains microRNA (15a, 15b, 16 et 424) dans les sarcomes.

Mots clés : PLAGL1, épigénétique, méthylation de l'ADN, microRNA, sarcomes

Regulation of PLAGL1 expression by epigenetic mechanisms in sarcomas

PLAGL1 gene is an imprinting gene, expressed only from the paternal allele in normal tissues, which codes for a protein inducing G1 cell cycle arrest and apoptosis suggesting that it could be the tumor suppressor gene of the 6q24-25 chromosomal region. Several studies have shown its loss of expression in some epithelial cancers, which was due to epigenetic alterations like: lost of heterozygosity or promoter hypermethylation. Nevertheless, regulation mechanisms of *PLAGL1* expression are still elusive.

The etiology of sarcomas is still poorly understood. However, they are characterized by lot of chromosomal alterations including the chromosomal region of *PLAGL1*. Given the role of *PLAGL1*, our aims were to study in sarcomas 1) the *PLAGL1* expression profile and its clinico-pathological impact in these cancers, and 2) the epigenetic regulations of *PLAGL1* such as, its promoter methylation and its possible regulation by microRNA.

Our results show that: 1) *PLAGL1* is differentially expressed according to sarcoma sub-type; 2) *PLAGL1* mRNA expression could be a good diagnosis or prognosis tool in sarcoma. In addition, we demonstrate for the first time that 3) only few CpG sites are relevant for *PLAGL1* mRNA expression and 4) methylation level of some CpG could be use as new diagnosis or prognosis factor. Moreover, we highlight a new epigenetic mechanism of *PLAGL1* regulation by microRNA (15a, 15b, 16 and 424) in sarcomas.

Keywords: PLAGL1, epigenetic, DNA methylation, microRNA, sarcomas