

UNIVERSITE BORDEAUX SEGALEN

Année 2011

thèse n° 1880

Thèse pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Science, Technologie, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 Décembre 2011

Par Mehdi NAOUAR

Né le 04 Septembre 1982

**Caractérisation de FAM110B, une nouvelle protéine
essentielle à la survie cellulaire impliquée dans la migration et
la réponse aux médicaments anticancéreux**

Membres du Jury

Jacques ROBERT, PU-PH (INSERM U916 & Université de Bordeaux)	Président
Amélie LANSIAUX, MCU-PH (INSERM U837, Université de Lille)	Rapporteur
Gilles VASSAL, PU-PH (Institut Gustave Roussy, Paris)	Rapporteur
Danièle MONTAUDON, MCU-PH, (INSERM U916, Bordeaux)	Directeur de thèse
Philippe POURQUIER, CR1 (INSERM U916, Bordeaux)	Co-directeur de Thèse
Aghleb BARTEGI, PU (ISBM, Université de Monastir, Tunisie)	Examineur

REMERCIEMENTS

J'adresse ma profonde gratitude à toutes les personnes qui m'ont permis de conduire ce travail de thèse.

Je tiens, tout d'abord, à exprimer ma profonde reconnaissance et à remercier mon Directeur de recherche le **Dr. Danièle MONTAUDON**, qui m'a reçu dans son laboratoire et m'a beaucoup aidé pendant tout le déroulement de ma thèse. Sa simplicité, sa disponibilité et son attention ont été fondamentaux pour la réussite de mon travail de recherche. Merci également de son temps consacré et de sa confiance témoignée pendant toutes ces années.

J'aimerais également exprimer toute ma gratitude à mon Directeur de Recherche **Dr. Philippe POURQUIER**, d'avoir tenu à m'aider pendant toute la construction et l'exécution de cette recherche. Sa détermination et sa compétence ont été essentielles pour l'aboutissement de cette thèse. Même dans les moments les plus difficiles, lorsque rien ne semblait fonctionner correctement, il a toujours su trouver une réponse à mes problèmes. Alors, un grand et particulier remerciement pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour sa présence sans défaillance à mes côtés. Merci aussi à lui d'avoir trouvé le financement d'une partie de ma thèse, ce qui m'a permis de séjourner en France et de pouvoir sans souci y préparer mon doctorat.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse : Pr. **Jacques ROBERT** de l'Institut Bergonie Unité VINCO Inserm U916, Dr **Amélie LANSIAUX** du centre Osca Lambret Inserm U837 (Lille), Dr **Gilles VASSAL** de l'Institut de cancérologie Gustave Roussy, Dr **Danièle MONTAUDON** de l'IB Unité VINCO U916 (Bordeaux), Dr **Philippe POURQUIER** de l'IB Unité VINCO Inserm U916 et Pr. **Aghleb BARTEGI** de l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir. Merci à eux d'avoir bien voulu examiner ce manuscrit.

Un grand merci également à Monsieur le Pr. **Josy REIFFERS** et Monsieur le Dr **François ICHAS** de m'avoir accepté au sein des locaux de l'Unité VINCO Inserm U916 et de m'avoir donné la chance et leur confiance de réaliser ma thèse.

LISTE DES ABREVIATIONS

9-OH-E: 9-Hydroxuellipticine
ACBP: alpha-catenin binding protein
ADAM: proteins containing A Disintegrin an A Metalloprotease domain
ADN: Acide désoxyribonucléique
ADP: Adenosine 5'-diphosphate
AMP: Adnéosine 5'-monophosphate
APC: Adenomatous Polyposis Coli
ARN: Acide ribonucléique
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP: Adénosine 5'-triphosphate
ATR: ATM-related
Bcl9: B-cell CLL/lymphoma 9 protein
BCRP: Breast Cancer resistance Protein)
Bcr-Abl: Bcr, Breakpoint cluster region, Abl, Abelson
BER: Base Excision Repair
BET: Bromure d'éthidium
bHLH: basic helix-loop-helix
BLAST: Basic Local Aligement Search Tool
BSA: Bovine Serum Albumin
CBP /p300: Cyclic AMP response element-Binding protein
CGH array: Comparative Genomic Hybridization
Chk: Ceckpoint Kinase
CK1: Casein Kinase 1
CK2: Casein Kinase 2
Cip/Kip: CDK interacting protein/kinase inhibitory protein
CPT: Camptothécine
CSPP: centrosome/spindle pole-associated protein
DiI: 1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tétraméthylindo Carbocyanine perchlorate
DMSO: Diméthylsulfoxide
DNA-PK: DNA-Protein Kinase
dNTP: Déoxynucléotide 5'-triphosphate
Dsh: dishevelled
DTT: Dithiothreitol
EDTA: Ethylène diaminetétraacétique
EF1: cristallin Enhancer Factor 1
EGF: Epidermal Growth Factor
ELM: Eukaryotic Linear Motifs
FDA: Food and Drug Administration
FEN-1: Flap ExoNuclease-1
GFP: Green Fluorescent Protein
GSE: Genetic Suppressor Element
GSK-3: Glycogen synthase kinase 3
HDAC: Histone désacétylase
hnRNP: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles
HRP: Horseradish Peroxydase
ICAT: Inhibitor of β -Catenin And TCF
ICE: Immuno Complex of Enzyme
Id: Inhibitor of DNA binding
IL: Interleukin
IRS-1: Insulin receptor substrate-1

kDa: Kilodalton
LEF/TCF: Lymphocyte enhancer factor/T cell factor
LRP: LDL-Receptor Related Protein
MCPI: Monocyte Chemotactic Protein 1
MDR: Multi-Drug Resistance
MEK: Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase
miRNA: micro-RNA
MMP: Métalloprotéase
MRP: Multi-Drug Resistance Associated Protein
MOI: multiplicity of infection
mTOR: mammalian Target of Rapamycin
MTT: 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide
NF- κ B: Nuclear factor kappa enhancer binding protein
NHEJ: Non-Homologous End-Joining
NER: Nucleotide Excision Repair
NTS: Nucleus Tractus Solitarius
Par-4 : Prostate apoptosis response-4
PARP: Poly(ADP)rybosilphosphate
PBS: Phosphate Buffer Saline-Tween
PCR: Polychain Reaction
PDGF: Platelet-Derived Growth factor
PDGFR: PDGF-Receptor
PI3K: Phosphatidylinositol 3'-phosphate kinase
PKC: Protein Kinase C
PNKP: polynucleotide kinase phosphatase
PRMT: Protéine arginine-méthyl transférase
PSA: Antigène Spécifique de la prostate
PVDF: Polyvinylène difluoride
RTK: récepteurs tyrosine kinase
RT-PCR: Reverse Transcriptionnel-PCR
SDS: Sodium dodécylsulfate
shRNA: short hairpin-RNA
siRNA: Small Interfering RNA
SIP-1: Smad Interacting Protein-1
SIN: Self-inactivating
snRNP: small nuclear ribonucleo protein particle
SUMO: Small Ubiquitin-Like Modifiers
SVF: Sérum de veau foetal
TAE: Trisborate EDTA
TBP: TATA-Binding Protein
TCF/LEF: T-Cell Factor/ Lymphoid Enhancer Factor
TDP1: Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase
TDP2: Tyrosyl DNA phosphodiesterase 2
TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TEMED: Tétraméthylènediamine
TMRM: Tétraméthylrhodamine méthylester
Topo1: AND-Topoisomérase 1
Topo2: AND-Topoisomérase 2
TOPRIM: domaine commun aux TOPoisomérases, PRIMases
TrCP: Transducin Repeat-Containing-Protein

UAS: Upstream Activated Sequence
UTR: Untranslated region
uPaR: Urokinase Plasminogene Activator Receptor
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VP-16: Étoposide
XPF: Xeroderma Pigmentosum groupe F
WNT: Wingless chez la drosophile ou Int1
WRN: Werner
ZEB: Zinc E-box binding factor

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1: Les grandes familles de médicaments anticancéreux.....	16
Figure 2: Principaux rôles des ADN Topoisomérases humaines.	18
Figure 3: Mode de coupure de l'ADN par les différents types de Topoisomérases.....	19
Figure 4: Structure des Topoisomérases humaines.	20
Figure 5: Cycles catalytiques des Topoisomérases.	22
Figure 6: Les deux grandes catégories d'inhibiteurs de Topo.....	23
Figure 7: Les différents inhibiteurs de la Topo1..	24
Figure 8: Les principaux poisons de la Topo2.....	27
Figure 9: Méthodologie de sélection d'éléments génétiques suppresseurs (GSEs)	35
Figure 10: Structure du gène humain dont est issu le GSE13	37
Figure 11: Comparaison des séquences de la protéine FAM110B et de l' <i>alpha-catenin binding protein</i> (ACBP).....	38
Figure 12: Structure en domaines de la β -caténine.	39
Figure 13: Schématisation de la voie de signalisation Wnt.	41
Figure 14: Régulation de la voie de signalisation de la β -caténine	43
Figure 15: Inhibiteurs de transcription de la E-cadhérine.	45
Figure 16: Schéma d'organisation d'une puce Affymetrix	60
Figure 17: Structure du plasmide pcDNA3.1	61
Figure 18: Structure du plasmide pLKO-1	62
Figure 19: Cartes plasmidiques de pGADGH et de pGBT9.....	63
Figure 20: Plasmides transfectés dans la cellule d'emballage	68
Figure 21: Structure de Gal4p.....	69
Figure 22: Principe du criblage d'une banque d'expression par la technique du double-hybride chez la levure	70
Figure 23: Représentation schématique d'un cytomètre en flux.....	75
Figure 24: Alignement des séquences de la protéine FAM110B de différents organismes eucaryotes.	83
Figure 25: Validation de la spécificité du sérum polyclonal de lapin dirigé contre FAM110B humaine.	83
Figure 26: Les différents modèles de répression de FAM110B.	85
Figure 27: La diminution transitoire de l'expression de FAM110B inhibe la prolifération des cellules HeLa	87
Figure 28: Effet de la répression de FAM110B sur le cycle cellulaire.	88
Figure 30: Test de migration « <i>Scratch test</i> » de cellules HeLa sousexprimant FAM110B.	90
Figure 31: Test de migration « chambre de <i>Boyden</i> » de cellules HeLa sousexprimant FAM110B.	91
Figure 32: Effet de la réduction du niveau protéique de FAM110B sur l'expression de la E-cadhérine et de la N-cadhérine.....	93
Figure 33: Immunofluorescence de la E-cadhérine réalisée dans des cellules HeLa contrôle ou sousexprimant FAM110B.....	94
Figure 34: Effet de la réduction transitoire de l'expression de FAM110B sur l'expression des répresseurs transcriptionnels de la E-cadhérine, SLUG et SNAIL.....	95
Figure 35: Effet de la diminution transitoire de l'expression de FAM110B sur l'expression de la β -caténine dans des cellules HeLa.....	96
Figure 36: Validation de l'augmentation du niveau d'expression de la β -caténine..	97
Figure 37: La sousexpression de FAM110B dans les cellules HeLa engendre une diminution de la GSK3- β totale et une augmentation de sa forme inactive.	97

Figure 38: Evaluation de l'expression de c-myc dans les cellules sousexprimant ou non FAM110B.	98
Figure 39: Etude la répartition de la β -caténine dans les cellules sousexprimant ou non FAM110B.	99
Figure 40: Test du criblage de l'activité fonctionnelle sur 10 promoteurs impliqués dans les mécanismes tumoraux.	100
Figure 41: Vérification de la construction pGBT9-DF-FAM110B.	101
Figure 42: Séquence de la zone de jonction entre le domaine de fixation de Gal4p de pGBT9-DF et de FAM110B.	102
Figure 43: Résultats des croisements des souches de levure Y187 pGAD-GH vide et Y187 pGAD-GH-12c par des souches de levures AH109 transformées par différentes constructions plasmidiques de pGBT9.	103
Figure 44: Détection de la protéineDF-FAM110B.	104
Figure 45: Viabilité des souches haploïdes AH109 contenant l'appât et Y187 contenant la banque d'ADNc et Viabilité des souches diploïdes résultant du croisement des souches haploïdes AH109 et Y187.	105
Figure 46: Résultats des tests en gouttes de 7 clonesensemencés sur milieu SD Agar-Leu-Trp-His+3AT.	106
Figure 47: Résultats du test X- α -gal.	107
Figure 48: Validation de l'interaction FAM110B/14.3.3 ϵ dans les cellules HeLa.	109
Figure 49: Validation des sites d'interaction de FAM110B et 14.3.3 ϵ	110
Figure 50: Localisation cellulaire des formes mutées de FAM110B dans des cellules HeLa et MCF-7 par microscopie confocale.	111
Figure 51: Effet de la répression transitoire de FAM110B sur la sensibilité des cellules HeLa aux inhibiteurs de Topoisomérasés.	113
Figure 52: Quantités de complexes ADN-Topoisomérasés dans les cellules HeLa A10 et contrôle évaluées par la technique ICE.	115
Figure 53: Effet de la répression transitoire de FAM110B sur l'expression de la Topo2 α	115
Figure 54: Effet de la répression transitoire de FAM110B sur la sensibilité des cellules HeLa aux poisons des microtubules et au cisplatine.	116
Figure 55: Modèle d'interaction de FAM110B avec les protéines 14.3.3 ϵ et β -caténine et leurs conséquences potentielles sur la régulation de l'expression de la E-cadhérine et de la localisation de la β -caténine.	125
Tableau I: Liste des anticorps utilisés.	54
Tableau II: Séquences des amorces utilisées.	58
Tableau III: Quantité d'ADN et d'Exgen 500 à utiliser suivant le format de culture des cellules.	66
Tableau IV: Caractéristiques des fluorophores utilisés.	73
Tableau V: Liste des médicaments anticancéreux utilisés.	77
Tableau VI: Les principales voies explorées par le système.	80
Tableau VII: Les gènes impliqués dans les processus de migration et d'invasion.	92
Tableau VIII: Les différentes protéines identifiées par le crible de double-hybride chez la levure susceptibles d'interagir avec FAM110B.	108

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	14
I Les différents traitements anticancéreux.....	15
II Les Topoisomérases humaines.....	18
II.1 Structures et domaines d'organisation	19
II.2 Cycle catalytique des Topoisomérases humaines	21
II.3 Les différents types d'inhibiteurs des Topoisomérases	23
II.3.1 Les grandes familles d'inhibiteurs de Topo1	23
II.3.2 Les grandes familles d'inhibiteurs des Topo2 humaines	25
II.4 Les lésions de l'ADN induites par les poisons de Topoisomérases.....	25
II.5 Déterminants de la réponse cellulaire aux inhibiteurs de Topoisomérases.....	27
II.5.1 Mécanismes liés au transport ou au métabolisme de la drogue	28
II.5.2 Mécanismes liés à la formation des complexes ADN-Topoisomérases	29
II.5.2.1 Résistance liée à des mutations de l'enzyme	29
II.5.2.2 Mécanismes liés au niveau d'expression des Topoisomérases ..	30
II.5.2.3 Mécanismes liés aux modifications des Topoisomérases et à leur interaction avec d'autres protéines	30
II.5.2.4 Mécanismes liés à la réparation des cassures.....	32
II.5.3 Les autres déterminants de la réponse.....	33
III L'historique de FAM110B.....	34
IV La β-caténine	38
IV.1 Structure de la β -caténine	38
IV.2 Rôles biologiques de la β -caténine.....	39
IV.3 Mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine....	41
IV.3.1 Régulation par des facteurs régulant la voie Wnt.....	41
IV.3.2 Régulation par des micro-ARNs.....	42
IV.3.3 Phosphorylation des composants du complexe E-cadhérine/ β -caténine	42
IV.3.4 Régulation du taux membranaire de la E-cadhérine.....	44
IV.4 La désorganisation des complexes E-cadhérine/ β -caténine et la voie de signalisation de la β -caténine: implication dans la TEM et dans la progression métastatique.....	46
V Projet de thèse	47
MATERIELS ET METHODES	48
I Culture cellulaire.....	49
I.1 Cellules eucaryotes.....	49
I.1.1 Les lignées cellulaires.....	49
I.1.2 Conditions de culture.....	49
I.1.3 Conservation à long terme et décongélation	49

I.2 Bactéries	50
I.2.1 Souches bactériennes.....	50
I.2.2 Conditions de culture.....	50
I.3 Levures	50
II Biologie cellulaire.....	51
II.1 Comptage cellulaire	51
II.2 Extraction des protéines	51
II.2.1 A partir des lignées cellulaires	51
II.2.1.1 Lyse cellulaire	51
II.2.1.2 Extrait nucléaire	51
II.2.2 A partir de levures.....	52
II.3 Dosage des protéines.....	52
II.4 Analyse des protéines par Western Blot	53
II.4.1 Electrophorèse et transfert.....	53
II.4.2 Immunodétection.....	53
II.5 Immunoprécipitation	55
II.5.1 Principe	55
II.5.2 Méthode.....	55
III Biologie moléculaire	55
III.1 Méthodes d'analyse de l'ADN	55
III.1.1 Electrophorèse sur gel d'agarose	55
III.1.2 PCR.....	56
III.1.3 Séquençage	57
III.2 Mutagenèse dirigée	58
III.3 Analyse des ARN messagers	59
III.3.1 Extraction des ARNms	59
III.3.2 Analyse de l'expression des ARNms par puce Affymetrix™	59
III.5 Transformation bactérienne	60
III.5.1 Les vecteurs utilisés.....	60
III.5.2 La transformation bactérienne	64
III.5.3 La transformation de levures	64
III.5.4 Extraction et purification d'ADN plasmidique à partir de bactéries (Miniprep).....	65
III.5.5 Extraction d'ADN plasmidique à partir de levures	65
III.6 Transfection et transduction cellulaires transitoires	66
III.6.1 Transfection de vecteur plasmidique	66
III.6.2 Transduction des shRNAs	67
III.6.2.1 Les shRNAs	67
III.6.2.2 Les shRNAs anti FAM110B.....	67
III.6.2.3 Préparation des virus.....	68
III.6.2.4 Transduction des cellules eucaryotes.....	68
VI Crible du double hybride chez la levure	69
VI.1 Principe.....	69
VI.2 Construction du gène de fusion	70
IV.3 Le croisement des souches haploïdes	71
IV.4 Le test en gouttes	72

V Imagerie cellulaire	73
VI Cytométrie en flux	74
VI.1 Principe	74
VI.2 Applications de la cytométrie en flux	75
VI.2.1 Etude de la prolifération cellulaire	75
VI.2.2 Etude du cycle cellulaire.....	76
VII Pharmacologie cellulaire	76
VII.1 Les médicaments anticancéreux utilisés	76
VII.2 Test de cytotoxicité : test au MTT	77
VII.2.3 Détection des complexes covalents ADN-Topoisomérase dans les cellules	78
VIII Phénotypes fonctionnels.....	78
VIII.1 Motilité cellulaire.....	78
VIII.1.1 Modèle de blessure artificielle	78
VIII.1.2 Modèle de membrane poreuse	79
VIII.2 Modulation de voies signalétiques.....	79
RESULTATS	81
I Développement d'outils pour l'étude du rôle biologique de FAM110B.....	82
I.1 Mise en évidence de FAM110B.....	82
I.2 Mise au point de modèles de répression de FAM110B.....	83
II Phénotypes liés à la répression de FAM110B.....	86
II.1. Effet de la sous-expression de FAM110B sur la prolifération cellulaire	86
II.2 Effet de la sous-expression de FAM110B sur le cycle cellulaire.....	87
II.3 Autres phénotypes liés à la sous-expression de FAM110B	88
II.3.1 Influence de la répression de FAM110B sur la migration cellulaire	89
II.3.2 Les différentes voies métaboliques dérégulées par la répression de FAM110B : l'approche des puces d'expression ou Microarray	91
II.3.2.1 Etude de la régulation de l'expression de la E-cadhérine par FAM110B	92
II.3.2.2 Influence de la répression de FAM110B sur la régulation de la β - caténine	95
II.3.2.3 Rôle potentiel de FAM110B dans la régulation d'autres voies métaboliques impliquées dans les mécanismes tumoraux.....	99
III Recherche de partenaires de FAM110B par la technique du double hybride	101
III.1 Construction de l'ADNc codant pour la protéine de fusion appât : DF gal4/FAM110B	101
III.2 Contrôles avant le croisement des souches de levures Mata et Mata.....	102
III.2.1 Test d'auto-activation de la protéine FAM110B	102
III.2.2 Vérification de l'expression de la protéine de fusion DF-FAM110B	103
III.3 Croisement des levures et contrôles.....	104
III.3.1 Efficacité du croisement	104

III.3.2 Sélection des diploïdes après croisement.....	105
III.3.3 Le test en gouttes	106
III.3.4 Le test X- α -gal.....	106
III.4 Identification des candidats d'interaction avec DF-FAM110B.....	107
III.4.1 Validation d'une interaction potentielle entre FAM110B et la protéine 14.3.3 ϵ dans des cellules humaines en culture.....	108
III.4.2 Recherche de sites d'interactions de 14.3.3 ϵ au niveau de FAM110B	109
III.4.3 Validation des sites d'interactions entre FAM110B et 14.3.3 ϵ par immunoprécipitation.....	109
III.4.4 Effets des mutations des sites de liaison à 14.3.3 ϵ sur la localisation intracellulaire de FAM110B	110
IV Effet de la répression de FAM110B dans la réponse cellulaire aux inhibiteurs de Topoisomérases	112
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	117
CONCLUSION.....	130
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	132
ANNEXE.....	157

INTRODUCTION

I Les différents traitements anticancéreux

Le développement ainsi que l'intégrité des différents tissus dépend des mécanismes de contrôle de la division cellulaire et de la communication entre les cellules qui les constituent. Parmi les gènes qui régulent ces mécanismes, on retrouve notamment les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs dont la dérégulation peut avoir un effet sur la prolifération cellulaire et conduire à un phénotype cancéreux. Ces dérégulations sont souvent dues à l'acquisition de mutations ponctuelles ou de réarrangements chromosomiques complexes qui, selon leur localisation, peuvent affecter le niveau de transcription de ces gènes ou l'activité des protéines pour lesquelles ils codent. Dans les deux cas, la cellule cancéreuse échappe à tout contrôle et se divise anarchiquement pour former une tumeur. Celle-ci peut évoluer vers un stade métastatique lorsque, par suite d'une modification de leurs propriétés d'adhésion /migration, des cellules cancéreuses quittent leur site d'origine pour atteindre d'autres localisations par voie sanguine et/ou lymphatique.

Malgré les progrès thérapeutiques considérables réalisés ces dernières années, le cancer est encore considéré comme un véritable problème de santé publique lié en grande partie au vieillissement progressif de la population mais aussi à l'environnement et au style de vie. Schématiquement, lorsque son diagnostic est précoce, une intervention chirurgicale et/ou une radiothérapie est(ont) envisagée(s). A un stade d'évolution plus avancé, l'impossibilité de recourir à la chirurgie, oriente vers une chimiothérapie. En fonction du type de cancer et de son stade d'évolution au moment du diagnostic, différents traitements peuvent être proposés. Ainsi la prise en charge des cancers du sein et de la prostate peut inclure une hormonothérapie qui limite la multiplication des cellules cancéreuses en inhibant les réponses cellulaires aux stimulations hormonales. L'immunothérapie est utilisée dans le traitement du cancer du rein, de certains mélanomes, de leucémies et de lymphomes. Dans ce cas, la stimulation du système immunitaire du sujet traité induit la synthèse d'effecteurs capables de détruire les cellules cancéreuses autologues. Parmi les chimiothérapies "classiques", de nombreux traitements reposent sur l'administration d'agents cytotoxiques dont le rôle est de détruire la cellule cancéreuse. En fonction de leur mode d'action, ces médicaments peuvent être regroupés en différentes familles (Figure 1). Il est ainsi possible de différencier des molécules qui interfèrent avec la synthèse des précurseurs puriques et pyrimidiques de l'ADN appelés anti-métabolites comme le méthotrexate et le 5-fluorouracile. Leur mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la synthèse de

l'ADN. On trouve également les agents alkylants (cyclophosphamides et dérivés du platine) et les inhibiteurs de Topoisomérases (dérivés de la camptothécine, anthracyclines, épipodophyllotoxines) qui induisent des lésions irréversibles de l'ADN. Les poisons de microtubules sont également très utilisés. Ils empêchent la division cellulaire en interférant avec la polymérisation du réseau de microtubules nécessaire à la bonne ségrégation des chromosomes nouvellement répliqués.

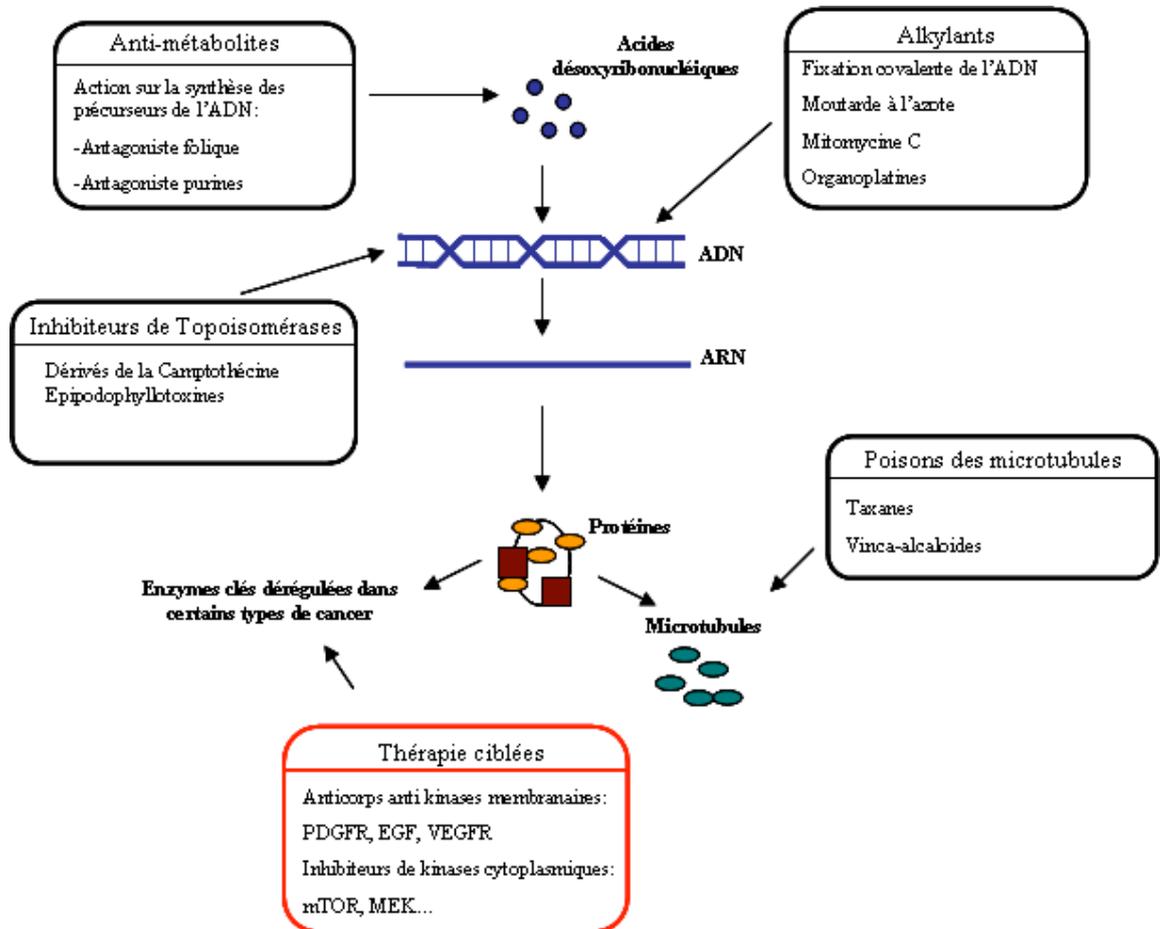


Figure 1 : Les grandes familles de médicaments anticancéreux.

Un des inconvénients de la chimiothérapie réside dans le fait qu'une molécule cytotoxique n'est pas spécifique d'une cellule tumorale, elle agit aussi sur les cellules saines engendrant des effets secondaires expliquant la toxicité de certains médicaments. En outre, son efficacité thérapeutique peut être amoindrie par l'émergence d'une résistance secondaire au traitement. Les mécanismes impliqués dans cette résistance sont complexes et impliquent une dérégulation des systèmes de transport et/ou de métabolisme du médicament, des systèmes de signalisation mis en jeu suite à

l'interaction entre la drogue et sa cible et des systèmes de réparation des lésions induites par le médicament. Par ailleurs peuvent être incriminés les processus d'adhésion/migration cellulaires ou de néovascularisation qui favorisent la dissémination métastatique.

Différentes stratégies ont été envisagées dans le but de contourner cette résistance. L'une d'entre elle repose sur la mise en place de protocoles thérapeutiques basés sur l'utilisation de nouvelles molécules ou de nouvelles associations permettant de potentialiser l'action des médicaments existants. L'autre possibilité est d'utiliser de nouveaux agents anticancéreux ciblant spécifiquement des facteurs clés qui sont dérégulés dans les cellules cancéreuses. L'identification de ces facteurs a conduit au développement de molécules ciblant des facteurs de croissance ou leurs récepteurs, des facteurs impliqués dans la survie des cellules tumorales, des facteurs impliqués dans la réparation de dommages à l'ADN, des facteurs impliqués dans les interactions entre la cellule tumorale et son microenvironnement, ou enfin des facteurs liés à l'angiogenèse. Le premier exemple type de thérapie ciblée est celui de l'imatinib (Gleevec) fréquemment utilisé pour le traitement de leucémie myéloïde chronique et qui inhibe l'activité kinase de BCR-Abl [Druker et al. 2006 ; Hochhaus et al. 2009]. Ceci a ouvert la voie pour d'autres thérapies ciblées. Nous citerons brièvement les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase (récepteurs au PDGFR (*platelet-derived growth factor*), à l'EGF (*epidermal growth factor*) et au VEGFR (*vascular endothelial growth factor*), les inhibiteurs de sérine-thréonine kinases cytoplasmiques mTOR et MEK (Figure. 1) [Lowe et al. 2010]. D'autres thérapies ciblées ont également été développées avec des activités prometteuses. C'est par exemple le cas des anti-PARP (poly -ADP-ribose- polymérase 1 et 2) [Wang and Weaver 2010], des inhibiteurs des intégrines [Tentori et al. 2008], d'histone déacétylase [Park et al. 2011] et de la voie de signalisation Hedgehog [Wong et al. 2011]. Il a également été envisagé de diminuer la quantité de cible lorsque celle-ci est surexprimée dans certains types de cancer. Cela a été facilité par le développement récent des stratégies d'interférence à l'ARN (siRNA ou miRNA) ayant aboutit à des résultats intéressants en clinique [Ashihara 2010]. Malheureusement, ces thérapies ciblées sont aussi accompagnées de résistances dont on ne connaît pas encore le(s) mécanisme(s). Une autre stratégie est de mieux appréhender les mécanismes d'action des drogues déjà existantes pour mieux comprendre comment les cellules cancéreuses échappent à ces traitements. C'est dans ce cadre que notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années aux mécanismes d'action des

médicaments anticancéreux de la famille des inhibiteurs des Topoisomérases dans le but d'améliorer la réponse à ces traitements ou de proposer de nouvelles cibles pour potentialiser leur action.

II Les Topoisomérases humaines

Les Topoisomérases sont des enzymes ubiquitaires, essentielles à la survie cellulaire [Wang 2002]. Elles interviennent dans la régulation de la topologie de l'ADN durant le processus de réplication, de transcription et de condensation des chromosomes au cours de la division cellulaire (Figure 2) [Forterre et al. 2007; Nitiss 2009a]. Ces rôles sont liés à la capacité de ces enzymes à introduire des coupures transitoires de l'ADN. Ces coupures permettent de supprimer les contraintes de torsions liées à ces processus vitaux par un mécanisme qui sera détaillé ci-après [Champoux 2001; Nitiss 2009a].

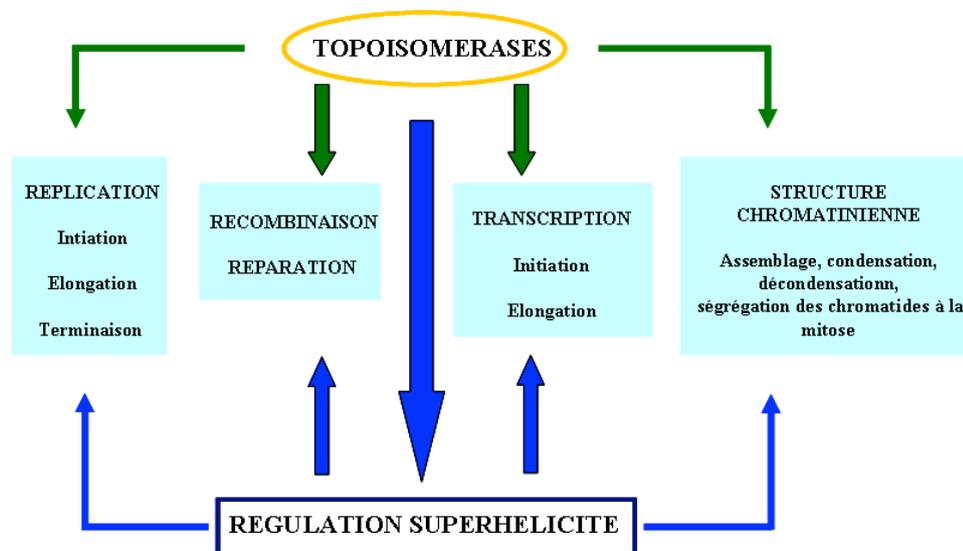


Figure 2 : Principaux rôles des ADN Topoisomérases humaines.

Les Topoisomérases ont fait l'objet d'un grand nombre d'études depuis l'identification de ces enzymes comme cibles spécifiques d'agents cytotoxiques. Ces études ont conduit au développement d'un très grand nombre d'inhibiteurs dont beaucoup sont utilisés en routine dans le traitement de multiples cancers, d'autre comme antifongiques et anti-parasitaires [Sissi and Palumbo 2003].

Les Topoisomérases peuvent être classées en deux groupes [Forterre et al. 2007]. Les Topoisomérases de type I sont au nombre de quatre, la Topo1 nucléaire, la Topo1 mitochondriale et deux isoformes de la Topoisomérase 3 (Topo3 α et Topo3 β). Seule la

Topo1 nucléaire est la cible de médicaments anticancéreux. Cette enzyme agit sous forme monomérique en introduisant des coupures simples brins de l'ADN et reste fixée à l'extrémité 3' du brin coupé (Figure. 3). Il existe deux isoformes de Topo2 (Topo2 α et Topo2 β) [Champoux 2001; Wang 2002]. Ces enzymes catalysent la coupure simultanée des deux brins de la double hélice en restant attachées à l'extrémité 5' du brin coupé (Figure 3). Il a récemment été démontré que l'effet anticancéreux des inhibiteurs de Topo2 était lié au ciblage de la Topo2 α , alors que l'inhibition de l'isoforme β était responsable des cancers secondaires induits par ces inhibiteurs [Azarova et al. 2007].

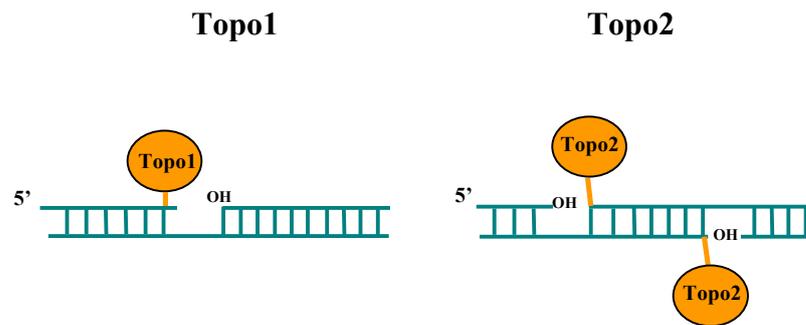


Figure 3 : Mode de coupure de l'ADN par les différents types de Topoisomérases

II.1 Structures et domaines d'organisation

La Topo1 humaine est une protéine composée de 765 acides aminés. Elle peut être divisée en quatre domaines distincts (Figure 4A) [Leppard and Champoux 2005]. La région N-terminale de la protéine, longue de 214 résidus, comprend quatre domaines d'adressage nucléaire et des domaines d'interaction avec un grand nombre de protéines telles que la nucléoline, les facteurs de transcription comme p53 et WRN. Le domaine central composé de 421 résidus est hautement conservé et subdivisé en trois sous-domaines impliqués dans la liaison de l'enzyme à l'ADN super-enroulé. Le domaine catalytique, également très conservé est situé à l'extrémité C-terminale, il contient la tyrosine catalytique (Tyr 723) impliquée dans la réaction de coupure de l'ADN. Le domaine de liaison (*linker*) très peu conservé et de longueur variable relie le domaine catalytique au domaine central.

La Topo2 humaine comporte deux isoformes : la Topo2 α dont le poids moléculaire est de 170 kDa et la Topo2 β dont le poids moléculaire est de 182 kDa. Les deux isoformes présentent 68% d'homologie, la variabilité étant située au niveau du domaine C terminal [Austin et al. 1993]. L'arrangement exon-intron des gènes codant pour ces deux

isoformes est très similaire et suggère la duplication d'un gène ancestral [Sng et al. 1999]. Les Topo2 agissent sous formes d'homodimère [Forterre et al. 2007]. Elles peuvent être divisées en trois domaines (Figure 4B).

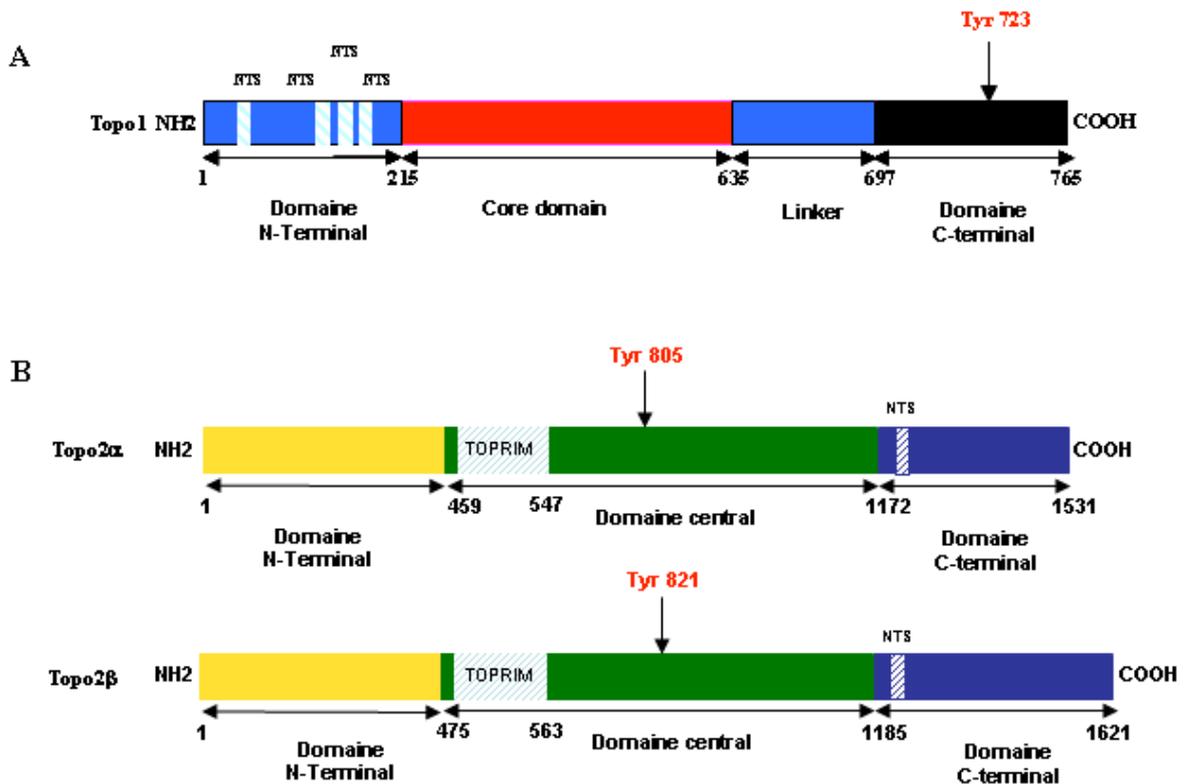


Figure 4: Structure des Topoisomérases humaines. (A) Structure de la Topo1 nucléaire. (B) Structures des deux isoformes de la Topo2 nucléaire. NTS : Séquence d'adressage nucléaire, TOPRIM : domaine commun aux TOPoisomérases, PRIMases, Tyr : Site catalytique.

Le domaine N-terminal comprend le site ATPasique ainsi que les séquences permettant la dimérisation de cette région de la protéine après fixation de l'ATP [Classen et al. 2003 ; Stuchinskaya et al. 2009]. Le domaine central inclut une région TOPRIM (domaine commun aux TOPoisomérases, PRIMases et autres enzymes participant au métabolisme de l'ADN) qui participe à la fixation de cations divalents et une région contenant le site actif de l'enzyme. Le domaine C-terminal n'est pas essentiel pour les réactions catalysées par l'enzyme [Adachi et al. 1997] mais pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activité catalytique *via* sa phosphorylation sur des résidus sérine [Meczes et al. 2008], dans le transport de la protéine vers le noyau grâce à la présence d'une séquence d'adressage [Kim et al. 2002], et dans les interactions protéine-protéine.

II.2 Cycle catalytique des Topoisomérases humaines

La Topo1 humaine catalyse la relaxation de l'ADN à travers une succession de réactions de coupure et de religation de l'ADN surenroulé. Le cycle catalytique de l'enzyme peut-être divisé en quatre étapes (Figure 5A). Tout d'abord la Topo1 se lie d'une manière non covalente à l'ADN double brin surenroulé (positivement ou négativement) [Krogh et al. 1991]. Puis l'enzyme coupe un brin de la double hélice par une réaction de trans-estérification entre la tyrosine 723 de la Topo1 et l'extrémité 3' phosphate de la liaison phosphodiester de l'ADN et reste attachée sur l'extrémité 3' du brin coupé [Champoux 1994]. Cette étape ne nécessite pas l'hydrolyse de l'ATP et aboutit à la formation d'un complexe covalent ADN-Topo1 appelé complexe de clivage. Puis le brin coupé subit une rotation contrôlée autour du brin intact ce qui permet de supprimer un tour d'enroulement de l'ADN [Leppard and Champoux 2005]. L'enzyme catalyse alors la religation du brin coupé par attaque de l'extrémité 5'hydroxyle libre de ce brin sur la liaison tyrosyl-phosphodiester du complexe de clivage. L'enzyme peut alors se détacher ou réaliser un autre cycle de coupure-religation.

Le cycle catalytique de la Topo2 se décompose selon le modèle à deux portes « gates » proposé par James C. Wang [Champoux 2001; Roca and Wang 1994] schématisé sur la figure 5B. L'ADN double brin appelé « G » se fixe d'une façon non covalente au niveau du domaine de « capture » constitué par l'homodimère de l'enzyme « N-gate ». Le second brin d'ADN appelé ADN « T » est alors capturé au niveau du « N-gate ». Il s'ensuit une réaction de trans-estérification, comparable à celle catalysée par les Topo1 mais avec une polarité inverse. Cette réaction aboutit à la coupure double-brin de l'ADN « G » dans laquelle chaque monomère est lié de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ADN coupé. Cette catalyse nécessite la présence de cations divalents tels que le Mg^{++} . Elle entraîne une modification de la conformation de l'enzyme qui se traduit par la fermeture du N-gate. L'ADN « T » passe alors à travers l'ADN « G » coupé au niveau du « C-gate » ; ceci nécessite la fixation et l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Puis, le dimère enzymatique catalyse la religation du brin « G » par une deuxième réaction de trans-estérification dans laquelle les groupes 3'-hydroxyle libres des brins clivés servent de nucléophiles attaquant les liaisons phosphotyrosines. Au cours de cette dernière réaction, une autre modification de la conformation de l'enzyme permet l'ouverture du C-gate et le relargage du brin non coupé. Le retour à la conformation de départ nécessite l'hydrolyse d'une deuxième molécule d'ATP. Le

dimère de Topo2 peut alors soit initier un nouveau cycle catalytique, soit se dissocier de son substrat et aller couper une autre molécule d'ADN.

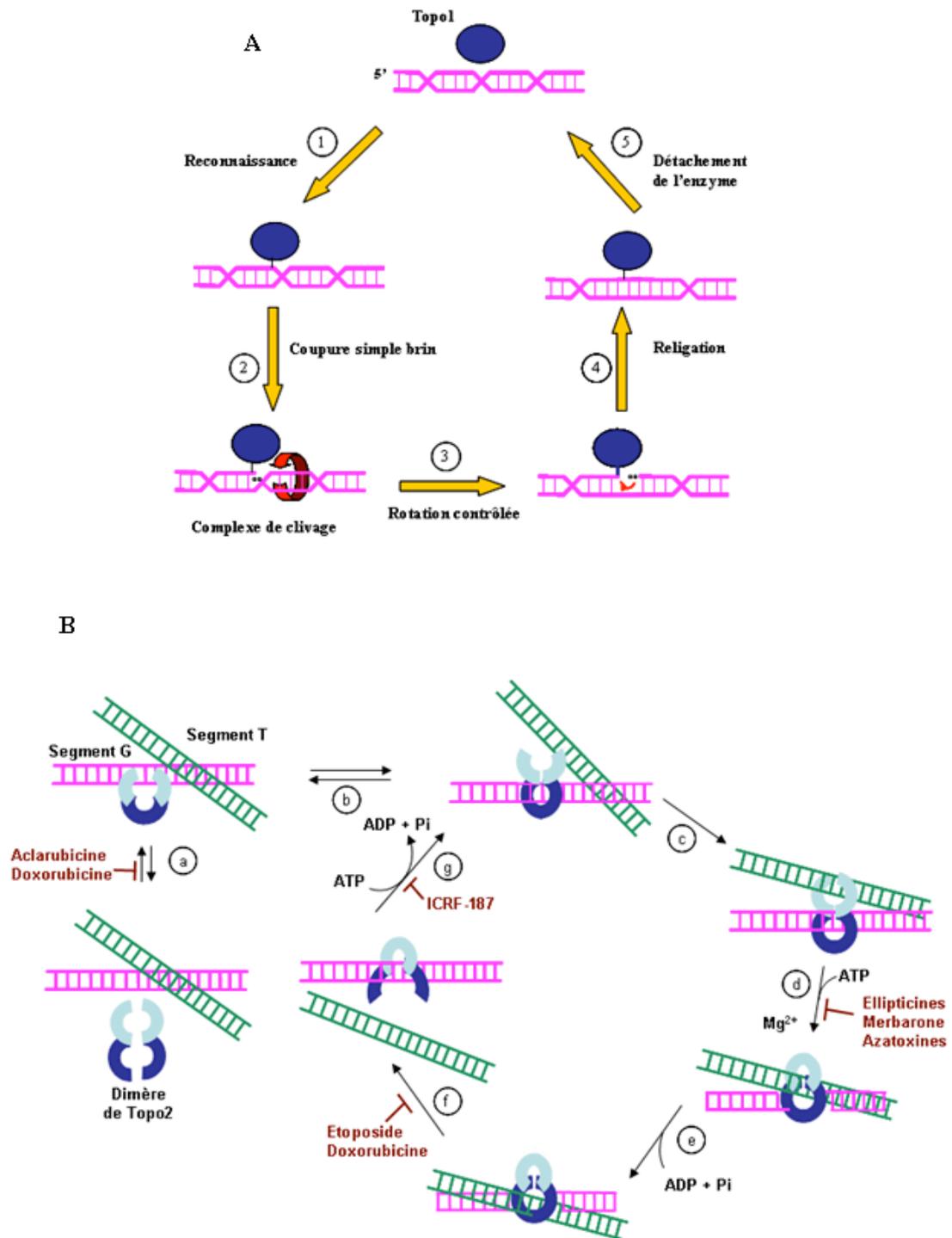


Figure 5: Cycles catalytiques des Topoisomérases. (A) Cycle catalytique de la Topo1. (B) Cycle catalytique de la Topo2

II.3 Les différents types d'inhibiteurs des Topoisomérases

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les Topoisomérases humaines sont la cible des médicaments anticancéreux très utilisés en clinique [Nitiss 2009b; Pommier 2009]. Il existe deux classes d'inhibiteurs de Topoisomérases (Topo1 et Topo2): les inhibiteurs catalytiques de l'enzyme et les poisons [Nitiss 2009b]. Comme leur nom l'indique, les inhibiteurs catalytiques empêchent la formation de complexes ADN-enzyme en inhibant l'étape de coupure de l'ADN et/ou la fixation de l'enzyme à son substrat (Figure 6A). A l'inverse, les poisons inhibent l'étape de religation de l'ADN ce qui se traduit par une augmentation du nombre de complexes ADN-Topoisomérases (Figure 6B). En pratique, les seuls inhibiteurs qui sont utilisés en clinique font partie de la catégorie des poisons comme l'étoposide (VP-16), poison de la Topo2 et la camptothécine (CPT), poison de la Topo1.

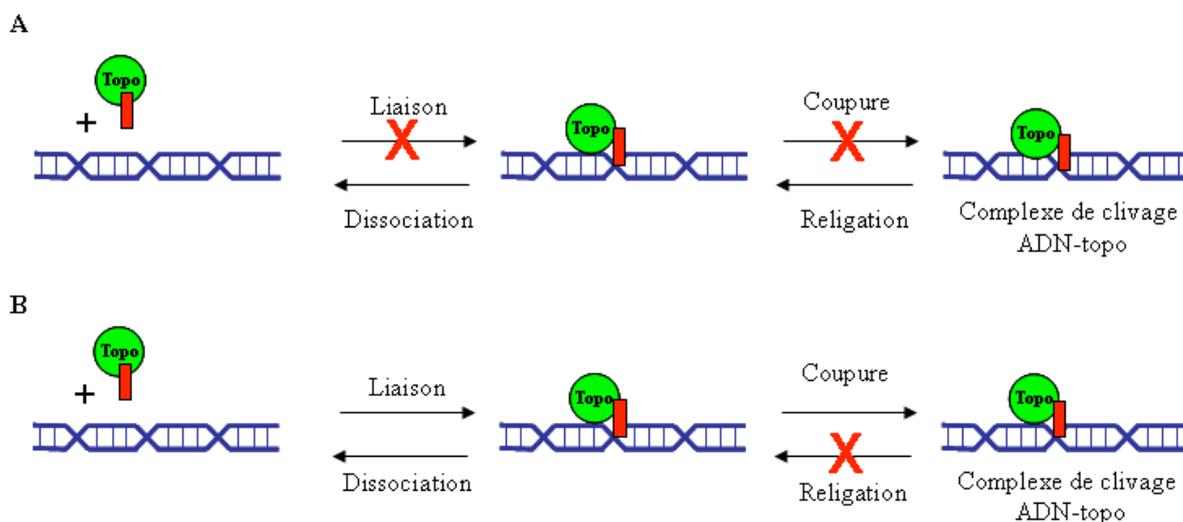


Figure 6: Les deux grandes catégories d'inhibiteurs de Topo. (A) Les inhibiteurs catalytiques empêchent la liaison de l'enzyme à l'ADN ou bloquent l'étape de coupure. (B) Les poisons inhibent l'étape de religation de l'ADN

II.3.1 Les grandes familles d'inhibiteurs de Topo1

Les premiers inhibiteurs de la Topo1 humaine qui ont été approuvés en clinique sont le Topotécan (Hycamtin, Glaxo Smithkline) utilisé dans le traitement du cancer de l'ovaire et du poumon non-à petites cellules et l'Irinotecan (CPT-11, Camptosar, Pfizer) utilisé dans les cancers colorectaux métastatiques (en association avec le 5-FU et le leucovorin) (Figure 7). Tous deux dérivent de la camptothécine (CPT), un alcaloïde

pentacyclique isolé de l'écorce de l'arbre chinois *Camptotheca acuminata* dans les années 60 [Wall and Wani 1995]. Ce n'est qu'en 1985 que la Topo1 a été identifiée comme la cible privilégiée de la CPT et qu'il a été démontré que sa cytotoxicité était liée à la formation de cassures de l'ADN [Holm et al. 1989]. Depuis, un grand nombre de dérivés de la CPT ont été développés et fait l'objet de plusieurs tests précliniques (Figure 7) [Pommier 2006]. On peut notamment citer les dérivés pour lesquels le cycle E de la molécule a été modifié (augmenté d'un carbone dans le cas des homocamptothécines ou réduit d'un carbone pour le dérivé S39625) pour minimiser l'ouverture du cycle lactone responsable de l'inactivation des dérivés de CPT (Figure 7). D'autres dérivés non-camptothécines ont également vu le jour et sont actuellement en développement comme les dérivés aromatiques polycycliques de la famille des indolocarbazoles ou des indénoisoquinolines [Marchand et al. 2006; Teicher 2008].

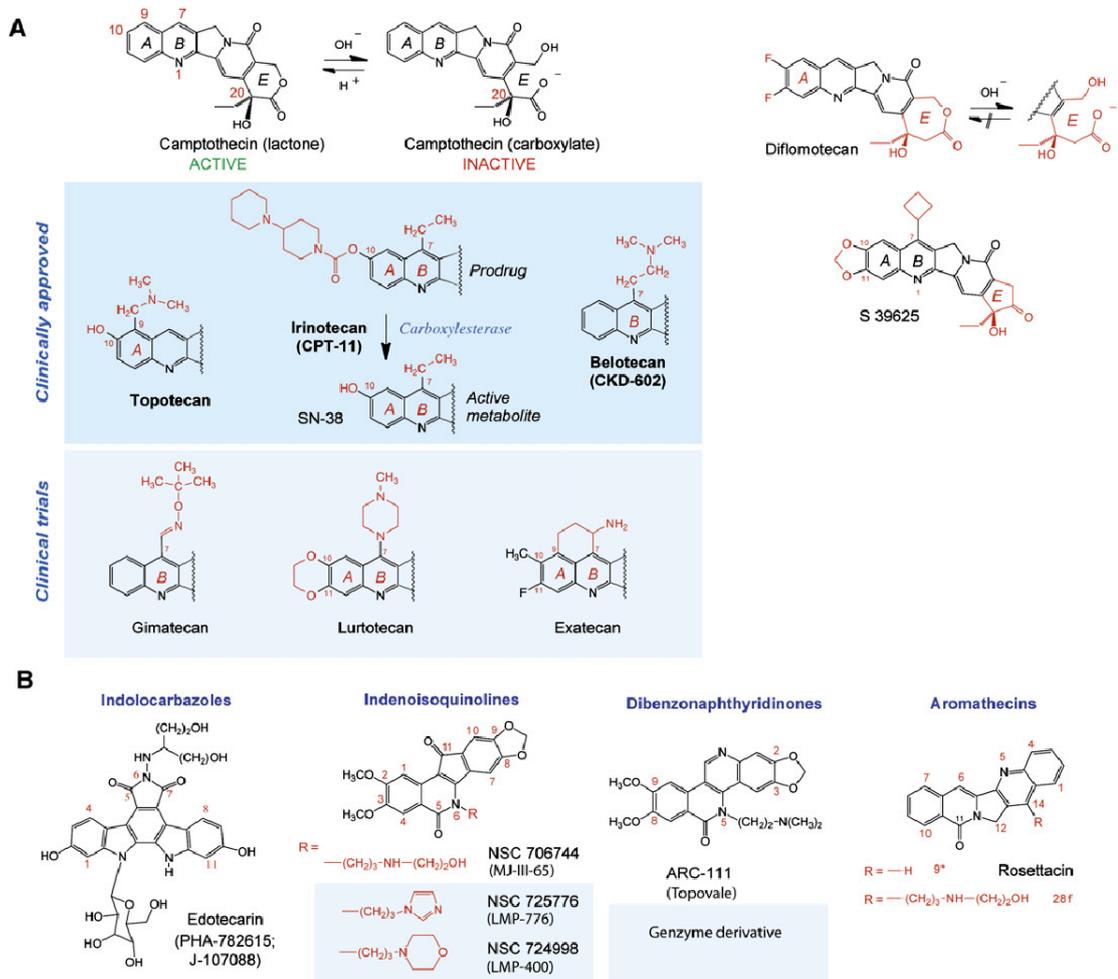


Figure 7: Les différents inhibiteurs de la Topo1. (A) La camptothécine et ses dérivées. (B) Autres familles d'inhibiteurs de la Topo1 [Pommier et al. 2009].

II.3.2 Les grandes familles d'inhibiteurs des Topo2 humaines

Les principales familles d'inhibiteurs de la Topo2 sont présentées sur la Figure 8. Les poisons de Topo2 entraînent tous une augmentation du nombre de complexes ADN-enzyme qui se traduit au final par une augmentation du nombre de cassures double-brin de l'ADN [Walker and Nitiss 2002]. On retrouve dans cette catégorie les poisons dont le mécanisme d'action passe par l'inhibition de l'étape de religation de l'ADN (Figure 8) comme les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine), les épipodophyllotoxines (étoposide), les amsacrines (mAMSA), ou les anthracènediones (mitoxantrone). Certains possèdent des propriétés d'intercalation de l'ADN comme les anthracyclines ou les amsacrines. Les anthracyclines et l'étoposide sont les plus couramment utilisés pour leur activité antitumorale en clinique [Hande 2003]. On trouve également des poisons qui agissent en augmentant le nombre de complexes formés. C'est le cas des quinolones et des éllipticines (agents intercalants) ou de la génistéine (non intercalant) (Figure 8).

Dans la catégorie des inhibiteurs catalytiques des Topo2, on retrouve des molécules comme les bisdioxopiperazines (ICRF-187 et merbarone) ainsi que le QAP1 (Figure 8). Ces agents ne stabilisent pas le complexe covalent mais inhibent de façon non compétitive l'activité ATPase de la Topo2, la merbarone n'inhibant pas l'interaction de la Topo2 avec l'ADN [Fortune and Osheroff 1998]. QAP1 est quant à lui un analogue des purines qui cible sélectivement l'activité ATPase de la Topo2 [Chene et al. 2009]. A l'exception de l'ICRF 187 utilisé pour ses propriétés cardioprotectrices des anthracyclines, les inhibiteurs catalytiques de Topo2 sont toujours en cours de développement pour leur utilisation à visée anticancéreuse.

II.4 Les lésions de l'ADN induites par les poisons de Topoisomérases

La formation des complexes de clivage est une étape cruciale du cycle catalytique des Topoisomérases. Les coupures de l'ADN qu'elles génèrent sont transitoires et leur nombre est extrêmement réduit dans les conditions normales. En présence de poisons de Topoisomérases, il existe une augmentation significative du nombre de complexes covalents ADN-enzyme qui est généralement due à l'inhibition de l'étape de religation de l'ADN. On parle généralement de « stabilisation » des complexes ADN-Topoisomérases qui se traduit par une persistance de leur durée de vie. Ce n'est pas la stabilisation des complexes en elle-même qui est cytotoxique, mais les lésions de l'ADN qui résultent de cette stabilisation. Même si plusieurs facteurs sont

impliqués dans la formation de ces lésions, le mécanisme de collision avec les fourches de réplication et/ou de transcription avec les complexes stabilisés reste le mécanisme prépondérant. Ce mécanisme a été bien démontré dans le cas de l'action des poisons de Topo1. Lorsque une fourche de réplication (ou de transcription) progresse et qu'elle entre en contact avec un complexe ADN-Topo1 stabilisé, une cassure double-brin de l'ADN est générée par un mécanisme de réplication *run-off*. Cela est argumenté par le fait qu'un traitement des cellules avec un inhibiteur de la réplication tel que l'aphidicoline supprime l'effet cytotoxique des dérivés de CPT [Holm et al. 1989]. Ce mécanisme a aussi été invoqué pour les poisons de Topo2 même si l'effet « protecteur » de l'aphidicoline est dans ce cas beaucoup moins marqué [Holm et al. 1989]. Il est donc probable que le mécanisme de conversion des complexes ADN-Topo2 en cassures double-brins fasse intervenir d'autres facteurs que les polymérase, comme les hélicases ou la simple présence de contraintes de torsions en amont et/ou en aval du complexe [Nitiss 2009b].

Une fois formées, ces lésions induisent l'activation de voies de signalisation complexes qui aboutissent soit à la mort cellulaire si elles ne sont pas réparées (c'est l'effet recherché en cancérologie), soit à la survie ou la résistance des cellules si elles sont réparées. Les systèmes de réparation des lésions induites par les poisons de Topoisomérases sont complexes et ne sont pas encore totalement élucidés. Pour ce qui concerne les cassures double-brin, l'hypothèse est qu'elles soient prises en charge par les systèmes de recombinaison de l'ADN qu'il soit homologue (le plus souvent) ou non-homologue [Aratani et al. 1996; Powell and Kachnic 2008 ; Treszezamsky et al. 2007]. Pour ce qui concerne la réparation des complexes covalents ADN-Topoisomérases irréversibles, plusieurs mécanismes ont été impliqués. Schématiquement, il s'agit de mécanismes dans lesquels la molécule de Topoisomérase fixée de manière covalente à l'ADN est éliminée soit par dégradation par le protéasome et excision par des enzymes spécialisées, TDP1 pour les Topo1 [Perego et al. 2011] et TDP2 pour les Topo2 [Zeng et al. 2011], soit par l'action d'endonucléases en amont de la molécule de Topoisomérase qui permet d'éliminer directement le brin d'ADN sur lequel est irréversiblement attachée l'enzyme [Deng et al. 2005].

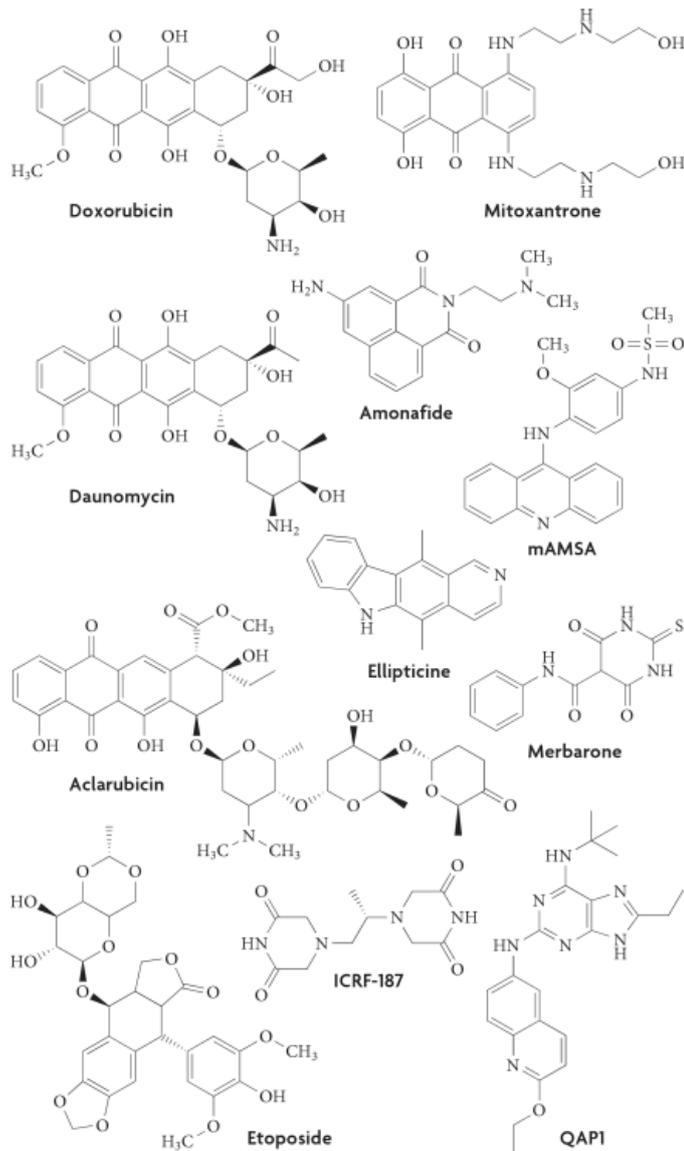


Figure 8 : Les principaux poisons de la Topo2 [Nitiss 2009b]

II.5 Déterminants de la réponse cellulaire aux inhibiteurs de Topoisomérases

La sensibilité cellulaire aux poisons de Topoisomérases dépend de multiples facteurs qui sont généralement classés en trois grandes catégories. : (1) les mécanismes liés au métabolisme ou au transport des médicaments ; (2) les mécanismes qui influencent directement ou indirectement la formation des complexes covalents ADN-Topoisomérases; les mécanismes qui ont traités à la signalisation au sens large des lésions qui résultent de la stabilisation des complexes. Ces mécanismes incluent toutes les voies impliquées dans la détection des lésions, dans la signalisation de ces lésions

aux systèmes de contrôle du cycle cellulaire, aux systèmes de mise en place de la mort cellulaire, et aux systèmes de réparations.

II.5.1 Mécanismes liés au transport ou au métabolisme de la drogue

L'un des premiers mécanismes de résistance à avoir été décrit est celui du transport des médicaments, phénomène initialement référencé sous le nom générique de *Multidrug Resistance* (ou MDR), à cause de la surexpression du gène MDR1. Ce gène code pour la glycoprotéine-P, une protéine membranaire responsable de l'efflux actif de médicament hors de la cellule, empêchant ainsi le médicament d'atteindre sa cible. Depuis sa découverte, beaucoup d'autres transporteurs ont été identifiés et regroupés dans la famille des ABC transporteurs dans laquelle la glycoprotéine-P correspond au gène ABCB1. Hormis ABCB1 seuls deux autres transporteurs, ABCC1 (ou MRP pour *Multidrug resistance-associated protein 1*) et ABCG2 (ou BCRP pour *Breast Cancer resistance Protein*) ont été impliqués dans la résistance aux agents anticancéreux. ABCB1 possède une « affinité » particulière à expulser les poisons de la Topo2, comme ABCC1 qui est impliqué dans la résistance cellulaire aux anthracyclines et à l'étoposide [Lepper et al. 2005]. En revanche, les poisons de la Topo1 tels que l'irinotécan et le topotécan sont plutôt des substrats d'ABCG2 qui a un effet important sur la pharmacocinétique de ces molécules [Ohtsuka et al. 1726].

Le métabolisme des inhibiteurs de Topoisomérases peut également avoir des conséquences sur la sensibilité des cellules au médicament par une modification de l'interaction du métabolite avec l'enzyme (ou l'ADN). L'exemple le plus marquant est celui des anthracyclines dont la capacité à produire des radicaux libres induit leur couplage avec le glutathion. On a ainsi pu observer des surexpressions de glutathion et/ou de ses enzymes de couplage dans des cellules résistantes à l'adriamycine ou à la mitoxantrone [Dusre et al. 1989]. L'effet de l'étoposide est également dépendant de son inactivation dans l'organisme par hydrolyse, sulfatation, déméthylation ou oxydation [Jacob et al. 2011]. Pour ce qui concerne les poisons de Topo1, l'action de l'irinotécan est aussi conditionnée par son hydrolyse en métabolite actif SN38 après action de la carboxyestérase. Le SN38 est également inactivé par glucuroconjugaison par l'UGT1A. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que la dérégulation de ces voies, comme par exemple la présence d'un polymorphisme au niveau du promoteur du gène de l'UGT1A1, peuvent avoir de telles conséquences sur la toxicité de l'irinotécan

[Biason et al. 2008], que la FDA a demandé sa recherche systématique avant administration du traitement.

II.5.2 Mécanismes liés à la formation des complexes ADN-Topoisomérases

Comme nous l'avons vu, la cytotoxicité des poisons de Topo est liée aux cassures double-brin résultant de la stabilisation des complexes ADN-enzyme. La quantité de ces complexes présents au moment du traitement représente donc un élément clé de l'efficacité de ces agents. Plusieurs facteurs sont capables d'influencer la formation de ces complexes *in vitro* et au niveau cellulaire.

II.5.2.1 Résistance liée à des mutations de l'enzyme

La présence de mutations ponctuelles des Topoisomérases sont connues pour affecter directement le positionnement et/ou l'interaction de la drogue au niveau du site actif de l'enzyme. Un grand nombre de mutations de la Topo1, retrouvées dans des lignées résistantes aux dérivés de la CPT conduisent à une réduction ou une absence de stabilisation des complexes [Pommier et al. 1999]. La plupart sont situées au niveau de la zone d'interaction entre l'enzyme et l'ADN dans des positions particulières qui affectent surtout le positionnement du poison pour exercer sa fonction d'inhibition de l'étape de religation [Staker et al. 2002]. Pour ce qui concerne les Topo2, les multiples mutations répertoriées sont classées en trois groupes [Wu et al. 2011] : les mutations affectant l'interaction entre l'inhibiteur et la Topo2 dont l'effet est très différent en fonction de la mutation et de l'inhibiteur concerné ; les mutations affectant la liaison de la Topo2 à l'ADN ; et les mutations qui altèrent l'interaction entre le domaine ATPase et le domaine TOPRIM notamment [Gilroy et al. 2006], ces deux catégories de mutations conférant une résistance à la plupart des inhibiteurs de Topo2.

Si l'ensemble de ces mutations confère bien un haut niveau de résistance dans des modèles de cellules en culture, seules des mutations de la Topo2 ont été retrouvées chez un patient atteint de cancer du poumon traité par l'étoposide [Kubo et al. 1996], suggérant que les mécanismes de résistance clinique aux deux types d'inhibiteur est probablement différent.

II.5.2.2 Mécanismes liés au niveau d'expression des Topoisomérases

Il est légitime de penser que plus le niveau des Topoisomérases est élevé au sein d'une cellule, plus il y a de chances de stabiliser des complexes ADN-enzyme et d'obtenir un nombre élevé de cassures. Un grand nombre d'études ont tenté de confirmer une telle hypothèse. Pour certaines, on observe bien une diminution de la quantité de Topo1 dans des lignées résistantes à la CPT [Kapoor et al. 1995; Tan et al. 1989]. Plus directement, la réduction du niveau de Topo1 par interférence à l'ARN confère bien une résistance à la CPT *in vitro* et *in vivo* [Burgess et al. 2008]. Le même type d'observation a été réalisé *in vitro* dans le cas des poisons de Topo2 (anthracyclines et étoposide) qui sont plus cytotoxiques dans des cellules qui surexpriment l'enzyme que dans des cellules où elle est réprimée [Beck et al. 1993; Burgess et al. 2008]. En revanche, d'autres études ne montrent pas de corrélation entre la quantité d'enzyme et/ou le nombre de complexes formés et la sensibilité aux dérivés de CPT [Goldwasser et al. 1995]. Le même constat a été fait pour ce qui concerne l'existence de corrélation entre l'amplification de la Topo2 α et la réponse clinique aux anthracyclines dans la mesure où l'on ne sait pas si elle est corrélée à une augmentation du niveau de l'enzyme. De plus, des réponses cliniques sont observées chez des patients où la Topo2 est délétée [Mano et al. 2007]. Cela suggère donc que d'autres facteurs entrent en ligne de compte.

II.5.2.3 Mécanismes liés aux modifications des Topoisomérases et à leur interaction avec d'autres protéines

Plusieurs kinases (caséine kinase, protéine kinase C, tyrosine kinase) peuvent phosphoryler les Topoisomérases *in vitro* ou au niveau cellulaire et modifier leur activité catalytique avec un impact direct sur l'effet des inhibiteurs. En fonction de la kinase impliquée (et du résidu phosphorylé), les conséquences de la phosphorylation peuvent être différentes. La phosphorylation de la Topo1 par la caséine kinase II ou la PKC entraîne une augmentation de son activité [Cardellini et al. 1994; Cardellini and Durban 1993; Durban et al. 1985; Kordiyak et al. 1994; Pommier et al. 1990; Samuels et al. 1989]. En revanche sa déphosphorylation entraîne une résistance à la CPT [Pommier et al. 1990]. Le même type d'effet est observé pour les Topo2 puisque selon les conditions, la résistance à l'étoposide peut s'accompagner d'une hyper ou d'une hypophosphorylation de la protéine [Chikamori et al. 2003; Ganapathi et al. 1996; Plo et al. 2002; Takano et al. 1991].

Les Topoisomérases sont également des substrats des E3-ubiquitine ligase et sont rapidement ubiquitinées après traitement avec des inhibiteurs, une étape qui précède leur dégradation par le protéasome. L'ubiquitination survient rapidement après stabilisation des complexes par le poison et permet de révéler la présence des cassures et de faciliter leur accessibilité pour être réparées [Mao et al. 2001]. Les Topoisomérases sont également SUMOylées en réponse aux inhibiteurs [Agostinho et al. 2008; Huang et al. 2007b; Mao et al. 2000]. Cette modification correspond à l'ajout de molécules SUMO-1 (pour *small ubiquitin-like modifier-1*) sur des résidus lysine de l'enzyme. Contrairement à l'ubiquitylation, la SUMOylation n'induit pas la dégradation de l'enzyme. Dans le cas des Topo1, elle n'affecterait pas l'activité catalytique [Horie et al. 2002], mais induirait une délocalisation de la protéine hors des nucléoles expliquant un défaut de formation des complexes ADN-Topo1 par les dérivés de CPT [Horie et al. 2002; Mao et al. 2000; Rallabhandi et al. 2002]. La SUMOylation de la Topo2 α en revanche, entraîne une inhibition de son activité de décaténation [Ryu et al. 2010], suggérant que cette modification influencerait l'arrêt du cycle induit par les inhibiteurs de Topo2 au moment de l'entrée en mitose.

Les Topoisomérases sont également des substrats de la poly(ADP)ribose polymérase (PARP) *in vitro* qui permet de greffer des chaînes de poly(ADP)riboses et de réguler de multiples voies de signalisation [Krishnakumar and Kraus 2010], en particulier dans la réparation des lésions de l'ADN. L'inactivation de PARP ou l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de PARP tel que le NU1025, induisent une sensibilisation des cellules aux dérivés de CPT [Zhang et al. 2011] mais pas à l'étoposide [Bowman et al. 2001]. Cela suggère que la poly(ADP)ribosylation de la Topo1 est impliquée dans la réparation des lésions induites par les CPT, l'effet de la polyADP ribosylation des Topo2 étant plus difficile à interpréter au niveau cellulaire.

La Topo1 et les deux isoformes de la Topo2 interagissent avec un grand nombre de protéines qui peuvent directement ou indirectement influencer la formation des complexes et se traduire par une altération de la sensibilité aux inhibiteurs de Topoisomérases [Nitiss 2009b]. La Topo1, *via* son domaine N-terminal est capable de se lier aux ARN polymérases, aux hélicases à ARN, mais aussi à de nombreux hnRNP ou snRNP impliqués dans le métabolisme et l'épissage des ARNm. La Topo1 interagit aussi avec les facteurs impliqués dans la réplication de l'ADN comme les polymérases ou les hélicases tels que WRN qui protège contre les lésions induites par les inhibiteurs de Topo1 [Christmann et al. 2008]. Des interactions avec des protéines de la réparation

de l'ADN ont également été rapportées avec des conséquences importantes en termes de régulation de la sensibilité aux inhibiteurs de Topo1, comme nous l'avons évoqué précédemment pour p53 ou PARP. C'est le cas de l'interaction avec la DNA-PKcs [Czubaty et al. 2005] dont on sait que l'inactivation sensibilise les cellules à la CPT [Arnaudeau et al. 2001; Hinz et al. 2003; Shao et al. 1999], ou avec TDP-1 (Tyrosyl – DNA phosphodiesterase), enzyme découverte en 1996 capable de couper le lien tyrosyl-DNA phosphodiester entre la Topo1 et l'ADN, laissant un phosphate sur l'extrémité 3' [Yang et al. 1996] qui intervient dans l'élimination des complexes irréversibles ADN-Topo1 (voir ci-après) et dont l'inactivation accentue la cytotoxicité de ce type de lésions [Hirano et al. 2007; Katyal et al. 2007]. Citons enfin Par-4 (*Prostate apoptosis response-4*) protéine impliquée dans l'apoptose pour laquelle l'interaction avec la Topo1 induit une diminution de la relaxation par « séquestration » de l'enzyme, ce qui en fait un répresseur intracellulaire pouvant réguler l'activité de la CPT et de ses dérivés [Goswami et al. 2008].

II.5.2.4 Mécanismes liés à la réparation des cassures

Comme nous l'avons vu précédemment, ce sont les cassures double-brin de l'ADN qui sont responsables de la cytotoxicité des poisons de Topoisomérases. Que ce soit pour les poisons de Topo1 ou de Topo2, ces cassures double-brin sont généralement réparées par les systèmes de recombinaison de l'ADN, qu'elle soit homologue (HR) ou non-homologue (NHEJ). En revanche, les systèmes de réparation des complexes covalents ADN-Topoisomérases sont beaucoup moins bien définis [Beretta et al. 2008; Pommier 2006]. Pour ce qui concerne la réparation des complexes ADN-Topo1, deux mécanismes ont été évoqués. L'un est le système de réparation par excision de base (BER). Dans ce mécanisme la Topo1 est tout d'abord dégradée par le protéasome puis les derniers acides aminés (y compris la tyrosine) sont détachés de l'ADN par une enzyme spécialisée appelée tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP-1). L'intervention d'une polynucléotide kinase phosphatase (PNKP) rétablit la polarité 3'-OH et 5'-phosphate pour une nouvelle synthèse de brin. Un déficit en TDP-1 confère une résistance aux dérivés de CPT [Nivens et al. 2004]. L'autre mécanisme impliquerait le système de réparation par excision de nucléotide (NER) qui éliminerait l'ensemble Topo1-ADN en 5' de la cassure grâce à l'activité endonucléasique de complexes protéiques tels que Mre11/Rad50/NBS1, XPF/ERCC1 ou MUS81/EME1 [Beretta et al. 2008; Pommier 2006], la partie simple-brin éliminée étant re-synthétisée. Pour ce qui

concerne les lésions induites par les poisons de Topo2, la réparation consiste à éliminer les monomères d'enzyme attachés de manière irréversibles aux extrémités de la cassure. Elle impliquerait, comme c'est le cas dans la réparation des complexes ADN-Topo1, la dégradation de la Topo2 par le protéasome, et l'excision de la liaison 5'-phosphotyrosyl par une 5'-tyrosyl phosphodiesterase (TDP2) [Cortes Ledesma et al. 2009]. Une autre possibilité serait que l'endonucléase FEN-1, spécialisée dans l'élimination de portions protrusives d'ADN ou « *flap* », puisse couper en amont de la liaison phosphotyrosyle et éliminer les monomères de Topo2 attachés au *flap*, les nucléases CtiP et Mre11 finissant de préparer les extrémités de la cassure au processus de recombinaisons. Que ce soit chez la levure ou chez l'homme, de nombreux gènes impliqués dans ces voies modulent la sensibilité à l'étoposide [Nitiss 2009b]. HR et NHEJ sont stimulés par l'étoposide [Aratani et al. 1996] et leur déficit sensibilise les cellules à ce poison [Adachi et al. 2003; Powell and Kachnic 2008; Treszezamsky et al. 2007].

II.5.3 Les autres déterminants de la réponse

Beaucoup d'autres facteurs peuvent moduler la réponse aux poisons de Topoisomérases. Ils interviennent pour la plupart dans la signalisation des cassures de l'ADN en aval de la stabilisation des complexes. On peut citer les protéines senseurs de lésion telles que les kinases ATM (*Ataxia telangectasia mutated*), ATR (*ATM-related*) et DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) qui sont à leur tour activées pour transmettre le signal à d'autres protéines effectrices comme les kinases Chk1 ou Chk2 impliquées dans les points de contrôle du cycle cellulaire au niveau des transitions entre les phases G1/S et G2/M. L'activation de ces kinases est nécessaire à l'arrêt du cycle cellulaire afin de permettre aux cellules de mettre en place les différents systèmes de réparation des cassures. De nombreuses études ont montré qu'un dysfonctionnement de ces voies de signalisation pouvait altérer la sensibilité aux dérivés de CPT [Arnaudeau et al. 2001; Cliby et al. 2002; Flatten et al. 2005; Furuta et al. 2003; Hinz et al. 2003; Redon et al. 2003; Shao et al. 1999; Wang 2002] ainsi qu'aux inhibiteurs de Topo2 [Mansilla et al. 2009; Sliwinska et al. 2009; Ubezio et al. 2009].

D'autres gènes impliqués directement ou indirectement dans la régulation de ces voies de signalisation peuvent également moduler la sensibilité aux inhibiteurs de Topoisomérases sans que le mécanisme par lequel ils exercent cet effet ne soit totalement élucidé. Leur identification provient essentiellement d'études recherchant de nouveaux marqueurs de sensibilité à ces agents. On peut citer l'exemple de la protéine

14.3.3ε dont l'interaction avec la Topo2α entraîne une inhibition de l'activité de l'enzyme et la réduction du nombre de complexes stabilisés par l'étoposide [Kurz et al. 2000]. On peut également citer le gène HIF1α impliqué dans les processus de sénescence et d'hypoxie [Duyndam et al. 2007; Lee et al. 2009; Sullivan and Graham 2009], le gène Twist1 impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse [Li et al. 2009b], ou même des transporteurs mitochondriaux tels que ABCB8 [Elliott and Al-Hajj 2009]. Cette liste non exhaustive montre le niveau de complexité de ces voies de signalisation et l'étendue des mécanismes de résistance à ces agents.

III L'historique de FAM110B

Comme nous l'avons évoqué, l'un des grands enjeux de la pharmacologie anticancéreuse est d'identifier de nouvelles stratégies permettant de contourner la résistance clinique au traitement. Hormis l'identification de nouvelles drogues, des efforts considérables ont été faits pour identifier les gènes impliqués dans la réponse aux médicaments anticancéreux déjà utilisés. La meilleure compréhension des mécanismes de réponse à ces médicaments peut en effet aboutir à l'identification de nouveaux gènes dont la dérégulation est responsable de l'acquisition du phénotype de résistance. Très schématiquement, la réponse cellulaire à un agent cytotoxique dépend de la balance entre les gènes de sensibilité dont l'expression est essentielle à la mort des cellules et les gènes de résistance dont l'expression est nécessaire à leur survie.

La stratégie de recherche des gènes de résistance a pour la plupart du temps consisté à comparer des cellules sensibles à l'agent cytotoxique avec des cellules rendues résistantes à cet agent par exposition à des concentrations croissantes de médicament. Ces études comparatives du type hybridation soustractive ou *differential display* RT-PCR ou encore de *microarrays* ont permis d'identifier un certain nombre de gènes comme les gènes codant pour les pompes membranaires expulsant les médicaments hors des cellules, ou certains gènes de détoxification des xénobiotiques, ou certains gènes impliqués dans la réparation de l'ADN qui sont amplifiés dans les cellules résistantes. Cependant, ce type d'étude ne permettait pas d'avoir accès aux gènes dont l'expression était requise pour que le médicament exerce son effet cytotoxique. Or, la résistance peut résulter de l'inactivation de tel gène, ce qui rendait leur identification plus difficile. Mais avec l'évolution des techniques de criblage fonctionnel, un nombre croissant de ces gènes clés ont été identifiés. Le principe sur lequel repose ces criblages et celui du « *synthetic lethal screen* » dans lequel des

banques d'éléments régulateurs (fragments de cDNA, siRNA, miRNA) sont utilisées pour conférer aux cellules dans lesquelles ces éléments sont introduits, des propriétés particulières vis à vis d'un agent cytotoxique, en l'occurrence la résistance à cet agent. Ce type de criblage est possible à grande échelle grâce à l'utilisation de banques de siRNA ciblant l'ensemble du génome. L'utilisation de ce type de banque permet d'identifier le ou les siRNAs capable(s) de conférer un phénotype sélectionnable aux cellules, comme par exemple la résistance à un agent cytotoxique. Si un siRNA permet de rendre la cellule résistante à un agent, cela implique que le gène réprimé par ce siRNA est nécessaire à l'action de cette drogue. Même si cette méthodologie est encore couteuse, elle a depuis longtemps remplacé toutes les autres approches de criblage fonctionnel car elle est rapide, et permet d'étudier en théorie la répression spécifique de chacun des gènes d'une cellule sur l'acquisition du phénotype étudié.

Dès 1991, Igor B. Roninson avait développé une approche similaire reposant sur la méthodologie de sélection d'éléments génétiques suppresseurs (GSE). Les GSEs sont des petits fragments d'ADNc de 200 à 500 pb qui lorsqu'ils sont exprimés en orientation sens ou anti-sens conduisent à des peptides ou des ARN anti-sens capables d'inhiber la fonction ou l'expression du gène dont il est issu (Figure 9).

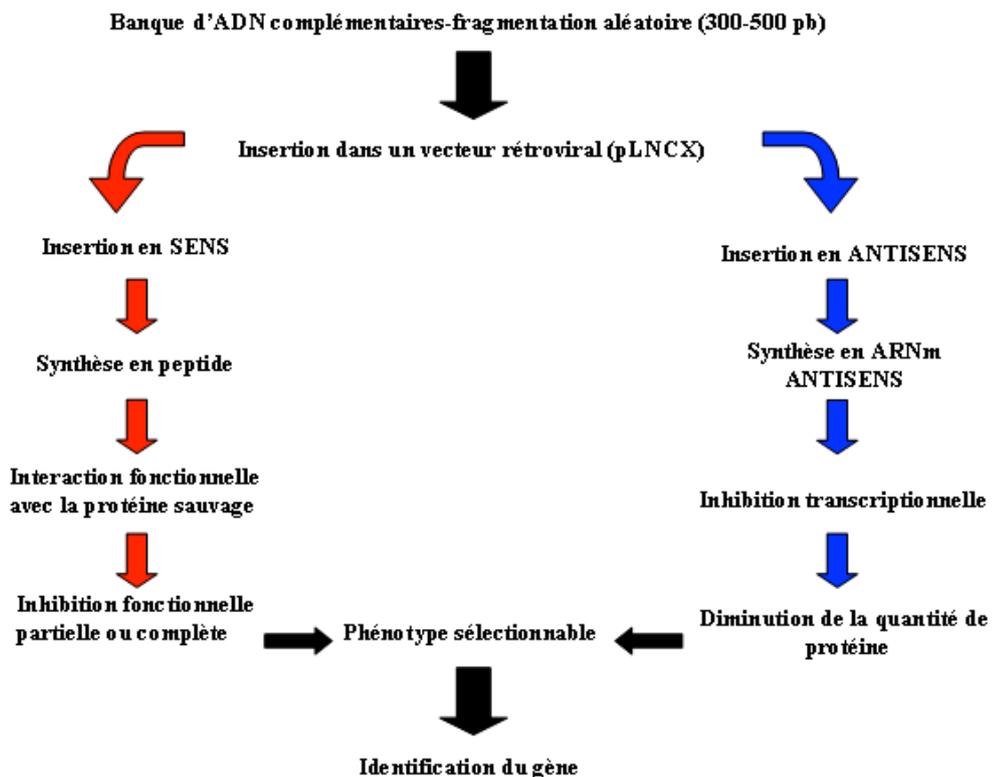


Figure 9 : Méthodologie de sélection d'éléments génétiques suppresseurs (GSEs)

Si l'inhibition de ce gène confère un phénotype que l'on peut sélectionner (comme par exemple la résistance à un agent cytotoxique), il est possible d'identifier le GSE contenu dans les cellules émergent de la sélection et de remonter au gène dont il est issu par simple comparaison de séquence. Cette méthodologie de criblage fonctionnel permet donc d'identifier des gènes dont la répression conduit à la résistance, donc des gènes de sensibilité. Bien que très lourde à mettre en œuvre par rapport aux méthodes de criblages siRNA actuelles, elle a permis d'identifier des gènes de sensibilité aux inhibiteurs de Topoisomérase [Delaporte et al. 1999] ainsi que des gènes impliqués dans beaucoup d'autres processus que la réponse aux médicaments anticancéreux comme hMSH2 [de las Alas et al. 2002], le gène de l'arginine méthyltransférase [Gros et al. 2003], STAT et AP1 [Primiano et al. 2003]. En 2003, cette méthodologie a permis l'identification de onze GSEs conférant la résistance à un inhibiteur de Topo2, la 9-OH-E [Gros et al. 2003]. A ce jour, seul le GSE1 qui était le GSE le plus fréquemment retrouvé dans ce crible a pu être caractérisé en détail. Il est issu d'un gène codant une nouvelle protéine arginine méthyltransférase (PRMT7) dont l'activité régule la sensibilité aux inhibiteurs de Topo2 mais aussi à d'autres agents endommageant l'ADN [Miranda et al. 2004; Verbiest et al. 2008]. La caractérisation du GSE13 a débuté il y a quelques années dans le groupe de P. Pourquier et D. Montaudon avec tout d'abord la caractérisation du gène humain dont il est issu. Ce gène est localisé en position q12.1 du chromosome 8 (orf72chr8). L'organisation de ce gène à partir de l'analyse bioinformatique des données de séquençage semblait indiquer qu'il ne contenait qu'un intron de 70283 pb situé en amont du premier codon d'initiation, encadré en amont par un exon de 67 pb et en aval par un exon de 2877 pb comprenant une région 5' non traduite de 324 pb, la partie codante du gène de 1110 pb, et une région 3' non codante de 1440 pb (Figure 10). Ces informations suggéraient l'existence d'un épissage de l'ARN pré-messager. Elles montraient également une homologie non négligeable avec le cadre ouvert de lecture d'un autre gène putatif localisé sur le chromosome 20 (gène appelé orf55chr20). Ce gène possède d'ailleurs la même organisation exon-intron que le gène issu du GSE13. Cette homologie revêt une importance particulière puisqu'elle suggérait l'existence d'une famille de gènes et une éventuelle duplication du gène au cours de l'évolution supputant un rôle biologique potentiellement important pour les protéines de cette nouvelle famille. Le laboratoire avait également mis en évidence que l'ADNc correspondant à ce gène codait une

protéine d'environ 40 kDa appelé alors p40, dont la séquence est très conservée chez les eucaryotes.

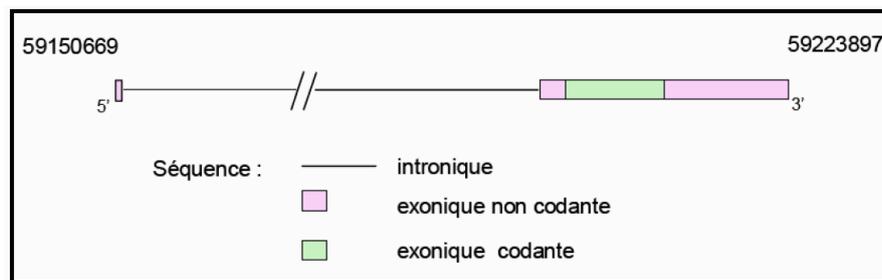


Figure 10: Structure du gène humain dont est issu le GSE13 (*gene ID* : 90362)

En 2007, lors d'une recherche de partenaires de la protéine CSPP (*centrosome/spindle pole-associated protein*) par la technique du double hybride chez la levure, une équipe norvégienne identifiait un gène de la même famille que P40 localisé sur le chromosome 20, orf55chr20 [Hauge et al. 2007]. L'interrogation des banques de données permit à ces auteurs d'identifier les deux autres gènes de la même famille localisés l'un sur le chromosome 8 (orf72chr8), l'autre sur le chromosome 2 (ENST00000327669). Ces auteurs ont appelé cette famille de gènes FAM110 (nomenclature officialisée par le consortium HUGO). Ces gènes codent pour trois isoformes FAM110A, B & C dont les poids moléculaires prédictifs sont respectivement de 31,2, 40,7 et 33,9 kDa. Dans cette famille, p40 correspond à FAM110B. Cette étude montrait également, un rôle des protéines FAM110 dans le contrôle du cycle cellulaire avec une accumulation des différentes isoformes au niveau du centrosome et au pôle du fuseau au cours de la mitose et un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 induit par les isoformes FAM110B et C. Une deuxième étude sur FAM110B publiée en 2011 montre à partir d'un crible de CGH *array* dans des cellules de prostate hormono-résistantes que FAM110B régule l'expression des récepteurs aux androgènes et de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) et démontre son implication dans la croissance et la progression tumorale [Vainio et al. 2011].

Au début de notre travail de thèse, nous disposions de très peu d'informations concernant FAM110B. Dans les banques de données informatiques, la comparaison de sa séquence à celles d'autres protéines révélait une faible homologie avec une protéine murine se liant à l' α -caténine *binding protein* (ACBP) (Figure 11). Malgré cette faible homologie de séquence, l'interaction entre FAM110B et l' α -caténine a été confirmée

dans des cellules en culture et une interaction entre FAM110B et la β -caténine a été démontrée. L' α -caténine et la β -caténine sont deux protéines impliquées dans la cohésion cellulaire. La β -caténine est aussi un co-activateur majeur de la transcription de nombreux gènes régulant divers processus biologiques fondamentaux tels que la prolifération cellulaire, la transition épithélio-mésenchymateuse, les processus d'invasion ou de migration nécessaire à la formation de métastase, processus dans lesquels nous avons étudié le rôle potentiel de FAM110B.

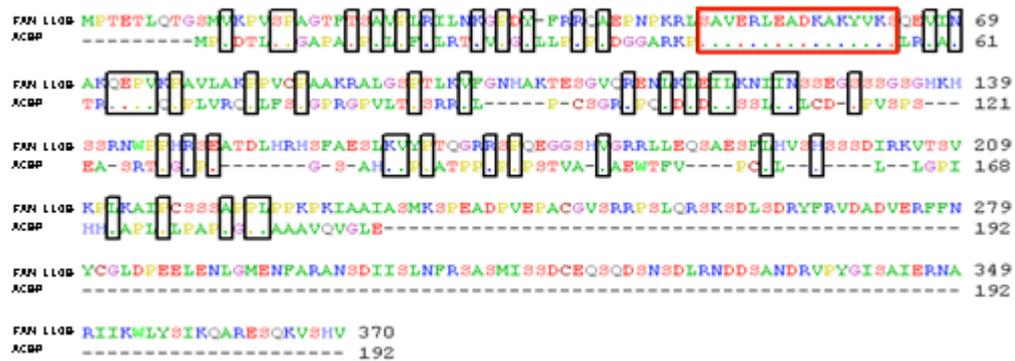


Figure 11: Comparaison des séquences de la protéine FAM110B et de l'*alpha-catenin binding protein* (ACBP) à l'aide du programme Bioedit.

IV La β -caténine

Elle appartient à la famille des caténines dont le nom latin « catena » veut dire « chaîne ». Ces protéines établissent un lien entre les cadhérines et le réseau d'actine. En dehors de la β -caténine, cette famille comprend la caténine-p120, la γ -caténine (ou plakoglobine) et l' α -caténine. La β -caténine, la caténine-p120 et la γ -caténine sont des protéines de la famille Armadillo tandis que l' α -caténine est un homologue de la vinculine, une autre protéine liant également l'actine [Rudini and Dejana 2008].

IV.1 Structure de la β -caténine

La β -caténine est l'homologue de la protéine Armadillo identifiée pour la première fois chez la drosophile et retrouvée chez les vertébrés [McCrea et al. 1991]. Les protéines de la famille Armadillo sont caractérisées par des répétitions de motifs «armadillo» ou «arm» qui favorisent les interactions protéine-protéine et sont responsables de la formation de larges complexes multiprotéiques.

Comme le montre la figure 12, l'organisation moléculaire de la β -caténine reflète ses différentes fonctions avec des sites de phosphorylation N-terminaux pour la

GSK3 β (*Glycogen Synthase kinase 3 β*) et la CK1 (caséine kinase 1) dont la phosphorylation conduit à sa dégradation par le protéasome. Jouxant cette région N-terminale, 13 répétitions de motifs « arm » de 42 acides aminés forment une triple hélice α [Huber et al. 1997] et constituent les sites d'interaction avec l'axine et l'APC (*Adenomatosis Polyposis Coli*), protéines du complexe de dégradation de la β -caténine mais aussi d'un facteur transcriptionnel, TCF/LEF (*T-Cell Factor/ Lymphoid Enhancer Factor*). La β -caténine présente également des sites de fixation pour deux protéines d'adhésion cellulaire, l' α -caténine et la E-cadhérine situés respectivement au niveau N-terminal et dans le « segment Armadillo ». Ces sites permettent la formation d'un complexe ternaire régulée par phosphorylation de résidus sérine et tyrosine [Perez-Moreno and Fuchs 2006].

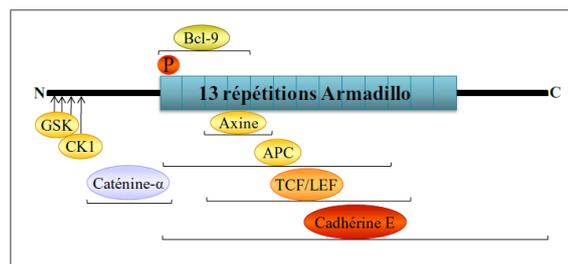


Figure 12: Structure en domaines de la β -caténine. Les 13 domaines « armadillo » et les domaines N- et C-terminaux sont schématisés. Les sites d'interactions de la β -caténine avec ses principaux partenaires moléculaires sont indiqués. [Harris and Peifer 2005].

IV.2 Rôles biologiques de la β -caténine

D'un point de vue fonctionnel, la β -caténine est une molécule impliquée à la fois dans l'adhésion cellulaire et dans la signalisation. Dans sa première fonction, elle est liée, dans le cytoplasme, au cytosquelette d'actine *via* son interaction avec l' α -caténine et, au niveau des jonctions intercellulaires, à la E-cadhérine [Kemler 1993]. La β -caténine membranaire joue donc un rôle majeur dans les interactions cellulaires des tissus épithéliaux et dans le maintien de l'architecture tissulaire. La β -caténine est par ailleurs une molécule essentielle de la voie de signalisation Wnt qui intervient largement dans le développement embryonnaire de nombreux tissus et l'hémostasie des tissus adultes [Logan and Nusse 2004]. Cette voie est exceptionnelle quant à sa complexité et au nombre d'éléments qui la constituent (Figure 13).

- En absence de ligand Wnt (Figure 13A), la β -caténine est destinée à être dégradée après sa phosphorylation par les protéines sérine/thréonine kinases, GSK3 β [Yost et al. 1996] et CK1 α (*Casein Kinase 1 α*) [Amit et al. 2002; Yanagawa et al. 2002]

associées à l'axine et l'APC [Hart et al. 1998; Kishida et al. 1998]. Ce complexe est ensuite reconnu par la β -TrCP (β -*Transducin Repeat-Containing-Protein*), l'ubiquitine ligase qui reconnaît spécifiquement la β -caténine phosphorylée. Après ubiquitination, la β -caténine est dégradée par le protéasome 26S. En absence de signal Wnt, TCF agit comme un répresseur des gènes cibles de Wnt [Brannon et al. 1997] en formant un complexe avec la protéine Groucho [Cavallo et al. 1998; Clevers 2002].

- La voie Wnt est initiée par la liaison de ligands Wnt (19 ont été identifiés chez l'homme) sur deux récepteurs, Frizzled et LRP-5/6 (Figure 13B). En présence de ligands Wnt, la phosphorylation des deux récepteurs, par les kinases GSK3 β et CK1 α , provoque le recrutement des protéines *dishevelled* (Dsh) et axine à la membrane. L'absence de l'axine dans le complexe de dégradation ainsi que la déphosphorylation de la β -caténine par la phosphatase PP2A ont pour conséquence de stabiliser la β -caténine dans le cytoplasme [Cliffe et al. 2003; Tamai et al. 2004; Yang et al. 2003]. La β -caténine peut alors gagner le noyau où elle va jouer un rôle de co-facteur de la transcription de gènes participant au développement par interaction avec les facteurs TCF/LEF liés à l'ADN [Behrens et al. 1996; Korinek et al. 1997; Morin et al. 1997]. Une fois dans le noyau, la β -caténine convertit le complexe TCF en complexe d'activation transcriptionnelle en le dissociant de Groucho et en recrutant l'histone acétylase CBP/p300 (*Cyclic AMP response element-Binding protein*) et la protéine TBP (*TATA box Binding Protein*) [Hecht et al. 2000]. Les protéines Brg-1, Pontine, Reptine, Legless/Bcl9 et Pygopus interviennent également en tant que co-activateurs du complexe β -caténine/TCF [Brembeck et al. 2006]. A l'opposé, Chibby et ICAT (*Inhibitor of β -Catenin And TCF*) [Wu et al. 1038; Zirn et al. 2005] constituent des répresseurs de l'activité de la β -caténine en favorisant son transport du noyau vers le cytoplasme. NLK/Nemo et la protéine 14-3-3 régulent, quand à eux, l'activité TCF par phosphorylation [Logan and Nusse 2004].

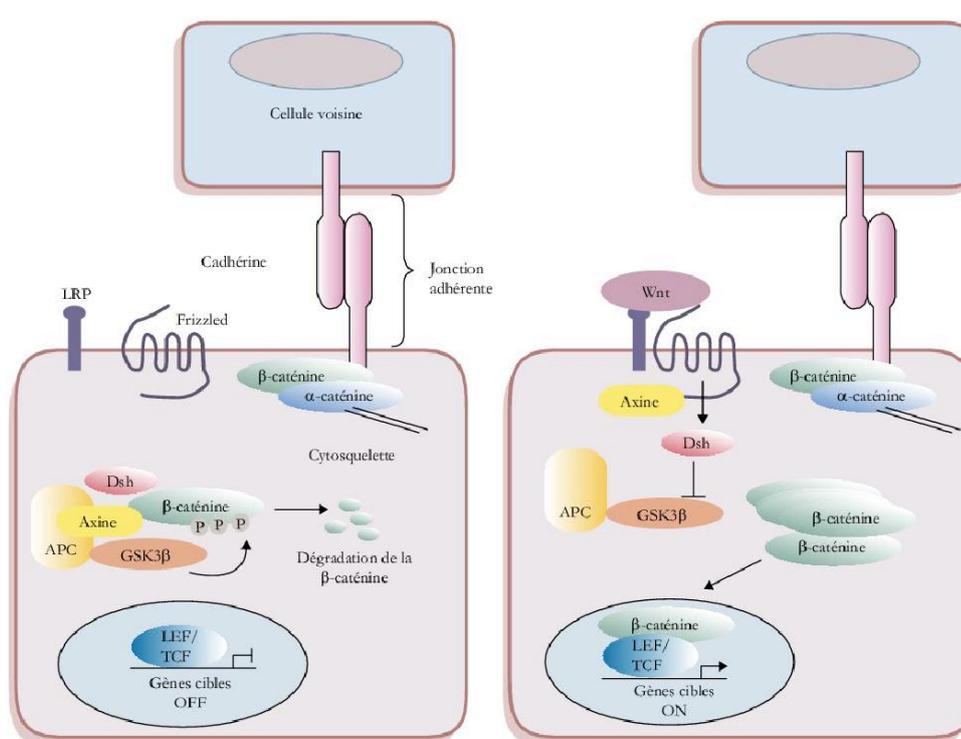


Figure 13: Schématisation de la voie de signalisation Wnt. En absence d'activation la voie Wnt, la β -caténine est associée à un complexe d'ubiquitination qui entraîne sa dégradation *via* le protéasome 26S. L'activation de la voie Wnt inhibe le complexe de dégradation, la β -caténine est stabilisée, transloquée dans le noyau où elle pourra interagir avec les facteurs de transcription TCF et se fixe au niveau des régions promotrices des gènes dont elle régule l'expression [Reya and Clevers 2005].

Parmi les gènes transcrits, nous citons le gène *myc* [He et al. 1998] dont le rôle activateur de la transcription est bien connu, et le gène de la cycline D1 [Takayasu et al. 2001] impliquée dans le cycle cellulaire.

Le rôle biologique de la β -caténine est par conséquent étroitement lié à sa localisation subcellulaire. En dehors de la fixation des ligands Wnt sur les récepteurs transmembranaires, sa transformation de protéine d'adhésion cellulaire en cofacteur de transcription est régulée par différents processus.

IV.3 Mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine

IV.3.1 Régulation par des facteurs régulant la voie Wnt

L'activation de la voie canonique Wnt est un événement clé précoce dans la plupart des cancers colorectaux sporadiques et familiaux [Fodde and Brabletz 2007]. Dans la majorité des cas, ce signal hyperactif se présente, soit par des mutations inactivatrices de l'APC, soit par des mutations de la β -caténine qui la rendent résistante

à la phosphorylation par le GSK3 β et donc à la dégradation [Giles et al. 2003; Huang and He 2008]. Des mécanismes similaires d'activation de la voie β -caténine ont été identifiés dans le développement d'une variété d'autres tumeurs telles que les tumeurs cutanées, mammaires et hématopoïétiques [Fodde and Brabletz 2007; Polakis 2000; Polakis 2007]. Dans des cancers du sein, une expression accrue de la protéine « dishevelled » a été observée suite à une amplification de son gène [Nagahata et al. 2003]. Par ailleurs, dans les cancers mammaires, pulmonaires et gastriques, une surexpression de certains membres de la famille Wnt a été décrite [Howe and Brown 2004; Katoh 2005; Mazieres et al. 2005; Wong et al. 2002].

IV.3.2 Régulation par des micro-ARNs

La découverte des micro-ARNs et de leur fonction a ouvert un tout nouveau champ d'investigation concernant la régulation des gènes. Les mi-ARNs jouent un rôle essentiel dans divers processus biologiques tels que le développement, la différenciation, la prolifération ou l'apoptose [Brennecke et al. 2003; Chen et al. 2004; Reinhart et al. 2000]. En cancérologie, les mi-ARNs ont des fonctions oncogéniques ou, à l'opposé anti-oncogéniques par régulation posttranscriptionnelle de l'expression de divers gènes [He et al. 2005; O'Donnell et al. 2005; Voorhoeve et al. 2006]. Certains d'entre eux sont impliqués dans la régulation de l'expression de protéines de la voie Wnt. Ainsi, le miR-200a cible l'ARNm de la β -caténine. En se fixant directement sur la région 3'UTR (*Untranslated region*) de cet ARNm, il inhibe sa transcription et par voie de conséquence la voie Wnt [Saydam et al. 2009] (Figure 16A). A l'opposé les miR-135a et b qui ciblent le transcrit de l'APC diminuent son expression et induisent une activation de la voie de la β -caténine [Nagel et al. 2008] (Figure 16B).

IV.3.3 Phosphorylation des composants du complexe E-cadhérine/ β -caténine

L'intégrité structurale et fonctionnelle des complexes E-cadhérine/caténines/actine et les interactions entre la β -caténine et ses différents partenaires moléculaires sont régulées en partie par des processus de phosphorylation et de déphosphorylation impliquant respectivement des kinases et des phosphatases. De manière générale, la phosphorylation des résidus tyrosine des composants des complexes E-cadhérine/caténines provoque une fragilisation et une dissociation de ces complexes [Lilien and Balsamo 2005; Steinberg and McNutt 1999]. Des études ont montré que la phosphorylation de la β -caténine par les kinases Src, Abl, Fer et Fyn ou

des récepteurs tyrosine kinase (RTK), tels que le récepteur à l'EGF ou le récepteur à l'HGF (c-met) [Andl and Rustgi 2005; Comoglio et al. 2003], provoque une dissociation du complexe ternaire et augmente le pool cytoplasmique de β -caténine [Huber and Weis 2001; Piedra et al. 2003; Roura et al. 1999]. En outre il a été démontré que ces réactions de phosphorylation pouvaient transformer la β -caténine membranaire en co-facteur de transcription. Ceci est lié à un chevauchement, sur la β -caténine, des sites de liaison de Bcl9 (*B-cell CLL/lymphoma 9 protein*) et de l' α -caténine qui rend leurs interactions compétitives. Or, la phosphorylation par c-met, du résidu tyrosine Y142 de la β -caténine favorise son interaction avec Bcl9 et sa translocation dans le noyau activant ainsi la voie de signalisation Wnt [Brembeck et al. 2004].

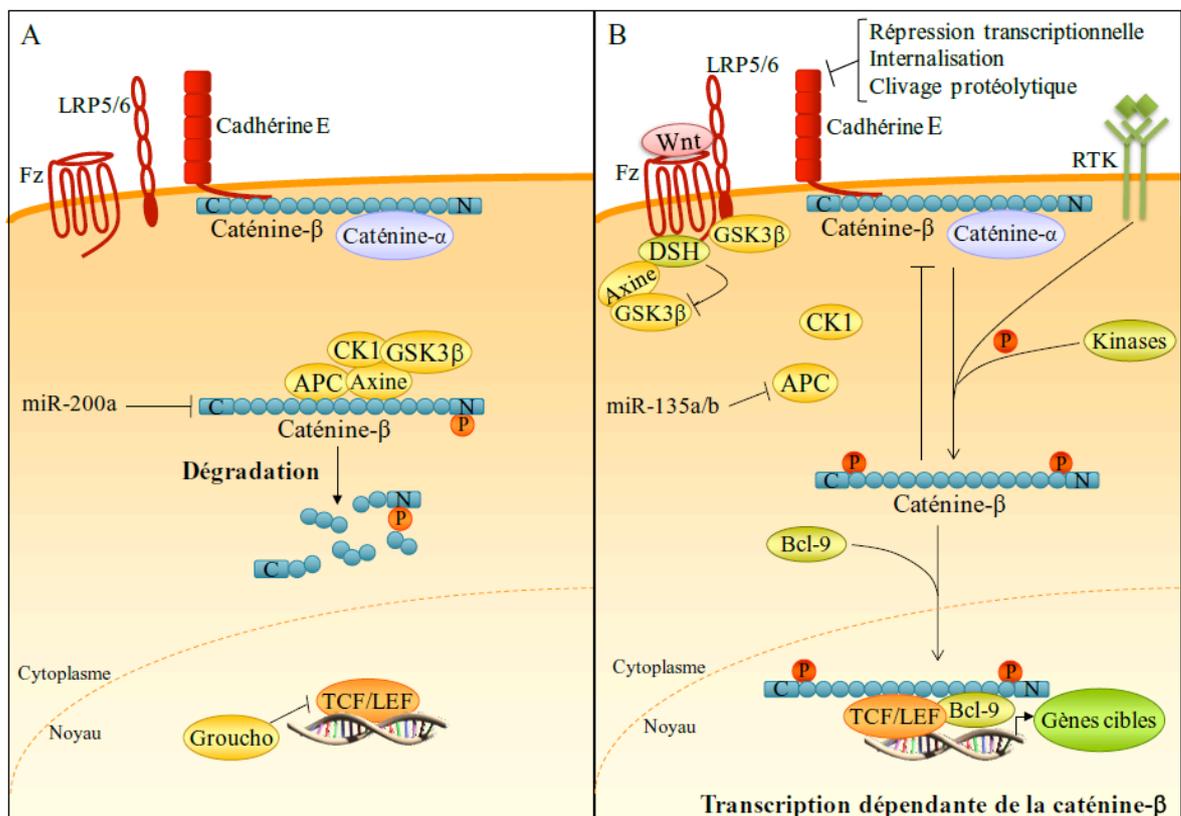


Figure 14: Régulation de la voie de signalisation de la β -caténine. (A) En l'absence de ligands Wnt ou lorsque la E-cadhérine est présente en forte quantité au niveau de la membrane plasmique, la β -caténine est liée à la E-cadhérine et assure l'adhérence cellulaire. Dans le cytoplasme, la β -caténine est phosphorylée et dégradée par le protéasome. Dans le noyau, les complexes Groucho-TCF/LEF répriment des gènes présentant une séquence LBS (LEF-binding site). (B) En présence des ligands Wnt, le complexe de dégradation est dissocié, la β -caténine n'est plus dégradée et peut ainsi s'accumuler dans le cytoplasme. Une accumulation de la β -caténine peut également résulter de sa phosphorylation par des RTK ou des kinases cytoplasmiques, ou d'une absence de la E-cadhérine. La β -caténine gagne alors le noyau et s'associe aux facteurs de transcription de la famille TCF/LEF favorisant ainsi la transcription des gènes cibles.

IV.3.4 Régulation du taux membranaire de la E-cadhérine

Une transactivation de la β -caténine indépendante de la voie Wnt a également été observée. Une diminution de la E-cadhérine entraîne une relocalisation de la β -caténine en dehors de jonctions adhérentes et son accumulation dans le cytoplasme, comme cela est observé par activation de la voie Wnt [Conacci-Sorrell et al. 2003; Lu and Hunter 2004; Orsulic et al. 1999]. Cette perte d'expression de la E-cadhérine engendre une relocalisation de la β -caténine dans le noyau où elle exerce son activité transcriptionnelle [Gottardi et al. 2001; Kuphal and Behrens 2006; Onder et al. 2008] (Figure 14B).

Le gène de la E-cadhérine peut être fonctionnellement inactivé par différents mécanismes pouvant intervenir en combinaison, tels que des altérations génétiques [Bex et al. 1998a; Hirohashi 1998], une inactivation épigénétique [Caldeira et al. 2006] et/ou une répression transcriptionnelle [Comijn et al. 2001; Perez-Moreno et al. 2001]. Ainsi, des mutations au niveau du gène de la E-cadhérine (CDH1), qui compromettent son rôle dans l'adhésion cellulaire sont essentiellement retrouvées dans les cancers gastriques et les cancers du sein lobulaires infiltrants [Bex et al. 1998b; Hirohashi 1998]. Outre ces mutations, l'hyperméthylation du promoteur de la E-cadhérine a été associée à une diminution de son expression dans différents types de cancers [Auerkari 2006]. Bien que ces deux mécanismes aient été largement décrits, le mécanisme le plus fréquent d'inhibition de la E-cadhérine semble être une diminution de sa transcription par certains répresseurs. Ces inhibiteurs, répertoriés sur la figure 15, appartiennent à diverses familles. Ainsi Snail (SNAIL1) et Slug (SNAIL2) appartiennent à la famille Snail ; ZEB1 (δ EF1), ZEB2 (Sip1) à la famille ZEB (*zinc E-box binding factor*). E47 et Twist sont des membres de la famille bHLH (*basic helix-loop-helix*) et HLH fait partie de la famille Id (*inhibitor of DNA binding*) [Peinado et al. 2007]. Tous les membres de la famille Snail possèdent dans leur partie C-terminale un domaine comprenant un nombre variable de motifs en doigt de zinc. Ces motifs sont de type CCHH où C et H représentent les résidus cystéine et histidine constituant la structure en doigt de zinc impliquée dans la fixation à l'ADN [Manzanares et al. 2001]. Snail et Slug agissent en tant qu'inhibiteurs transcriptionnels en se liant à l'ADN sur des séquences 5'-CAGGTG ou 5'-CACCTG connues sous le nom d'E-box. Ils se fixent au promoteur de la E-cadhérine au niveau d'une séquence E-pal contenant deux séquences E-box [Batlle et al. 2000; Bolos et al. 2003; Cano et al. 2000; Come et al. 2004; De Craene et al. 2005; Hajra et al. 2002]. SIP-1 (*Smad Interacting Protein-1*) et δ EF1 (*δ -crystallin Enhancer*

Factor 1) sont caractérisés par la présence de deux domaines en doigt de zinc en région C- et N-terminales [Comijn et al. 2001; Remacle et al. 1999; Verschueren et al. 1999]. Le domaine N-terminal est caractérisé par la présence de quatre motifs en doigt de zinc dont trois sont de type CCHH et un de type CCHC. Le domaine C-terminal est constitué de trois motifs en doigt de zinc de type CCHH [Verschueren et al. 1999]. Comme Snail et Slug, les facteurs de la famille ZEB se lient à l'ADN sur des séquences E-box [Comijn et al. 2001; Verschueren et al. 1999]. La liaison de SIP-1 et de δ EF1 s'effectue également au niveau des deux séquences E-box contenues dans l'élément de régulation E-pal de la cadhérine-E [Comijn et al. 2001; Kouzarides 2007; Remacle et al. 1999; Zhang and Reinberg 2001].

Différentes études ont montré que d'autres facteurs de régulation comme le récepteur à activité tyrosine kinase ErbB2 [D'Souza and Taylor-Papadimitriou 1994], c-Fos [Reichmann et al. 1992], la COX-2 (cyclooxygénase-2) [Tsuji and DuBois 1995], la cytokine pro-inflammatoire IL-6 [Asgeirsson et al. 1998] et le TNF- α [Perry et al. 1999] possèdent une activité de répression de la cadhérine-E dans des cellules tumorales épithéliales.

Le taux membranaire de la E-cadhérine peut également être contrôlé directement au niveau de la protéine par internalisation [Zhu et al. 2001] ou clivage protéolytique du domaine extracellulaire de la E-cadhérine par des métalloprotéinases matricielles (MMPs) [Lochter et al. 1997; Mei et al. 2002; Noe et al. 2001; Zhang et al. 2009] ou des ADAMs (*proteins containing A Disintegrin and A Metalloprotease domain*) [Maretzky et al. 2005; Najy et al. 2008].

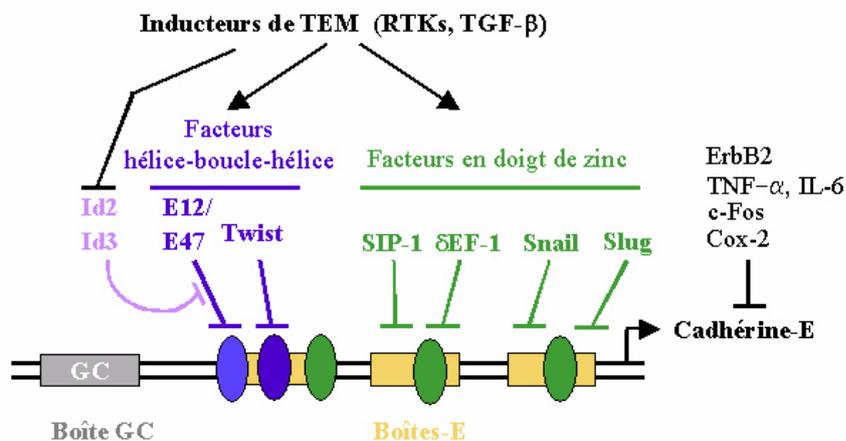


Figure 15: Inhibiteurs de transcription de la E-cadhérine [Hubert et al. 2005].

IV.4 La désorganisation des complexes E-cadhérine/ β -caténine et la voie de signalisation de la β -caténine: implication dans la TEM et dans la progression métastatique

La progression métastatique implique l'acquisition de propriétés invasives par les cellules épithéliales tumorales. L'expression de telles propriétés résulte de modifications intrinsèques importantes. Parmi ces nombreuses modifications, on observe notamment une réorganisation ou une disparition des complexes d'adhérence intercellulaire (jonctions serrées, jonctions adhérentes, desmosomes) et la capacité à dégrader et remodeler la matrice extracellulaire. De tels changements caractérisent un phénomène de dédifférenciation impliquant la perte de caractères typiquement épithéliaux (notamment la perte de cohésion cellulaire) et le gain de propriétés caractéristiques de cellules mésenchymateuses (motilité, expression de protéases rarement synthétisées par des cellules épithéliales en conditions normales,...). Ce phénomène a donc été appelé « transition épithélio-mésenchymateuse » (TEM) [Berk and Van Roy 2001; Bracke et al. 1996; Cavallaro et al. 2002; Christofori and Semb 1999; Jiang and Mansel 2000; Takeichi 1993]. La TEM induite au moment de la carcinogenèse peut être activée, comme lors du développement, par différents facteurs de croissance et signaux dont le facteur de croissance épithéliale (EGF), le facteur de croissance transformant beta (TGF- β) ou encore la voie de signalisation Wnt qui activent des récepteurs tyrosine kinase [Thiery 2002; Thiery and Sleeman 2006]. Cette signalisation contrôle l'expression de Snail et/ou de Slug [Barrallo-Gimeno and Nieto 2005]. Les différentes voies s'entrecroisent en particulier celles induites par le TGF- β , Ras activé, Notch, Hedgehog et/ou la voie Wnt ou de la β -caténine [Barbera et al. 2004; Peinado et al. 2003; Zavadil et al. 2004].

La réorganisation des complexes E-cadhérine/caténines, souvent corrélée à une diminution d'expression de la E-cadhérine, est considérée comme un marqueur précoce de la TEM, intervenant dès les premières phases de dispersion cellulaire. Une diminution de l'expression de la E-cadhérine et une augmentation de la β -caténine nucléaire ont été rapportées dans de nombreux types de cancers ainsi que dans de nombreux systèmes tumoraux *in vitro* et *in vivo* [Brembeck et al. 2006; Schmalhofer et al. 2009]. En effet, la perte de la E-cadhérine, et donc par la suite, une désorganisation des complexes E-cadhérine/caténines, suffit souvent à initier une conversion phénotypique caractéristique d'une TEM qui se manifeste par l'acquisition des propriétés migratoires et/ou invasives des cellules épithéliales [Conacci-Sorrell et al.

2002]. Cependant, une surexpression de la E-cadhérine exerce un rôle de suppresseur de tumeur et diminue l'invasivité des cellules tumorales [Christofori and Semb 1999]. Grâce à ces études, différents gènes cibles de la voie β -caténine ont été découverts. Plusieurs de ces gènes sont impliqués dans la TEM et dans diverses étapes de la progression métastatique. Nous citerons par exemple des protéases telles que des membres des métalloprotéinases matricielles (MMPs) comme la MMP-7 [Brabletz et al. 1999; Crawford et al. 1999], la MT1-MMP [Takahashi et al. 2002], la MMP-26 [Marchenko et al. 2002], et l'ADAM10 [Gavert et al. 2007]; des composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine [Gradl et al. 1999] et la laminine γ 2 [Hlubek et al. 2001; Hlubek et al. 2004]; des protéines du cytosquelette tels que la vimentine [Giles et al. 2003]; des cytokines comme l'IL-8 (Interleukine 8) [Levy et al. 2002] et MCP1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*) [Mestdagt et al. 2006]; des récepteurs d'adhérence cellulaire comme le CD44 [Wielenga et al. 1999] et uPaR (*Urokinase Plasminogene Activator Receptor*) [Mann et al. 1999], ainsi que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) [Easwaran et al. 2003], c-myc [Skvortsova et al.], la claudine 1 [Miwa et al. 2001], la cycline D1 [Shtutman et al. 1999] et le facteur de transcription Slug [Conacci-Sorrell et al. 2003].

De nombreuses études immunohistochimiques menées sur des biopsies de tumeurs ont démontré que la perte d'expression de la E-cadhérine dans les tumeurs est corrélée à l'invasivité tumorale, à la présence de métastases, et à la mortalité des patients [Birchmeier and Behrens 1994; Perl et al. 1998].

V Projet de thèse

L'objet de notre thèse était de poursuivre la caractérisation de FAM110B à partir des seuls éléments d'information que nous possédions, l'interaction de FAM110B avec la β -caténine. Une recherche de partenaires potentiels de FAM110B sera également envisagée car elle pourrait nous orienter vers un rôle physiologique de cette nouvelle protéine. Nous nous attacherons également à rechercher des modifications de phénotypes fonctionnels concernant la survie cellulaire et la motilité engendrés par une modulation d'expression de FAM110B. Nous tenterons d'en élucider les mécanismes moléculaires. Enfin nous aborderons un volet pharmacologique afin de mieux comprendre le rôle de FAM110B dans la régulation de la sensibilité aux médicaments anticancéreux et en particulier de la famille des inhibiteurs des Topoisomérases.

MATERIELS ET METHODES

I Culture cellulaire

I.1 Cellules eucaryotes

I.1.1 Les lignées cellulaires

Nous avons utilisé principalement quatre lignées cellulaires humaines : la lignée HeLa (prélevée d'une métastase sur une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus), la lignée MCF7 (cancer de sein), la lignée HCT-116 (cancer du colon) et la lignée HuH7 (cancer du foie). Elles sont adhérentes en culture et présentent une morphologie de type épithélial.

I.1.2 Conditions de culture

Les lignées cellulaires sont toutes cultivées en monocouche sur boîte de Pétri ou en flasque (Nunc) dans un milieu nutritif liquide de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 4,5 g/L de glucose, de la glutamine et 10 % de sérum fœtal de veau (SVF) préalablement décomplémenté par 30 minutes de chauffage à 56°C. Les cellules sont cultivées à 37°C, en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ en renouvelant périodiquement tous les 2 à 3 jours le milieu de culture. Lorsqu'elles arrivent à un état de subconfluence, les cellules sont systématiquement repiquées. Pour cela, elles sont détachées de leur support par une incubation avec de la trypsine pendant 5 minutes à 37°C. L'action de la trypsine est inhibée par ajout de milieu complet. Un volume de la suspension cellulaire (dépendant de la lignée) est réensemencé sur un nouveau support en présence de milieu frais.

I.1.3 Conservation à long terme et décongélation

Il est nécessaire de réaliser régulièrement des stocks d'ampoules congelées des lignées cellulaires utilisées. Pour cela, les cellules en phase exponentielle de croissance sont décollées de leur support par trypsinisation et reprises par du milieu contenant du SVF. Elles sont centrifugées à 1200 rpm pendant 5 min à 4°C. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 1,5 mL du milieu de congélation (SVF contenant 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO)). Les ampoules sont alors placées dans un congélateur à -80°C pour quelques jours puis transférées dans de l'azote liquide pour une conservation à long terme.

La décongélation de ces ampoules est effectuée à température ambiante et les cellules débarrassées du DMSO sont resuspendues dans du milieu frais avant d'être transférées sur leur support de culture.

I.2 Bactéries

I.2.1 Souches bactériennes

Deux types de souches bactériennes ont essentiellement été utilisés pour l'amplification des différentes constructions plasmidiques. Les plasmides recombinants préparés avec le système « TOPO TA cloning kit » (Invitrogen) ont été produits dans la souche bactérienne TOP 10 du même fournisseur. Cette souche dérive de la souche DH5 α et possède le génotype suivant: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU gal K rpsL (StrR) endA1 nupG. Les autres constructions ont été amplifiées après transformation dans la souche XL1 Blue (Stratagene) dont le génotype est : SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 Δ (lac-proAB) F' {proAB lacIq lacZ Δ M15Tn10 (tetR).

I.2.2 Conditions de culture

La nature du milieu de culture est choisie en fonction du but de l'expérimentation : milieu de culture liquide pour multiplier les bactéries LB Broth (Sigma, 20g/L), milieu de culture solide pour sélectionner les clones bactériens obtenu par l'addition de 2 % de BactoTMAgar (Becton Dickinson) au milieu de culture liquide. Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Les cultures bactériennes sont réalisées à 37°C. Les cultures en milieu liquide sont soumises à une agitation constante d'environ 250 rpm pour assurer une bonne oxygénation des bactéries. Dans ce travail, les agents de sélection utilisés ont été : l'ampicilline (50 μ g/mL) et la carbomycine (50 μ g/mL).

I.3 Levures

Les levures haploïdes des souches AH109 et Y187 sont cultivées soit en milieu liquide YPDA (1X= 20 g/L peptone, 10 g/L Yeast extract, 20 g/L glucose, et 0,2% d'adénine hémisulfate) ou SD (SD base 46 g/L, « dropout » 0,62 g/L, et adénine 100 mg/L) soit sur boîte de Pétri (milieu SD + Agar 20 g/L + dropout 0,62 g/L). Le « dropout » est un mélange d'acides aminés essentiels à la croissance mais ne contient pas ceux qui permettent la sélection des levures après transformation. C'est ainsi que les souches contenant le plasmide pGBT9-DF codant pour le gène d'auxotrophie pour le tryptophane poussent sur un milieu SD sans tryptophane (SD-Trp), alors que les souches contenant le plasmide pGAD-GH codant pour le gène d'auxotrophie pour la leucine poussent sur un milieu SD sans leucine (SD-Leu).

II Biologie cellulaire

II.1 Comptage cellulaire

Les expérimentations de biologie cellulaire se font le plus souvent sur un nombre déterminé de cellules, ce qui nécessite un comptage préalable à l'ensemencement. Pour cela, la suspension de cellules obtenue après détachement par la trypsine et diluée au 1/40 dans du NaCl à 0,9 % et comptée à l'aide d'un compteur de cellules Coulter Counter Z2 (Beckman).

II.2 Extraction des protéines

II.2.1 A partir des lignées cellulaires

II.2.1.1 Lyse cellulaire

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre. Les cellules en phase exponentielle sont lavées avec du PBS, puis trypsinées avant d'être centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes. Après centrifugation, les culots cellulaires sont remis en suspension dans 3 volumes de tampon de lyse FT (KCl 600mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,8, Glycérol 20%) dans lequel est ajouté un mélange standard d'inhibiteurs de protéases (Roche Biomedicals) et dans certains cas d'inhibiteurs de phosphatases (Sigma). La lyse cellulaire est provoquée par un choc thermique comportant trois étapes successives de congélation dans l'azote liquide suivie d'une décongélation à température ambiante. La solution de lyse est centrifugée pendant 15 minutes à 13000 rpm à 4°C et le surnageant contenant les protéines est conservé à -20°C.

II.2.1.2 Extrait nucléaire

Pour chaque extraction, une quantité d'au moins 10^7 cellules est détachée par grattage dans du PBS 1X froid et centrifugée à 1500 rpm pendant 5 min à 4°C. Le culot est remis en suspension dans 5 volumes de tampon hypotonique froid (Hepes 10 mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 1mM) contenant des inhibiteurs de protéases afin d'éviter toute détérioration des protéines. L'incubation des tubes dans la glace pendant 10 min permet le gonflement des cellules et une fragilisation des membranes plasmiques. Après centrifugation à 2000 rpm pendant 10 min à 4°C, le culot est remis en suspension dans 2 volumes de tampon hypotonique froid, puis transféré dans un homogénéisateur de Dounce. Les membranes cytoplasmiques sont cassées mécaniquement par une dizaine d'aller/retour du piston, en vérifiant l'intégrité du noyau au microscope. Une centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min à 4°C permet de récupérer un surnageant qui correspond à la fraction cytoplasmique et un culot de

noyau. Les noyaux sont remis en suspension dans 2 volumes de tampon hypertonique froid (Hepes 20 mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, NaCl 0,5 M, glycérol 25%, EDTA 0,5 M, DTT 1mM) contenant des inhibiteurs de protéases. Après agitation rotative pendant 30 min à 4°C, les tubes sont centrifugés à 13000 rpm pendant 30 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est aliquoté et immédiatement congelés dans l'azote liquide avant d'être transféré à -80°C pour être stocké.

II.2.2 A partir de levures

Les levures sont remises en suspension dans 300 µL de milieu SD sélectif en présence de 100 mg/L d'adénine et diluées dans 50 mL du milieu. La culture se fait sous agitation à 250 rpm dans une étuve à 30°C pendant 12 h. On suit la pousse des levures jusqu'à obtention d'une absorbance à 600 nm comprise entre 0,4 et 0,6. Les levures sont précipitées par centrifugation à 3000 rpm pendant 5 min à 4°C et sont lysées par la méthode urée/SDS. Le culot est remis en suspension dans 300 µL du tampon de lyse préchauffé à 60°C (urée 8 M, SDS 3 M, Tris HCl 1 M, EDTA 0,5 M, inhibiteurs de protéases (pepstatine A 100 mM, leupeptine 105 mM, benzamidine 200 mM, aprotinine 120 mM et PMSF (phenylméthyl-sulfonyl fluoride) 1 mM (ajoutés après chauffage). Des billes de verre sont ajoutées à la suspension (volume à volume) pour permettre, après chauffage de 10 min à 70°C, de dissocier plus facilement les membranes lors de l'agitation des tubes au vortex. Les tubes sont ensuite centrifugés à 14000 rpm pendant 5 min à 4°C et le surnageant est conservé dans un nouveau tube. 100 µL de tampon de lyse frais sont ajoutés aux billes de verre et une deuxième extraction est effectuée dans les mêmes conditions. Les surnageants sont regroupés et la concentration en protéine est évaluée.

II.3 Dosage des protéines

La concentration protéique des extraits cellulaires est évaluée selon une adaptation de la méthode de Lowry utilisant les réactifs DCTM *Protein Assay* (BioRad) comportant une solution alcaline de tartrate de cuivre (solution A) et une solution de réactif de Folin dilué (solution B).

Le dosage est réalisé en plaque de 96 puits contenant pour chaque condition :

- 5 µL de l'extrait protéique dilué au 5^{ème}
- 25 µL de solution A
- 200 µL de solution B

Après 20 minutes d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, l'absorbance du mélange est mesurée à 750 nm dans un spectrophotomètre lecteur de plaque (PowerWaveX, Bio-Tek). La concentration en protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA) de 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 et 1,5 µg réalisée extemporanément.

II.4 Analyse des protéines par Western Blot

II.4.1 Electrophorèse et transfert

De façon générale, 50 µg de protéines provenant de lysat cellulaire ou d'extrait nucléaire, ont été utilisés pour l'analyse par Western Blot. Les protéines sont soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide de 6%, 10% ou 12% selon le poids moléculaire de la protéine à analyser. Deux types de gels sont préparés : 1 gel de « *resolving* » dont la composition est la suivante : (acrylamide/bisacrylamide 10%, Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,05%, TEMED 0,05%) au dessus duquel est coulé un gel de « *stacking* » dont la composition est : (Acrylamide/bisacrylamide 5%, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%, APS 0,05%, TEMED 0,1%). Les échantillons de protéines sont dilués dans du tampon de charge 4X (Tris-HCl 62,5mM pH 6,8, glycérol 25%, SDS 2%, bleu de bromophénol 0,01%, β- mercaptoéthanol 5%), déposés sur le gel de « *stacking* » et soumis à une électrophorèse de 2 h à 80 V dans un tampon de migration (Trizma Base 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3). Cette technique permet la séparation des protéines selon leur poids moléculaire qui est apprécié grâce à la migration en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire correspondant à une gamme de protéines de 10 kDa à 250 kDa (*Precision Plus ProteinTM Standards*, Bio-Rad). Les protéines sont transférées du gel sur une membrane de PolyVinylidene Fluoride (PVDF) dans un le système Iblot® Dry Blotting System (Invitrogen) en 7 minutes selon les recommandations du fournisseur.

II.4.2 Immunodétection

Après transfert, les membranes sont saturées par incubation dans du PBS-T (0,1% Tween dans PBS 1X) contenant 5% de lait pendant 1 heure à température ambiante sous agitation rotative. Elles sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (Tableau I) dans du PBS-T contenant 5% de lait. Après trois lavages dans du PBS-T, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxydase (Amersham) dilués au 1/5000^{ème} dans du PBS-T

contenant 5% de lait pendant 1 heure sous agitation. Après une nouvelle série de lavages dans du PBS-T, les membranes sont recouvertes d'une solution contenant le substrat de la peroxydase (luminol) et un peroxyde (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore). La transformation enzymatique du substrat conduit à l'émission de lumière qui est révélée à l'aide de l'appareil Fusion FX7 (Fisher Bioblock Scientific).

La liste des anticorps utilisés dans ce travail est présentée dans le tableau I ci-après.

Tableau I : Liste des anticorps utilisés

Protéine	Poids KDa	Espèce	Clone	Fournisseur	dilution
FAM110B	40	Lapin	Polyclonale	Eurogentec	1/1000
Topo1	100	Lapin	Polyclonale	Santacruz	1/1000
Topo2- α	174	Souris	Monoclonale	Abcam	1/5000
Topo2- β	183	Lapin	Polyclonale	Santacruz	1/1000
14.3.3 ϵ	30	Souris	Monoclonale	Santacruz	1/1000
β -caténine	92	Lapin	Monoclonale	Santacruz	1/1000
GSK3 β	47	Lapin	Polyclonale	Santacruz	1/1000
GSK3 β S-9	47	Lapin	Polyclonale	Santacruz	1/1000
E-cadhérine	135	Souris	Monoclonale	BD transduction	1/1000
N-cadhérine	130	Souris	Monoclonale	Invitrogen	1/500
Slug	30	Souris	Monoclonale	Santacruz	1/500
Snail	29	Souris	Monoclonale	Santacruz	1/500
Lamine A	69	Lapin	Polyclonale	Santacruz	1/1000
C-myc	67	Souris	Monoclonale	Santacruz	1/500
Actine	43	Lapin	Monoclonale	Sigma	1/5000
GFP	27	Souris	Monoclonale	Sigma	1/5000
V5		Souris	Monoclonale	Invitrogen	1/5000
Flag		Lapin	Monoclonale	Invitrogen	1/5000

II.5 Immunoprécipitation

II.5.1 Principe

Le principe de cette technique repose sur la précipitation sélective d'une protéine d'intérêt grâce à un anticorps spécifique. Le complexe entre la protéine et l'anticorps est rendu insoluble par couplage à un support solide (billes d'agarose) sur lequel a été greffée une protéine G. Ce complexe est alors facilement précipité par centrifugation qui permet d'isoler la protéine d'intérêt avec ses éventuels partenaires.

II.5.2 Méthode

Toute la procédure est réalisée à 4°C pour éviter toute protéolyse. Un volume d'extrait cellulaire correspondant à 700 µg de protéines est dilué dans du tampon FT pour obtenir un volume final de 1 mL. 100 µL de Protéine G-Sépharose sont ajoutés et la solution est agitée par rotation des tubes pendant 3 heures avant d'être centrifugée 1 min à 10000 rpm. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Cette étape de prélavage permet d'éliminer les fixations non spécifiques à la Protéine G-Sépharose. Le surnageant est ensuite incubé avec une nouvelle suspension de 100 µL de Protéine G-Sépharose et l'anticorps dirigé contre la protéine (4 à 8 µg/mL) ou un anticorps contrôle aspécifique ne reconnaissant aucune protéine. Cette incubation se fait toute la nuit à 4°C sous agitation rotative. La solution est centrifugée 1 min à 10000 rpm et le culot est lavé avec 500 µL de tampon FT. Cette étape de lavage est répétée 6 fois. Après les lavages, le culot est remis en suspension dans du tampon de charge de Western Blot contenant du SDS qui permet la dissociation des différents constituants du complexe éventuel, bouilli pendant 5 min et centrifugé brièvement à 8000 rpm pour éliminer les billes d'agarose. Le surnageant est déposé sur un gel de polyacrylamide pour être analysé par immunodétection.

III Biologie moléculaire

III.1 Méthodes d'analyse de l'ADN

III.1.1 Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour analyser et/ou séparer des fragments d'ADN, l'électrophorèse est une technique communément employée. Les gels (à 1% pour la plupart des applications) sont préparés en dissolvant l'agarose dans une solution de tampon TAE 0,5 X (TAE 10X : Tris 0,4 M, EDTA 0,01 M, Acide Acétique glacial 0,2 M) par chauffage au micro-onde. Une solution de BET est ajoutée (1µL de BET à 10 mg/mL pour 50 mL de

gel) pour permettre la visualisation des ADN sous transilluminateur UV (Vilber Lourmat) muni d'une caméra Kodak. Une fois le gel polymérisé, les ADN, dilués dans du tampon de charge 6X (Bleu de BromoPhénol 0,25%, Xylène Cyanol 0.25%, Saccharose 40%) sont déposés dans les puits et soumis à une électrophorèse de 30 min à 50 V dans du tampon TAE 0,5X. La taille des fragments d'ADN étudiés est estimée par comparaison avec un marqueur de taille calibré (marqueur 1 Kb BRL, Invitrogen).

III.1.2 PCR

La réaction de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permet d'amplifier en quelques heures un segment d'ADN en le recopiant des millions de fois. Cette méthode repose sur la répétition du cycle de réactions suivant : (1) dénaturation par chauffage à 90-96°C de l'ADN à amplifier (2) appariement des amorces oligonucléotidiques (3) extension des amorces par une ADN polymérase thermostable (Taq polymérase) de façon à recopier les deux brins de la cible. Théoriquement, après n cycles, le nombre de copies obtenues à partir d'un ADN-matrice est de 2ⁿ.

L'appareil que nous avons utilisé pour la PCR est le thermocycleur Gene AmpPCR System 9700 de Perkin Elmer. La quantité de matrice de départ utilisée est fonction du type d'ADN à amplifier : en général, on utilise 2 µL de la réaction de transcription inverse (réalisée dans un volume final de 20 µL) ou un volume correspondant à 10-50 ng d'ADN si l'on part d'ADN génomique. La Taq polymérase que nous avons utilisée le plus fréquemment est celle de la société Stratagene: la Pfu TURBO possédant une activité de relecture et donc une très haute fidélité. Les réactions de PCR ont été réalisées en présence de 1 mM de chacun des quatre déoxynucléotides (dNTP) et de 0,2 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µL. Les séquences d'amorces utilisées sont les suivantes :

FAM110B sens : 5' GCTCAAAGTGTTTCGGCAACCACGCCA 3'

FAM110B anti-sens : 5' GGCAGAGCTACTGCAGCAGATGGCC 3'

Les conditions de PCR sont :

95°C pendant 4 min

95°C pendant 15 sec

64°C pendant 15 sec

72°C pendant 1min 15 sec

72°C pendant 7 min

} 35 cycles

III.1.3 Séquençage

Le séquençage, comme son nom l'indique, permet de déterminer la séquence nucléotidique d'un brin d'ADN. Il consiste en fait en une succession de réactions d'élongation comme dans une PCR classique : le brin à séquencer sert de matrice à une amorce complémentaire, en présence d'une polymérase thermostable, des 4 désoxynucléotides (dNTP) et de leurs équivalents sous forme didésoxyynucléotides (ddNTP) qui eux, sont couplés chacun à un fluorochrome différent selon le nucléotide. Durant les réactions d'élongation, un dNTP ou un ddNTP correspondant peut être incorporé à chaque position. Si un ddNTP est incorporé, la synthèse du fragment d'ADN prend fin puisque l'absence de groupement OH sur le désoxyribose du ddNTP empêche la formation d'une liaison phosphodiester avec un autre nucléotide. Au terme de la réaction de séquençage, étant donné que la position d'arrêt d'un ddNTP est liée au hasard, on obtient un mélange de produits de synthèse de tailles différentes, marqués par des fluorochromes différents. Ces produits sont analysés à l'aide d'un séquenceur automatique qui fournit un fluorogramme à quatre couleurs correspondant chacune à un type de nucléotide, la succession des pics du fluorogramme permet de déduire la séquence du brin analysé.

La PCR de séquençage est réalisée à l'aide du kit BigDye® Terminator V1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) sur un échantillon d'environ 10 ng dans le cas d'ADN génomique et 200 ng dans le cas d'ADN plasmidique, auquel sont ajoutés 3,5 µL de tampon de séquençage 5X, 1 µL de mélange prêt à l'emploi Big Dye Terminator 2,5 X (comportant les nucléotides et la polymérase), 3,2 pmol d'amorce (sens ou anti-sens) dans un volume final de 20 µL.

Les conditions de la réaction de PCR sont :

95 °C pendant 5 min	} 25 cycles
95°C pendant 30 sec	
50 °C pendant 10 sec	
60 °C pendant 4 min	

Les produits de PCR sont transférés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL où ils sont précipités par l'addition de 2 µL d'acétate de sodium 3M et de 50 µL d'éthanol absolu en présence de 2 µL d'EDTA 125 mM. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, les tubes sont centrifugés pendant 30 minutes à 13000 rpm. Les culots sont ensuite lavés par 250 µL d'éthanol à 70 % (pour éliminer les sels restants) et centrifugés à 13000 rpm pendant 15 min à température ambiante. Les surnageants sont

éliminés, les culots sont séchés et conservés à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur analyse.

III.2 Mutagenèse dirigée

Cette technique repose sur l'amplification d'un vecteur contenant l'insert d'intérêt, à partir de deux primers oligonucléotidiques synthétiques contenant les mutations désirées et complémentaires des deux brins du vecteur. A partir, de ces deux primers, une ADN polymérase thermorésistante de haute fidélité réplique chaque brin du plasmide. Cette opération génère des brins d'ADN circulaires ouverts complémentaires contenant la mutation. Un traitement avec l'endonucléase Dpn 1, spécifique des brins méthylés, permettra la digestion du plasmide parental ne contenant pas la mutation sélectionnant ainsi les brins néosynthétisés contenant la mutation. La transformation des bactéries XL1-Blue permettra la ligation des deux brins du plasmide et son amplification.

La mutagenèse dirigée a été réalisée en utilisant les réactifs du kit QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) dont la *Pfu*Turbo DNA polymérase assure une replication de l'ADN avec une fidélité supérieure à celle de la *Taq* DNA polymérase. Elle nous a permis de construire des mutants de FAM110B concernant les sites d'interactions putatifs de FAM110B avec la protéine 14.3.3 ϵ : les sérines 255 et 261 ainsi que les sérines 301 et 312. La mutagenèse a été effectuée à partir du vecteur pcDNA 3.1 contenant un insert codant pour la protéine FAM110B-V5 et deux amorces contenant les mutations désirées (Tableau II). Les plasmides ont été purifiés et leur séquence vérifiée.

Tableau II: Séquences des amorces utilisées

Nom du primer	Séquences (5'-3')
p40S255&261As	5'CAGCCGAAGACC CGC CCTGCAGCGGTCTAAG GCA GACTTGAGTG
p40S255&261 Aas	5'CACTCAAGTC TGC CTTAGACCGCTGCAGG GCG GGTCTTCGGCTG
p40S301&312 As	5'GGGCTAAT GCT GACATAATATCCCTCAACTTCCGCAGCGC AGC TATGATCA GC
p40S301&312 Aas	5'GCTGATCATA GCT GCGCTGCGCTGCGGAAGTTGAGGGATATTATGTGA CGA TTAGCCC

En encadré les codons sérine mutés en alanine. En rouge, la ou les bases mutées. En vert, la base mutée correspondant à l'ajout d'un site de restriction PstI comme un outil de contrôle de la mutagenèse lors de la digestion enzymatique du plasmide.

III.3 Analyse des ARN messagers

III.3.1 Extraction des ARNms

Les ARNms sont extraits à l'aide du kit RNeasy Mini (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Une quantité appropriée de cellules (environ 1×10^6) est lysée puis homogénéisée par passages répétés (4 à 6 fois) du lysat au travers d'une aiguille. Une fois le lysat homogène, les ARNs sont purifiés sur colonne de silice. Les ARNs élués de la colonne dans 50 μ L d'eau MilliQ stérile exempte de RNase sont congelés à -80°C .

Le dosage des ARN est réalisé à l'aide de l'appareil NanoDropTM (Labtech) par spectrophotométrie à 260 nm. La contamination protéique est estimée par une lecture de l'absorbance (DO) à 280 nm. Pour une bonne qualité des échantillons, le rapport $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ doit être compris entre 1,9 et 2. Un rapport inférieur à 1,9 signifie la présence de contaminants protéiques. S'il est supérieur à 2, il existe une contamination par l'isothiocyanate de guanidine utilisé lors de la préparation. L'intégrité de l'ARN est évaluée dans un bioanalyseur Agilent2100.

III.3.2 Analyse de l'expression des ARNms par puce AffymetrixTM

L'analyse du transcriptome par *microarray* grâce à l'utilisation de puces « GeneChips » Affymetrix (HG-U133 Plus 2.0) permet d'étudier de façon simultanée le niveau d'expression de milliers de gènes à partir d'un même échantillon. Ces puces sont des supports solides sur lesquels, par un procédé de photolithographie, ont été fixées des sondes ARN à très forte densité. Ces sondes sont complémentaires de gènes cibles. Un schéma d'organisation de ces puces est présenté dans la figure 16.

L'hybridation des puces ainsi que leur analyse ont été réalisées par la société Beckman Coulter Genomics à partir de nos préparations d'ARN totaux purifiés. La méthodologie comporte plusieurs étapes dont la première est la préparation des cibles ARNc biotinylés selon le protocole standard Enzo BioarrayTM (Enzo Life Sciences). Cette transformation est réalisée en deux étapes. La première étape de transcription réverse, permet de transformer les ARN totaux en ADNc, elle repose sur l'utilisation du kit BioarrayTM Single-Round RNA Amplification and Labeling (Enzo Life Sciences). L'ADNc obtenu est purifié (cDNA Purification Kit ; Enzo Life Sciences) puis transcrit en de multiples copies d'ARNc biotinylé (BioarrayTM High YieldTM RNA Transcript Labeling Kit, Enzo Life Sciences). Les ARN biotinylés sont hybridés aux sondes de la puce. La puce est lavée et révélée dans une station de lavage Affymetrix GeneChip

Fluidics Station puis elle est scannée dans un lecteur de fluorescence (Affymetrix GeneChip®Scanner3000). Les analyses d'images sont réalisées pour chaque sonde en utilisant le logiciel Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS). La fluorescence détectée est directement proportionnelle au niveau d'expression du gène. Les données obtenues sont normalisées par rapport à des témoins internes pour limiter les variations entre les différentes puces.

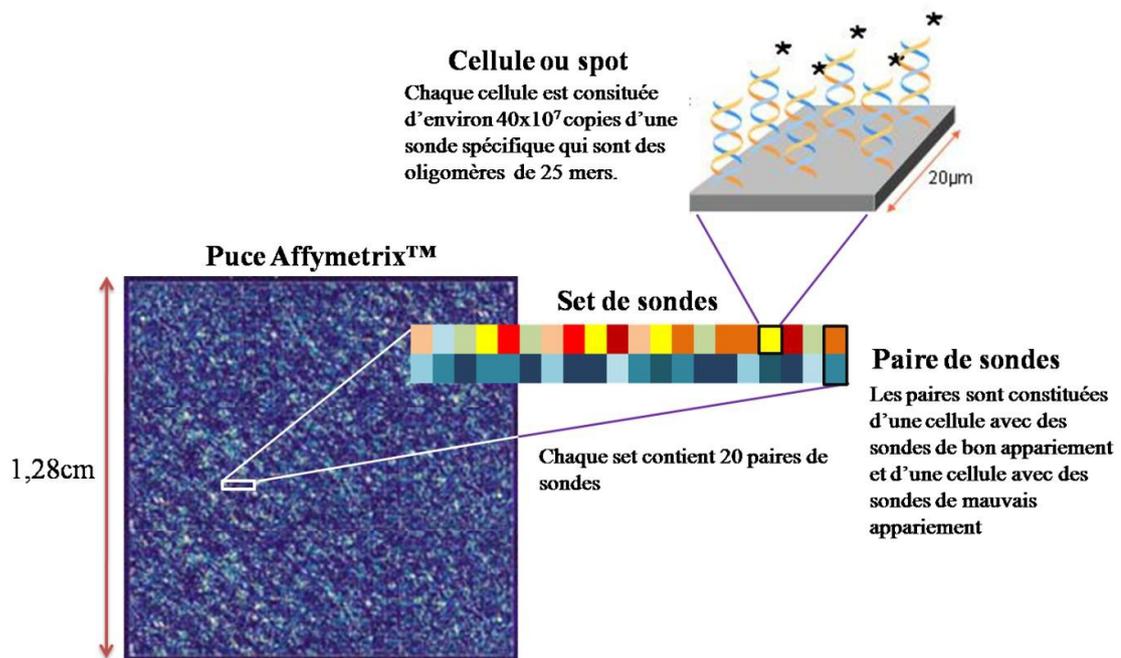


Figure 16 : Schéma d'organisation d'une puce Affymetrix

III.5 Transformation bactérienne

III.5.1 Les vecteurs utilisés

Les principaux plasmides utilisés dans nos travaux sont:

- *pcDNA3.1/V5-His-TOPO®* et *pcDNA3.1/Flag* (Figure 17). Ces deux plasmides sont commercialisés par Invitrogen. Ils permettent l'insertion, en une seule étape grâce au système TOPO TA®, d'un fragment d'ADNc d'intérêt dont la séquence se retrouve couplée du côté 3' avec une séquence codant pour l'épitope V5 (Gly - Lys - Pro - Ile - Pro - Asn - Pro - Leu - Leu - Gly - Leu - Asp - Ser - Thr) suivie de 6 histidines ou codant pour l'épitope Flag (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys). L'expression de la protéine recombinante dans les cellules de mammifères est sous contrôle du promoteur CMV. Des anticorps monoclonaux dirigés contre l'épitope V5 ou Flag

permettent d'évaluer l'expression de la protéine marquée. Ces plasmides portent les marqueurs de résistance à la néomycine et à l'ampicilline ainsi qu'une origine de réplication bactérienne.

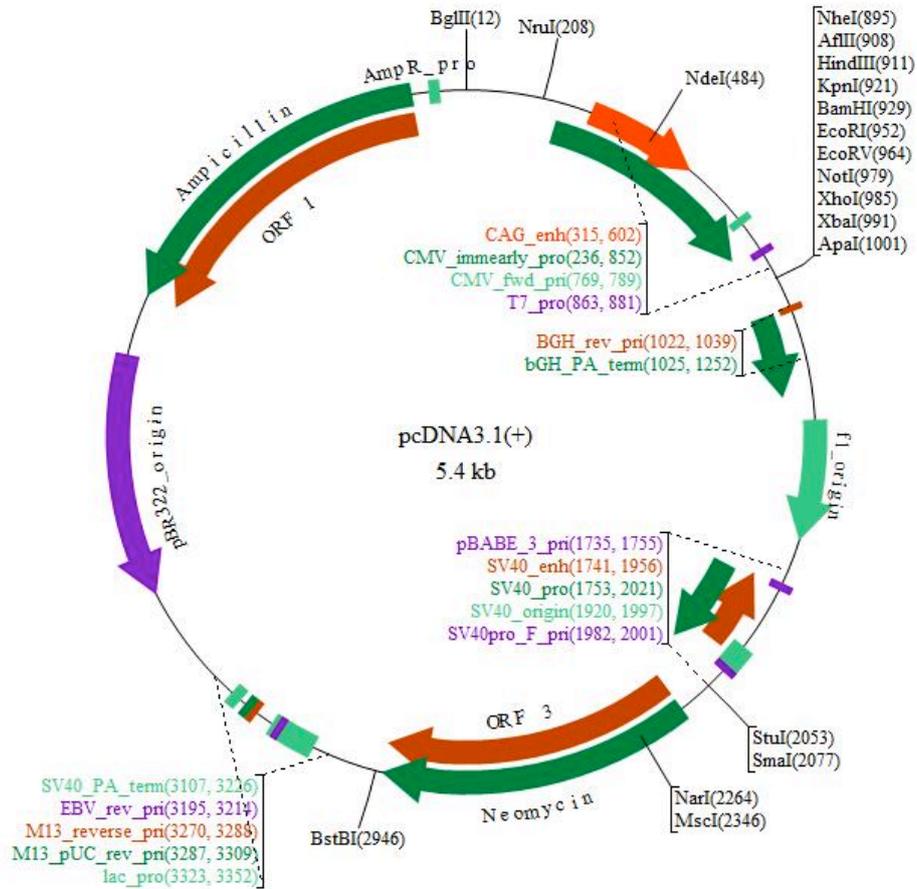


Figure 17: Structure du plasmide pcDNA3.1

- *pLKO1* (Figure 18). Ce vecteur rétroviral est commercialisé par Open Biosystems. Il permet la transfection transitoire ou stable de shRNAs et la production des particules lentivirales dans des cellules d'emballage (HEK293T). Le marqueur utilisé pour isoler les clones stables est la puromycine.

- *pGBT9* et *pGADGH* (Figure 19). Ces plasmides sont commercialisés par la société Clontech. Ils sont adaptés à *Saccharomyces cerevisiae*. Ils sont considérés comme des vecteurs navettes, d'ailleurs ils portent une origine de réplication bactérienne et un marqueur de sélection procaryotes (gène de résistance à l'ampicilline). Ces vecteurs possèdent un marqueur de sélection levure (LEU2 pour *pGADGH* ou TRP1 pour *pGBT9*) permettant de compléter des cellules auxotrophes pour la

Leucine ou le Tryptophane. Ces vecteurs permettent l'expression constitutive modérée à partir du promoteur ADH1 pour pGBT9 ou au domaine transactivateur de GAL4 pour pGADGH.

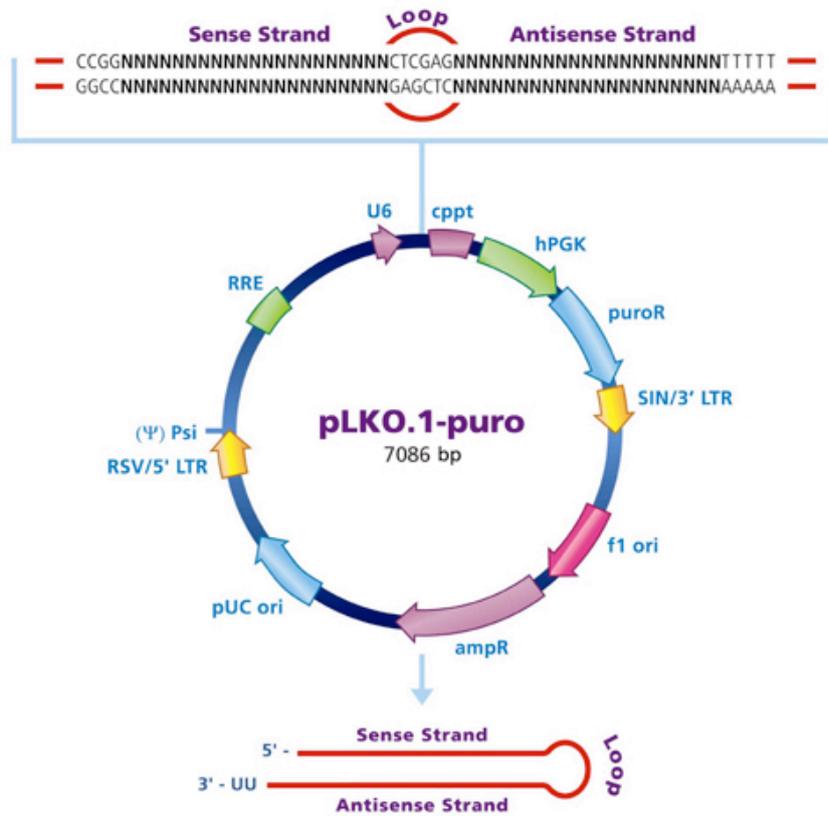
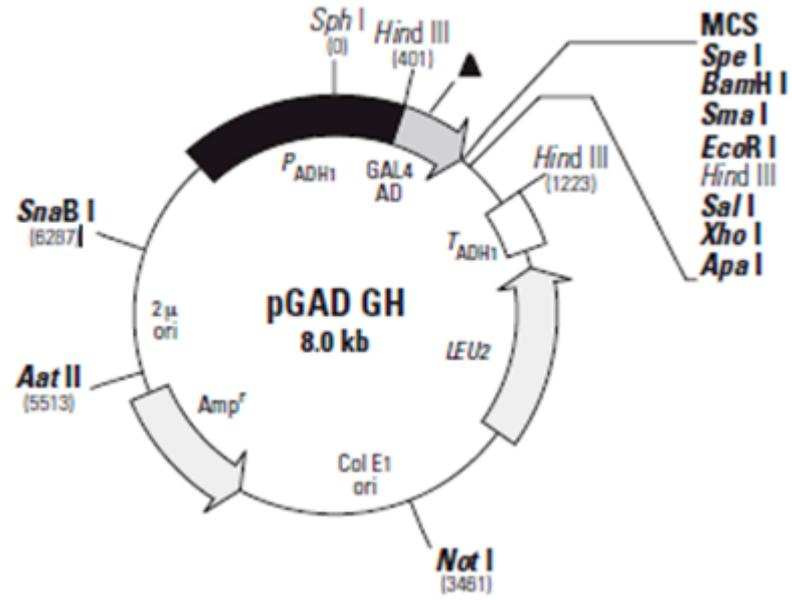


Figure 18: Structure du plasmide pLKO-1

A



B

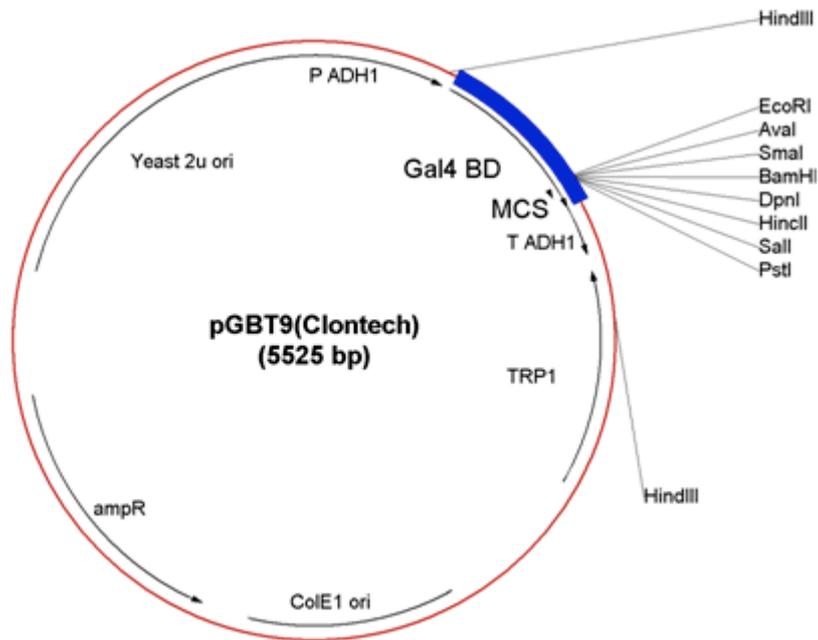


Figure 19: Cartes plasmidiques de pGADGH et de pGBT9 .(A) pGADGH, (B) pGBT9

III.5.2 La transformation bactérienne

La transformation bactérienne est l'opération consistant à introduire un plasmide (doté d'un agent de sélection) dans des bactéries compétentes dont la membrane a été fragilisée.

Les bactéries compétentes, conservées à -80°C sont décongelées lentement, dans la glace à 4°C. 5 à 10 ng d'ADN plasmidique sont ajoutés à la suspension bactérienne et le mélange est incubé dans la glace pendant 30 min. Le tube est ensuite placé à 42°C pendant 45 secondes, puis remis dans la glace pendant 2 min. 250 µL du milieu de culture LB préchauffé à 42°C sont ajoutés à la suspension bactérienne sous hotte stérile. Le tube est placé 1 heure dans l'incubateur à 37°C sous agitation à 250 rpm. Cette pré-culture bactérienne est ensuite étalée sur des boîtes de pétri contenant du milieu LB agar auquel a été ajouté 50 µg/mL d'ampicilline et incubée à 37°C pendant toute la nuit. Le lendemain, les clones émergents sont transférés dans 5 mL de milieu LB liquide avec ampicilline pour être amplifiés.

III.5.3 La transformation de levures

Pour transformer les levures haploïdes AH109 avec le plasmide appât pGBT9-DF-FAM110B, nous avons utilisé la méthode dite 'One-step' [Chien et al. 1991]. Elle consiste à perméabiliser la paroi des levures par traitement chimique pour permettre l'introduction d'ADN étranger accompagné d'ADN entraîneur. Le tampon 'One-step' contient de l'acétate de lithium 0,2 M (LiAc), du polyéthylène glycol (PEG 3350/6000) à 40% et du dithiothréitol (DTT) 100 mM. Un tel traitement affecte la plasticité de la paroi et aboutit à l'apparition de pores améliorant le rendement de la transformation des levures. Quelques colonies de la souche haploïde AH109 sont prélevées sur une boîte de culture et mises en suspension dans 700 µL d'eau stérile et centrifugées 1 min à 1000 g. Après avoir éliminé le surnageant, le culot est remis en suspension dans 50 µL d'eau stérile. 25 µL de la suspension de levure sont mis en présence de 10 µL d'ADN simple brin (10 µg/µL), de 10 µL d'ADN plasmidique et de 100 µL de tampon « One-step » et incubés 30 min à 45°C. Le mélange est vortexé brièvement et son contenu est étalé sur des boîtes de Pétri contenant du milieu SD Agar-Trp auquel on ajoute l'adénine à raison de 100 mg/L. Les levures sont incubées à l'étuve pendant 3 jours à 30°C.

III.5.4 Extraction et purification d'ADN plasmidique à partir de bactéries (Miniprep)

Pour ce type d'extraction, nous avons utilisé le kit de préparation QIAprep[®] Miniprep Kit (Qiagen). La manipulation consiste à lyser les bactéries en conditions alcalines, à précipiter différenciellement l'ADN plasmidique et l'ADN génomique, et à se débarrasser de l'ARN et des protéines. La dernière phase est la purification de l'ADN plasmidique, chargé négativement, sur une mini-colonne de silica-gel, chargée positivement, en présence de fortes concentrations salines. Après une étape de lavage de la mini-colonne pour éliminer les sels, l'ADN plasmidique est élué de la mini-colonne avec de l'eau ultra-pure de pH 7.

En pratique, 10 mL de la culture bactérienne sont centrifugés 1 min à 14000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est soigneusement remis en suspension dans 250 µL du tampon P1 qui contient la RNase. Puis les bactéries sont lysées par ajout de 250 µL de tampon P2 (contenant de la soude). Cette lyse s'accompagne de la précipitation de l'ADN génomique. La suspension est homogénéisée par retournement délicat du tube (4 à 6 fois) et, dans les 5 minutes qui suivent, 350 µL de tampon de neutralisation N3 sont ajoutés. Ce tampon contient de l'hydrochlorure de guanidine permettant la précipitation des protéines. La suspension est à nouveau homogénéisée par retournement délicat du tube (4 à 6 fois), puis le tube est centrifugé 10 minutes à 14000 rpm. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est transféré sur une mini-colonne qui est centrifugée à 14000 rpm durant 1 minute. Le filtrat est éliminé et la colonne est débarrassée de l'excès de sel par ajout de 750 µL de tampon éthanolique (PE). Après une première centrifugation de 2 min à 13000 rpm, la colonne est recentrifugée dans les mêmes conditions pour éliminer toute trace d'éthanol. L'ADN plasmidique est enfin élué dans 50 µL d'eau distillée.

III.5.5 Extraction d'ADN plasmidique à partir de levures

Chaque clone positif est cultivé dans 3 mL de milieu SD-Trp-Leu sous agitation à 250 rpm pendant 12 h. La culture est centrifugée à 3000 rpm pendant 5 min et le culot est repris dans 100 µL de tampon STET (sucrose 8%, Tris 50 mM pH 8, EDTA 50 mM et triton X-100 5%). La solution est transférée dans des tubes Eppendorf contenant des billes de verre (volume à volume). Les tubes sont vortexés pendant 12 min et on rajoute 100 µL de tampon STET. Les lysats totaux sont bouillis pendant 3 min et placés brièvement dans la glace avant centrifugation à 4°C (10 min à 13000 rpm). 100 µL du

surnageant sont transférés dans un tube Eppendorf en présence de 50 µL d'acétate d'ammonium 7,5 M, incubés à -20°C pendant 1h et centrifugés à 4°C (10 min à 13000 rpm). A ce stade, l'ADN chromosomique, les ARNs et les impuretés sont précipités. 100 µL du surnageant sont remis en suspension dans 200 µL d'éthanol absolu (pour précipiter l'ADN plasmidique), centrifugés à 4°C pendant 10 min à 13000 rpm. Le culot est lavé avec 200 µL d'éthanol à 70% et repris dans 25 µL d'eau stérile.

III.6 Transfection et transduction cellulaires transitoires

III.6.1 Transfection de vecteur plasmidique

Cette transfection consiste à introduire à l'intérieur de cellules eucaryotes un ADN plasmidique afin d'y exprimer un transgène. Nous avons utilisé comme agent de transfection l'Exgen 500 (Euromedex). Il s'agit d'une association de polymères d'éthylènimine (PEI) linéaires possédant une très grande densité de charges cationiques permettant un emballage de l'ADN par des liaisons ioniques. Cet agent possède également des propriétés qui lui permettent de tamponner le milieu endosomal inhibant ainsi la dégradation de l'ADN transfecté par le système lysosomal de la cellule transfectée.

Les cellules sontensemencées 24 h avant la transfection de sorte qu'elles soient à environ 50 % de confluence lors de l'ajout de l'ADN plasmidique. L'ADN et l'Exgen 500 sont dilués séparément dans du NaCl à 0,9 %. Selon les quantités de cellules nécessaires à l'expérimentation, les transfections sont réalisées sur différents types de support. Le tableau ci-dessous résume les quantités d'Exgen 500 et d'ADN utilisées en fonction des supports utilisés. Les quantités indiquées sont celles utilisées par boîte ou par puits.

Tableau III: Quantité d'ADN et d'Exgen 500 à utiliser suivant le format de culture des cellules

Support	Quantité d'ADN (µg)	Volume final (µl)	Volume d'ExGen (µl)	Volume final (µl)
Boîte de Pétri (100 cm ²)	5	125	20	125
Plaque 6 puits	2	50	8	50
Plaque 24 puits	1	25	4	25

La préparation d'Exgen est mélangée peu à peu à l'ADN plasmidique sous agitation permanente. Le mélange est incubé 10 min à température ambiante, puis ajouté goutte à goutte au milieu de culture des cellules. 48 h après la transfection les cellules sont récupérées pour être analysées.

III.6.2 Transduction des shRNAs

III.6.2.1 Les shRNAs

Les sh (pour «short hairpin») RNA sont des petits ARNs simple brin qui présentent une structure en épingle à cheveu (tige/boucle) dans laquelle environ 21 nucléotides de la tige sont appariés. La séquence des ces 21 nucléotides (sens et anti-sens) cible un domaine particulier de la séquence d'un gène donné. Dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, la machinerie enzymatique clive la boucle du shRNA qui est alors transformé en un siRNA de 21 nucléotides sous forme double brin. Le siRNAs est pris en charge par le complexe RISC qui sépare les deux brins de l'ARN interférant et le dirige vers l'ARNm cible. La fixation du complexe RISC sur l'ARNm cible engendre la dégradation de celui-ci et inhibe la traduction de la protéine correspondante.

La séquence des shRNAs est insérée dans des plasmides qui peuvent être utilisés, soit directement pour la transfection des cellules eucaryotes, soit pour la transfection de virus qui serviront par la suite à l'infection des cellules. Nous avons choisi cette dernière approche pour inhiber la production de FAM110B dans les cellules HeLa.

III.6.2.2 Les shRNAs anti FAM110B

Les shRNAs dirigés contre FAM110B sont commercialisés par Open Biosystems (Biovalley France). Un lot de cinq constructions plasmidiques contenant chacune un shRNA ciblant différentes régions du gène de FAM110B a été testé. Les séquences respectives de chaque construction sont :

A06 : 5' AAACCGAGGTCTGCCATCGAAAAG 3'

A07: 5' AAACCCAGGGGTGACTTGGAAAAG 3'

A08: 5' AAACCAAGGGCTGCGTAGGAAAAG 3'

A09 : 5' AAACCCCGCGCTGCCTTCGAAAAG 3'

A10 : 5' AAACCCAGGGCTGCCTTGGAAAAG 3'

Après avoir testé les 5 constructions, nous avons retenu la construction A10 car elle est la seule à diminuer le niveau de la protéine FAM110B de manière significative.

III.6.2.3 Préparation des virus

Les vecteurs lentiviraux ont été préparés et titrés à la plateforme génomique INSERM U876 de l'université Bordeaux par le Dr Véronique Guyonnet Dupérat. Dans cette étude, nous avons utilisé des lentivirus issus du génome du virus VIH-1. Ces derniers ne doivent, en aucun cas, permettre de resynthétiser un virus sauvage, c'est pourquoi des séquences ont été délétées en vue d'inactiver cette capacité (SIN : *Self-inactivating*). De même, ils ne doivent pas contenir de gènes codant pour des protéines virales dont l'effet serait toxique pour l'organisme receveur, comme les protéines Nef, Vpu, Vpr. La production des virions est réalisée dans une cellule dite «d'empaquetage» par co-transfection de différents plasmides, (Figure 20).

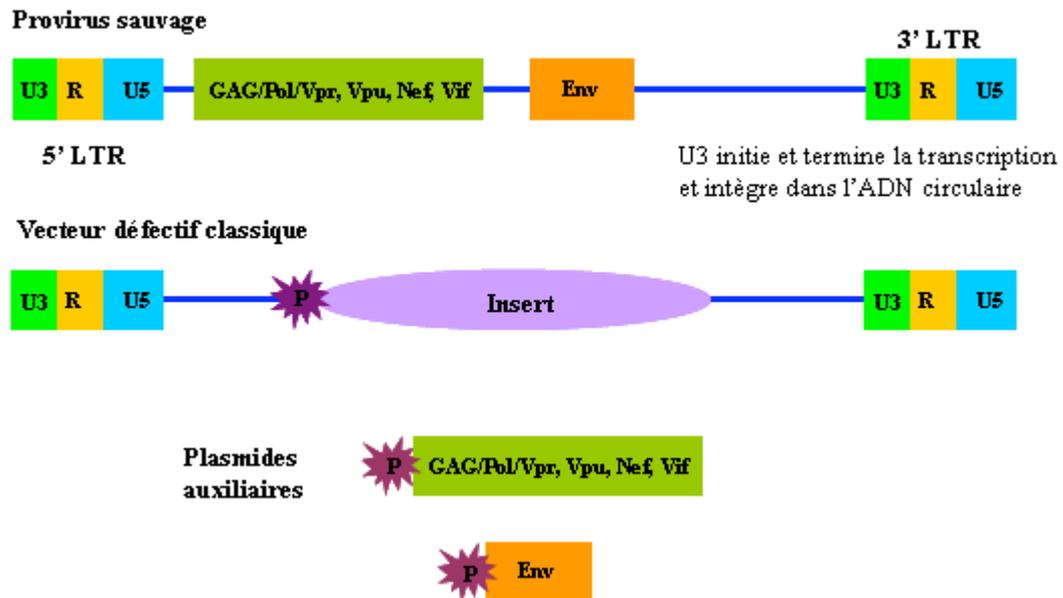


Figure 20: Plasmides transfectés dans la cellule d'empaquetage

III.6.2.4 Transduction des cellules eucaryotes

La transduction des cellules est réalisée avec un MOI « *multiplicity of infection* » égale à 10 qui signifie que le nombre de particules virales par cellule est de 10. Les cellules sontensemencées 24 h avant l'infection par les vecteurs lentiviraux (contenant le shRNA anti-FAM110B ou le vecteur vide pLKO-1) de sorte qu'elles soient à environ 50 % de confluence lors de l'ajout des lentivirus. Ces derniers sont dilués dans du milieu de culture en présence d'agent de transduction, le polybrène (8 µg/mL). Ce dernier est un polymère cationique permettant d'augmenter l'efficacité de la l'infection en neutralisant la charge de répulsion entre les virions et la surface de la cellule. Le

mélange est incubé 5 min à température ambiante puis ajouté aux cellules. Le lendemain, le milieu de transduction est enlevé, les cellules sont lavées par du PBS 1X puis remises en culture dans du milieu frais. 24 h après, les cellules à 80% de confluence sont repiquées à raison de $3 \cdot 10^5$ cellules/puits dans des plaques de 6 puits. Enfin, les cellules sont récupérées pour être analysées au 6^{ème} jour de l'infection, jour correspondant à la répression optimale de FAM110B.

VI Crible du double hybride chez la levure

VI.1 Principe

Le principe du double-hybride repose sur la structure particulière d'un activateur de la transcription de la voie du catabolisme du galactose, Gal4p [Chien et al. 1991; Fields and Song 1989]. Cette protéine comporte deux domaines fonctionnels qui conservent leur activité intrinsèque lorsqu'ils sont physiquement dissociés (Figure 21) : un domaine N-terminal ou domaine de fixation (DF) qui se lie spécifiquement à des séquences activatrices de certains gènes de la voie du catabolisme du galactose, appelées UAS_G (pour *upstream activated sequence for the yeast Gal genes*), et un domaine d'activation de la transcription du gène Gal4 appelé DA situé dans la partie C-terminale de la protéine.



Figure 21: Structure de Gal4p

Dans le système double hybride, ces deux domaines servent à étiqueter respectivement la protéine appât (DF-FAM110B) et les protéines proies de la banque (DA-proie) (Figure 22). La protéine appât et les protéines proies sont exprimées dans des souches de levure haploïdes de type conjuguant complémentaire, Mat α et Mat α . Le croisement des souches haploïdes conduit à la formation de levures diploïdes exprimant l'appât et la proie. S'il existe une interaction entre l'appât et la proie, la reconstitution d'un facteur de transcription actif permet l'activation du gène rapporteur HIS3. Les levures dans lesquelles se déroule cette interaction peuvent alors pousser sur un milieu sans histidine.

En revanche, en l'absence d'interaction, les levures diploïdes ne poussent pas sur ce milieu.

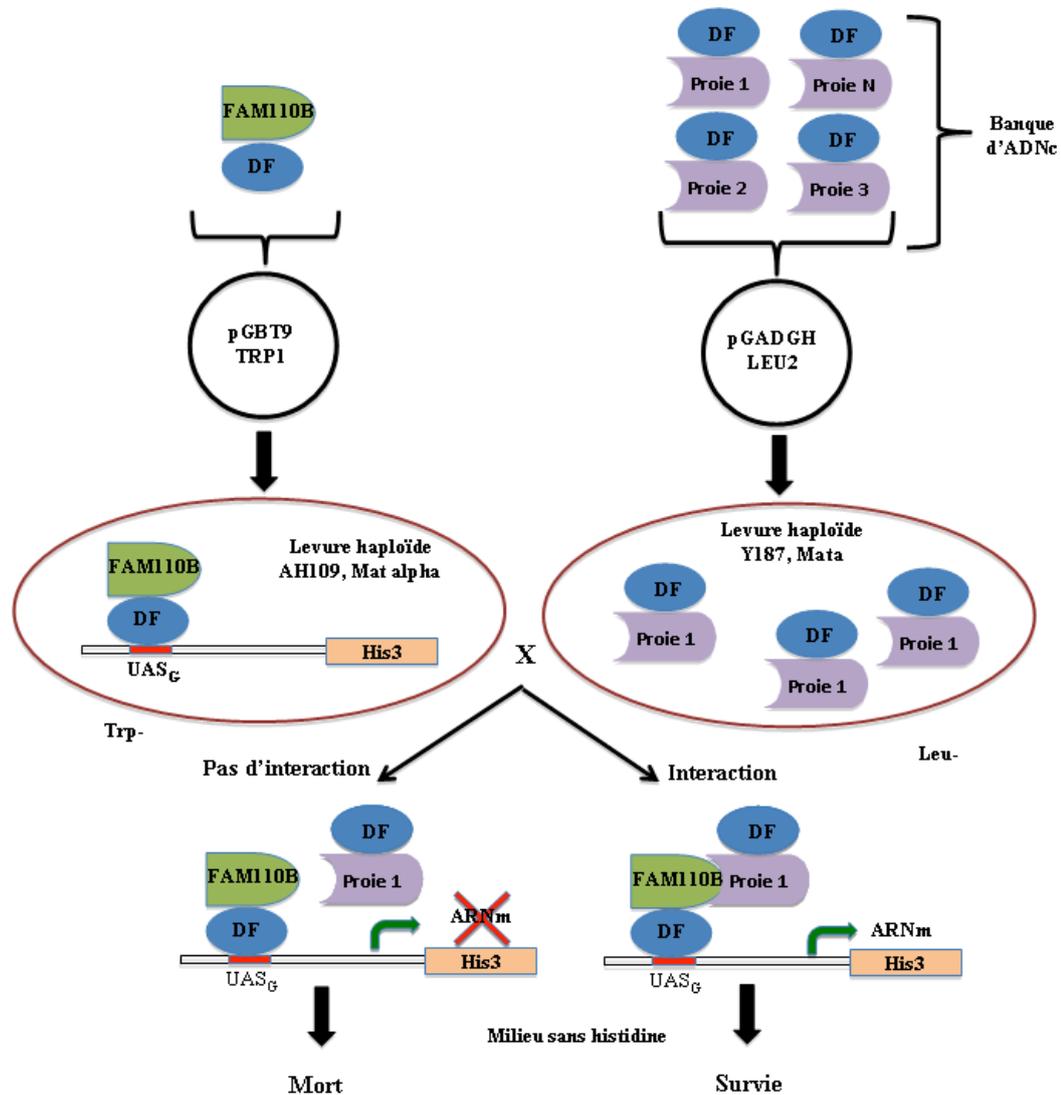


Figure 22: Principe du criblage d'une banque d'expression par la technique du double-hybride chez la levure

VI.2 Construction du gène de fusion

Le plasmide contenant l'appât, nommé plasmide pGBT9/DF-FAM110B, a été construit en fusionnant la protéine FAM110B au domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription Gal4p. Pour cela le fragment d'ADNc de FAM110B a été amplifié par PCR avec des amorces contenant chacune un site pour une enzyme de restriction afin d'effectuer un clonage orienté (amorce sens : DHEcoR1 5'GGAATTCATGCCACGGAGACC3' ; amorce antisens : DHBamH1

5'CGGGATCCCGTTACACATGGGAGACCTTC3'). L'ADN matrice utilisé est un plasmide contenant déjà la séquence de FAM110B étiquetée par V5 (plasmide pcDNA3 FAM110B-V5 His). Les réactions de PCR ont été réalisées en présence de 2 mM de chaque dNTP, 10 μ M de chaque amorce, 4 ng d'ADN matrice, 2,5 unités de Taq Platinum (Invitrogen) dans un volume final de 50 μ L, selon le protocole suivant : dénaturation de 5 min à 95°C, 30 cycles de 95°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 min 30 sec, suivis d'une extension finale de 10 min à 72°C. Une électrophorèse des produits de réaction est effectuée sur un gel d'agarose à 1% en présence de BET. Le fragment de taille attendu est découpé puis extrait du gel et purifié sur colonne GFX (GE Healthcare) selon le protocole indiqué par le fabricant. Le produit de PCR (insert de FAM110B) ainsi que le plasmide pGBT9-DF de Gal4 sont digérés par EcoRI et BamHI. Le plasmide pGBT9-DF est de plus déphosphorylé par incubation de 10 min à 37°C avec une phosphatase (SAP) pour éviter sa re-circularisation au cours de la réaction de ligation. L'insert et le plasmide sont visualisés sur gel d'agarose afin d'estimer la quantité de chacun des produits à utiliser pour la ligation. La ligation a été réalisée à l'aide du kit 'Rapid DNA ligation kit' (Roche). Selon ce protocole la ligation s'effectue avec 6 μ L de FAM110B (EcoRI/BamHI), 1 μ L pGBT9-DF (EcoRI/BamHI), 2 μ L tampon de dilution (5X), 1 μ L H₂O, 10 μ L tampon de ligation T4 (2X), 1 μ L d'ADN ligase T4 dans un volume final de 21 μ L. Le mélange est incubé 5 min à température ambiante et directement utilisé pour transformer des bactéries compétentes afin d'amplifier le produit de ligation.

IV.3 Le croisement des souches haploïdes

Les levures haploïdes AH109 de type Mat α (exprimant l'appât) et Y187 de type Mata (exprimant un plasmide vide ou la proie) sont croisées pour donner des levures diploïdes contenant les deux plasmides. La souche Y187 contenant une banque d'expression humaine d'origine HeLa (banque commerciale de Clontech) est conservée congelée à -80°C. La souche AH109 est mise en culture la veille du croisement dans 50 mL de milieu SD-Trp à 30°C sous agitation à 250 rpm. Le jour du croisement, on suit l'absorbance de la culture à 600 nm jusqu'à une valeur de 1 soit une concentration de 5×10^8 cellules/mL. Une partie de la culture va servir à calculer la viabilité de la souche par étalement sur boîtes de Pétri SD Agar-Trp de dilutions effectuées dans un milieu YPDA 2X en présence de 15 mg/L de kanamycine. Le reste de la culture sert au

croisement. Il est centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min et le culot est remis en suspension dans 5 mL de milieu SD-Trp.

La souche Y187 (1 mL) est décongelée et diluée dans 20 mL de milieu YPDA 2X en présence de kanamycine. La viabilité est mesurée dans les mêmes conditions après étalement des dilutions sur boîtes de Pétri SD Agar-Leu.

Le croisement proprement dit s'effectue par simple mélange des souches haploïdes dans 50 mL de milieu liquide YPDA 1X + kanamycine et incubation à 30°C sous agitation de 40 rpm toute la nuit. Le lendemain, un prélèvement de 100 µL du milieu de croisement est effectué pour calculer le pourcentage d'efficacité de croisement qui doit théoriquement être de 5 à 8%. Pour ce faire, des dilutions successives du milieu de culture sont réalisées dans un milieu YPDA 0,5 X et étalées sur des boîtes de Pétri SD Agar-Trp, SD Agar-Leu et SD Agar-Trp-Leu. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48h. Le reste du milieu de croisement est centrifugé à 1000 g pendant 5 min. Le culot est remis en suspension dans 50 mL de milieu YPDA 0,5 X + kanamycine, centrifugé dans les mêmes conditions, repris dans 10 mL de ce même milieu et étalées sur boîtes de Pétri SD Agar-Trp-Leu-His contenant 3 mM de 3-aminotriazole (3AT). Le 3AT permet d'éviter une « fuite » du gène rapporteur et de minimiser l'émergence de faux positifs. Les boîtes sont incubées 8 jours à 30°C.

IV.4 Le test en gouttes

Ce test permet de valider les résultats de croisement et de réduire au maximum le nombre de faux positifs. Il est connu que même en l'absence des plasmides permettant aux levures diploïdes de survivre sur un milieu sélectif, des clones peuvent émerger sur boîtes de Pétri SD Agar-Trp-Leu-His+3AT en se nourrissant de leurs congénères morts. L'intérêt d'effectuer une sélection par des dilutions successives de la culture (appelé test en gouttes) est donc de réduire le nombre de cadavres et d'éviter aux levures diploïdes pour lesquelles le gène rapporteur n'est pas activé, de survivre grâce à ce « cannibalisme ». En pratique, une fraction de chaque clone est reprise dans 90 µL d'eau stérile. Des dilutions successives au 1/10^{ème}, 1/100^{ème}, et 1/1000^{ème} sont effectuées et des gouttes de 3 µL de chacune de ces dilutions sont déposées sur des boîtes SD Agar-Trp-Leu-His+3AT. Les boîtes sont incubées à l'étuve à 30°C pendant 12 h. Les levures diploïdes sont considérées positives si et seulement si une pousse est observée pour au moins deux dilutions. Nous avons notamment utilisé ce test pour démontrer l'absence d'autoactivation de la protéine appât DF-FAM110B.

V Imagerie cellulaire

Les analyses de localisation cellulaire des différentes protéines d'intérêt ont été réalisées par microscopie confocale permettant de révéler, dans une même cellule, une ou plusieurs protéines grâce à un immunomarquage avec un(des) anticorps couplé(s) à un (des) fluorophore(s).

D'un point de vue méthodologique, les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre disposées au fond des puits d'une plaque 24 puits. Après lavage au PBS, les cellules sont fixées pendant 10 min dans une solution de formaldéhyde à 4%, puis rincées au PBS. Afin de neutraliser les groupements aldéhydes libres, une solution de chlorure d'ammonium (50 mM) est ajoutée aux cellules qui sont incubées à température ambiante pendant 10 min, puis lavées au PBS. Les cellules sont perméabilisées par une solution de Triton X-100 à 0,5% pendant 5 min, avant d'être lavées avec de la gélatine à 0,2% pendant 30 min afin de bloquer les sites de fixation non spécifique, puis rincées au PBS. Pour l'immunodétection, les lamelles de verre sont déposées, dans des chambres humides, sur une solution d'anticorps primaire dilué dans de la gélatine à 0,2 % et incubées durant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les lamelles sont lavées avec de la gélatine à 0,2 % pendant 5 minutes, puis trois fois avec du PBS avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à un fluorophore (Tableau IV) pendant 1 h à température ambiante. La suite des étapes est réalisée à l'abri de la lumière afin de limiter l'excitation du fluorophore. Elle comporte un nouveau lavage à la gélatine suivi de trois lavages au PBS et un marquage des noyaux au Hoechst (Molecular Probes 10 mg/mL) dilué au 1/5000^{ème} pendant 10 min à température ambiante. Enfin, les cellules sont lavées une dernière fois au PBS pendant 5 min.

Tableau IV: Caractéristiques des fluorophores utilisés

Fluorophore	Absorption (nm)	Excitation (nm)	Couleur
Alexa Fluor 488	495	519	Vert
Alexa Fluor 594	590	617	Rouge
Hoechst 33342	402	365	Bleu

Pour l'observation au microscope, les lamelles sont montées sur des lames de verre préalablement nettoyées à l'éthanol à 70%. La lamelle est déposée sur du milieu de montage Fluoromount G (Interchim) préalablement placé sur la lame. Les lames sont séchées pendant 24h avant d'être observées au microscope confocal (LSM 510 Meta, Carl Zeiss). Celui-ci est couplé à un logiciel d'analyse d'images (Metamorph) dont

l'application Multi Wavelength Cell Scoring permet la quantification et l'analyse de la distribution cellulaire des protéines.

VI Cytométrie en flux

VI.1 Principe

La cytométrie en flux est une technique permettant l'analyse individuelle et multiparamétrée de cellules ou d'éléments subcellulaires, à une vitesse variant entre 500 et 5000 objets par seconde. Elle donne des indications sur la taille, la structure interne (granulométrie, rapport nucléo-cytoplasmique...) et la fluorescence d'un système cellulaire. Les résultats obtenus se présentent sous la forme d'histogrammes mono ou biparamétrés, donnant la répartition des cellules en fonction du ou des paramètres étudiés. Elle permet également de trier et de séparer physiquement les sous-populations mises en évidence par l'analyse. Cette analyse se fait donc à partir de suspension de cellules (fixées ou non). La mesure de composants subcellulaires nécessite leur marquage préalable, à l'aide de fluorochromes spécifiques (intercalant), ou par immunomarquage fluorescent (anticorps marqués).

Les cellules sont injectées à travers une buse de 50 à 100 μm de diamètre et défilent une à une devant un faisceau laser. L'interaction entre le faisceau et les particules est à l'origine de signaux lumineux, lesquels sont séparés et sélectionnés par un jeu de miroirs et de filtres, puis collectés par des photodétecteurs (photodiodes et photomultiplicateurs) qui vont les transformer de façon proportionnelle en signaux électriques. L'analyseur multicanaux va permettre le traitement de ces signaux pour obtenir un histogramme de la répartition de la population analysée, en fonction du ou des paramètres étudiés (Figure 23).

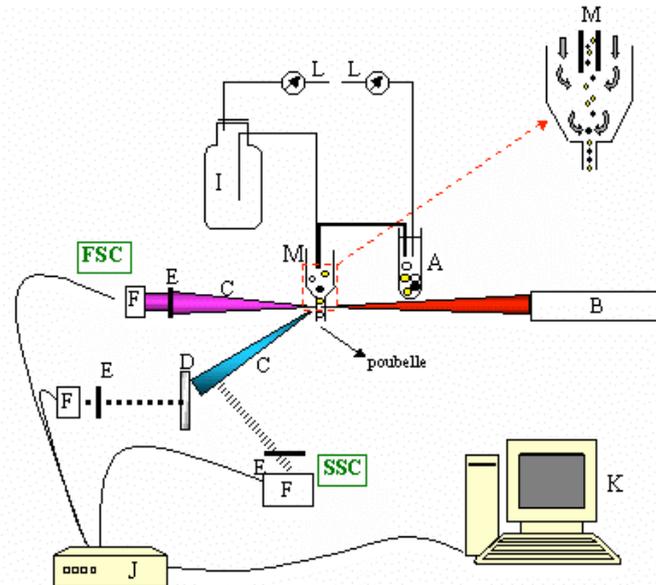


Figure 23: Représentation schématique d'un cytomètre en flux. Les cellules en suspension (A) sont soumises à une surpression (L) qui les fait progresser et s'injecter dans une buse de centrage hydrodynamique (M) au centre d'une veine liquide d'entraînement (I). Les cellules défilent alors, et sont interceptées par le faisceau lumineux d'un laser (B). Elles émettent alors des signaux optiques (C) guidés par des miroirs dichroïques (D) et des filtres (E) vers des photomultiplicateurs (F). Les résultats sont recueillis par un convertisseur analogique digital (J) et une unité informatique (K) et apparaissent sous formes d'histogrammes.

VI.2 Applications de la cytométrie en flux

VI.2.1 Etude de la prolifération cellulaire

Elle est basée sur l'utilisation d'un colorant fluorescent lipophile qui se fixe aux membranes cellulaires, le DiI pour : 1, 1'-dioctadecyl-3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine perchlorate) (Invitrogen). L'excitation du DiI à une longueur d'onde de 549 nm provoque l'émission d'une fluorescence rouge à une longueur d'onde de 565 nm. Lors de la prolifération des cellules, le DiI se répartit équitablement dans les cellules filles, ce qui se traduit par une intensité de fluorescence qui est divisée par deux à chaque division cellulaire.

En pratique, les cellules HeLa en culture sont trypsinisées et centrifugées à 1200 rpm pendant 5 min. Le culot cellulaire est remis en suspension dans une solution de DiI (5 μ M dans du glucose 0,3 M) à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml. Les cellules sont incubées 15 min à 37°C sous agitation douce (200 rpm), puis lavées 3 fois dans du PBS 1X et centrifugées à 1200 rpm pendant 5 min. La fluorescence (DiI) des cellules est évaluée au temps 0 puis aux temps 24 h, 48 h et 72 h après le marquage. L'index de

prolifération est calculé selon la formule suivante : $\text{DiI au temps } 0 / \text{DiI au temps } t$. Plus un index est élevé moins les cellules prolifèrent.

VI.2.2 Etude du cycle cellulaire

L'étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux permet d'identifier les trois phases du cycle cellulaire: la phase (G0/G1), la phase S de synthèse de l'ADN et la mitose G2M. Ces trois phases se différencient par leur quantité d'ADN. Les cellules en G0/G1 contiennent $2n$ chromosomes, les cellules en G2/M contiennent $4n$ chromosomes et les cellules en phase de synthèse possèdent une quantité d'ADN intermédiaire. La cytométrie en flux permet de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle en fonction du traitement appliqué. Elle nécessite l'emploi de fluorochromes spécifiques de l'ADN possédant deux qualités essentielles : une combinaison stoechiométrique avec l'ADN et une bonne émission de fluorescence après liaison à l'ADN. Afin d'étudier le cycle cellulaire, nous avons utilisé l'iodure de propidium comme agent intercalant. Cette molécule se lie aux acides nucléiques (ADN, ARN) indépendamment de leur séquence de bases. Quand il est lié, l'iodure de propidium est excitable à une longueur d'onde de 536 nm et émet une fluorescence à 617 nm.

La veille du marquage, les cellules sont centrifugées, mises en suspension dans une solution d'éthanol à 70% puis incubées à 20°C pendant la nuit. Cette étape sert à perméabiliser les membranes cellulaires afin que le marqueur puisse atteindre l'ADN. Le lendemain, les cellules sont centrifugées, puis lavées dans du PBS 1X et 300 μL d'une solution d'iodure de propidium (Sigma) à 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans du PBS 1X stérile sont ajoutés au culot cellulaire. Les cellules sont incubées à température ambiante pendant 30 min à l'obscurité puis analysées dans un cytomètre en flux (FACSCalibur). Les intensités de fluorescence sont enregistrées pour 10000 événements et analysées avec le logiciel FlowJo.

VII Pharmacologie cellulaire

VII.1 Les médicaments anticancéreux utilisés

Les médicaments anticancéreux utilisés dans notre travail proviennent de source pharmaceutique (solution prête à l'emploi) ou différentes sources commerciales (Tableau V). Dans la majorité des cas, les solutions stock sont conservés à -20°C et les dilutions préparées extemporanément dans de l'eau ou dans du DMSO.

Tableau V : Liste des médicaments anticancéreux utilisés

Médicament	Fournisseur	Concentration stock	Solvant
Taxol	Bristol-Myers	7 mM	Solution
Taxotère	Sanofi-Aventis	12,35 mM	Solution
Vincristine	Hospira France	1 mM	Solution
9-OH-Ellipticine	Santacruz	10 mM	DMSO
Etoposide	Sigma	10 mM	DMSO
Camptothécine	Sigma	10 mM	DMSO
Cisplatine	Mylan	1,2 mM	Solution

VII.2 Test de cytotoxicité : test au MTT

Le test au MTT est utilisé pour évaluer le nombre de cellules viables. Il est basé sur la transformation du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) de couleur jaune en cristaux bleus de formazan de couleur bleue par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés dans du DMSO et l'intensité de la couleur bleue est quantifiée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 530 nm. Afin d'établir les conditions optimales de sensibilité du test, il est nécessaire de déterminer le nombre de cellules à ensemercer et la durée de l'essai pour que les cellules soient en phase exponentielle au moment de la mesure.

En pratique les cellules, en phase exponentielle de croissance, sont ensemençées dans des plaques-96 puits dans un volume de 200 μ L de milieu de culture à raison de 2000 cellules par puits, puis placées dans un incubateur à 37°C pendant 24 h. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par du milieu de culture frais contenant les concentrations appropriées des différents médicaments anticancéreux étudiés. Toutes les dilutions nécessaires sont effectuées extemporanément. Après traitement de 24 heures, les cellules sont lavées au PBS puis incubées 48 h en présence de milieu de culture frais (temps correspondant à 2,5 cycles cellulaires). Puis la solution de MTT (0,5 mg de MTT (Sigma) par mL de milieu de culture complet) est ajoutée à raison de 150 μ L par puits. Les cellules sont incubées 4 h à 37°C puis le milieu remplacé par 200 μ L de DMSO. Après une incubation de 15 min à température ambiante, la plaque est placée dans un spectrophotomètre (Bio-Tek Instruments) pour une mesure de l'absorbance à 570 nm et 630 nm. La cytotoxicité d'un médicament est évaluée par son IC₅₀, c'est-à-dire la concentration de médicament qui entraîne une diminution de 50% de la quantité de

cellules viables, comparée au contrôle (cellules incubées simultanément en absence de médicament).

VII.2.3 Détection des complexes covalents ADN-Topoisomérases dans les cellules

Les complexes covalents ADN-Topoisomérases sont isolés par la technique ICE (*Immuno Complex of Enzyme*). Brièvement, 10^6 cellules traitées ou non traitées avec les inhibiteurs de Topoisomérases sont culotées et immédiatement lysées dans 1 mL de sarkosyl à 1%. Après cassure mécanique des membranes cellulaire (Dounce), les lysats cellulaires sont déposés sur un gradient de CsCl réalisé à partir de quatre solutions de CsCl de densité différente: 1,82, 1,72, 1,50, et 1,45 en utilisant 2 mL de chaque solution. Les tubes sont centrifugés à 165000 g dans un rotor Beckman SW40 pendant 17 h à 20°C. Des fractions successives de 500 μ L sont ensuite collectées à partir du fond des tubes grâce à un collecteur de gradients. Des aliquotes de 100 μ L de chaque fraction sont diluées avec le même volume de tampon 25 mM de phosphate de sodium (pH 6,5). Les fractions 5 à 10 (contenant l'ADN et les protéines fixées de façon covalente sur ce dernier) sont regroupées et déposées sur une membrane d'Immobilon-P (Millipore) à l'aide d'un slot blot vacuum manifold (Hoefler PR 648, Hoefler, San Francisco, CA). La détection des complexes ADN-Topoisomérases est réalisée par immunomarquage à l'aide des anticorps anti Topo1 ou anti Topo2 (α , β).

VIII Phénotypes fonctionnels

VIII.1 Motilité cellulaire

VIII.1.1 Modèle de blessure artificielle

La migration cellulaire est étudiée dans un modèle de blessure artificielle cicatricielle appelé « *scratch test* ». Elle est déterminée par l'aptitude des cellules à refermer une blessure expérimentale de la couche cellulaire *in vitro*. Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence en plaque 6 puits dans du milieu complet, elles sont privées de sérum la nuit précédent le début de l'expérimentation afin de les synchroniser. Le lendemain, une blessure est réalisée dans la couche cellulaire, au centre des puits de culture à l'aide d'une pointe de pipette stérile. Les débris cellulaires sont éliminés par lavage du tapis cellulaire au PBS et les tapis cellulaires, observés au microscope (Nikon Eclipse TS100) muni d'une caméra (Nikon 10/0.25) sont photographiés. Après incubation à 37°C des cellules dans du milieu complet pendant 7 h, les tapis cellulaires sont de nouveau photographiés. Cette opération est répétée après

10 h d'incubation. La migration des cellules est appréciée par l'évaluation leur capacité à coloniser la blessure créée en mesurant sur les photographies la diminution de la largeur de la blessure en fonction du temps d'incubation.

VIII.1.2 Modèle de membrane poreuse

Ce modèle est basé sur la migration des cellules à travers une membrane poreuse caractérisée par des pores de diamètre déterminé. La migration des cellules est évaluée par le nombre de cellules qui, déposées au dessus de la membrane, la traversent et se retrouvent à la face inférieure.

Les cellules privées de sérum toute une nuit sontensemencées dans des inserts de culture cellulaire (BD Falcon TM Cell Culture Inserts, pores de 8 µm de diamètre) placés dans les puits d'une plaque 24 puits (BD Falcon) à raison de 50000 cellules par insert dans un milieu de culture sans sérum. 400 µL de milieu de culture contenant 10 % de SVF sont ajoutés à chaque puits de la plaque de culture et les cellules sont incubées à 37°C pendant 24 h. Le lendemain, les milieux de culture sont aspirés, la face supérieure des inserts est soigneusement nettoyée à l'aide d'un coton tige et les inserts sont rincés (faces supérieure et inférieure) au PBS avant coloration des cellules situées sur la face inférieure de l'insert. La coloration est réalisée en transférant les inserts dans les puits d'une plaque de 24 puits contenant du cristal violet à 0,2% dans de l'éthanol à 10% et incubation à température ambiante pendant 5 min. Les inserts sont abondamment rincés au PBS pour éliminer le colorant non fixé, puis les cellules colorées sont récupérées dans 300 µL de tampon de solubilisation (NaH₂PO₄ 0,1M, pH 4,5/ éthanol 50% (V/V) par incubation à température ambiante durant 30 min. Un volume de 100 µL de chaque puits est transféré dans les puits d'une plaque de 96 puits (UV- Star Plate, Greiner bio one) pour une lecture de l'absorbance à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque.

VIII.2 Modulation de voies signalétiques

Le test utilisé est basé sur la mesure de l'expression d'un élément de régulation transcriptionnelle spécifique d'une voie de signalisation par l'expression d'un gène rapporteur codant pour la luciférase Firefly. Nous avons réalisé ce test pour identifier un potentiel rôle de FAM110B dans la ou les voies les plus impliquées dans les processus de cancérogenèse (Tableau VI).

Tableau VI: Les principales voies explorées par le système « *Signal Finder Cancer 10-Pathway* »

Voies	Gènes rapporteurs
Wnt	TCF/LEF
Notch	RBP-Jk
Domage à l'ADN/P53	P53
TGFβ	SMAD2/3/4
Cycle cellulaire/pRb-E2F	E2F/DP1
NFκB	NFκB
MYC/Max	Myc/Max
Hypoxia	HIF1A

Les cellules HeLa sont cultivées dans des plaques 96 puits blanches à fond blanc pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite co-infectées/transfectées avec soit les lentivirus FAM110B shRNA, soit avec le vecteur vide pLKO1, plus les vecteurs contenus dans le kit Cignal™ Finder Cancer 10-Pathway Reporter Array (SABiosciences™). Ce kit contient dix couples de vecteurs différents comprenant chacun :

- un vecteur qui code pour la luciférase Firefly dont l'expression dépend de l'élément de régulation transcriptionnelle spécifique d'une voie impliquée dans le cancer,
- un vecteur qui code pour la luciférase Renilla dont l'expression est dépendante du promoteur CMV. Au bout de 48 heures, les cellules sont rincées au PBS, puis lysées sous agitation pendant 15 min dans du tampon de lyse (20 µL par puits). La lecture de la luminescence est réalisée dans un luminomètre F500 (Tecan), en utilisant le kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) selon la procédure suivante :

- Injection du réactif de la luciférase Firefly (LARII).
- Mesure de la première valeur de luminescence.
- Injection du second réactif qui stoppe la première réaction et active la luciférase

Renilla (Stop & Glo®).

- Mesure de la deuxième valeur de luminescence.

Les injections et les lectures de luminescence sont faites automatiquement, puits par puits, par le luminomètre.

RESULTATS

I Développement d'outils pour l'étude du rôle biologique de FAM110B

I.1 Mise en évidence de FAM110B

Comme pour toute nouvelle protéine, il est indispensable avant de débiter sa caractérisation fonctionnelle de disposer d'un anticorps permettant de détecter son expression au niveau cellulaire. Au début de notre travail, aucun anticorps commercial n'existait et nous ne disposions que d'un sérum produit chez le lapin qui permettait de révéler la présence de FAM110B dans divers extraits de cellules eucaryotes (notamment les cellules DC-3F de hamster et diverses lignées cellulaires cancéreuses humaines) par Western Blot. Malheureusement, une mauvaise conservation des aliquotes de ce sérum a rendu son utilisation impossible et nous a conduits à relancer auprès de la société Eurogentec une campagne d'immunisation (Double XP) en utilisant deux nouveaux peptides synthétiques, EP085041 et EP085042, comme antigènes. Ces deux peptides correspondent à des régions de FAM110B qui sont extrêmement conservées chez les eucaryotes (Figure 24, encadrés rouges). Nous nous sommes également assuré que ces peptides ont été choisis en dehors des régions d'homologie de FAM110B avec les deux autres protéines de la famille, FAM110A et FAM110C [Hauge et al. 2007] pour que les anticorps générés puissent être spécifiques de FAM110B (Figure 24, encadrés noirs). Le sérum prélevé de deux lapins a été purifié par colonne d'affinité contre les deux peptides, et testé pour ses capacités à reconnaître spécifiquement FAM110B. Pour cela nous avons réalisé un Western Blot avec des extraits totaux de cellules HeLa contrôle et de cellules HeLa transfectées transitoirement avec une construction de FAM110B étiquetée avec la GFP (*Green Fluorescent Protein*), cette dernière possédant une taille d'environ 70 kDa par rapport à la protéine endogène de 40 kDa. La figure 25A montre que dans les cellules transfectées par FAM110B-GFP ces anticorps reconnaissent bien une protéine de poids moléculaire d'environ 70 kDa ainsi que la protéine endogène de 40 kDa, alors qu'ils ne reconnaissent que FAM110B dans les cellules contrôle non transfectées. Parallèlement, ce sérum a été testé sur des extraits de deux autres lignées cancéreuses, la lignée DU145 de cancer de prostate et la lignée U87 de gliome (Figure 25B). Les résultats confirment la détection d'une protéine endogène d'environ 40 kDa correspondant à la taille de FAM110B.

Ces tests préalables nous ont permis de conclure que la spécificité de notre sérum polyclonal de lapin est satisfaisante et qu'il peut être utilisé pour identifier convenablement FAM110B dans nos expérimentations.

```

Hs  MPTELTLQTS  MVKPVSPAGT  FTSAVPLRIL  NKGPDYFRQ  AEPNPKRISA  VERLEADKAK  YVKSQEVINA  KQEPVKPAVL  AKPPVCPAAK  RALG--SPTL  KVFGN---HA  105
Mmu  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  105
Mm  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  105
Rn  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  105
Cl  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  105
Bt  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  105
Cfa  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  108
Gg  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  105
Pp  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  105
Dr  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  105

Hs  KTE---SCVQ  RENLKLKLEIK  NIINSS---E  GSSSSGSGHKH  SSRNWPPhRS  -EATLHRRHS  FAESLKVYP-  TQGRRSPOEG  GSHVGRRLLE  QS-----AE  SPLHVSHSSS  201
Mmu  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  201
Mm  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  200
Rn  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  200
Cl  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  200
Bt  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  210
Cfa  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  201
Gg  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  201
Pp  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  201
Dr  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  215

Hs  DIRKVTSEVKP  LKAIP-CSSS  APPLPPKPKI  ---AAIASM  KSPE-----  -ADPVEPACG  VSRKPSLQRS  KSDLSDRYFR  VDADVERFFN  YCGLDPEELE  NLGMENFARA  299
Mmu  .....  F.....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  299
Mm  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  295
Rn  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  295
Cl  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  295
Bt  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  309
Cfa  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  304
Gg  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  299
Pp  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  299
Dr  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  325

Hs  NSDIISLNFR  SAMSIS  CE  QSQDSNSDLR  ND-LSANIRV  PYGISAIERN  ARIIRWLYSI  RQARESSQKVS  HV  370
Mmu  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  370
Mm  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  366
Rn  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  366
Cl  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  366
Bt  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  380
Cfa  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  375
Gg  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  370
Pp  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  370
Dr  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  .....  397

```

Figure 24: Alignement des séquences de la protéine FAM110B de différents organismes eucaryotes. Les encadrés noirs correspondent aux séquences de FAM110B présentant des similitudes avec les séquences des deux autres protéines de la famille FAM110 : FAM110A et FAM110C. Les deux oligopeptides synthétisés et utilisés pour la campagne d’immunisation sont encadrés en rouge.

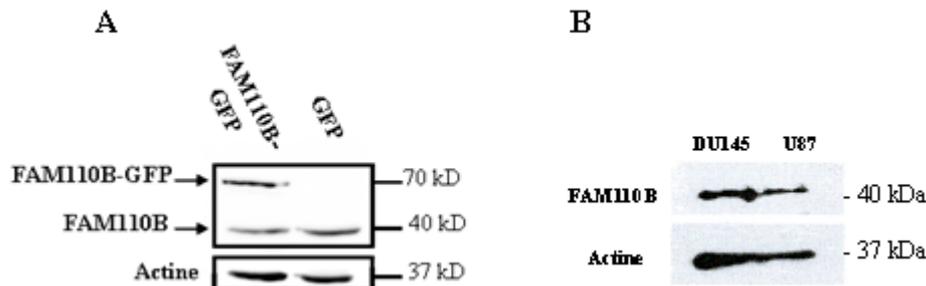


Figure 25: Validation de la spécificité du sérum polyclonal de lapin dirigé contre les deux peptides immunogènes EP085041 et EP085042 de la protéine FAM110B humaine. (A) Dans des lysats totaux de cellules HeLa (50 µg de protéines) contrôle ou transfectées par un vecteur codant FAM110B-GFP. (B) Dans des lysats totaux (50 µg de protéines) de cellules humaines DU145 et U87. L’actine est utilisée comme contrôle de charge.

I.2 Mise au point de modèles de répression de FAM110B

La caractérisation d’une nouvelle protéine nécessite généralement l’utilisation de modèles d’études dans lesquels la modulation de son expression permette de mettre en évidence un phénotype particulier donnant une indication sur son éventuelle fonction biologique. Nous avons déjà comme indication que la surexpression transitoire de

FAM110B (étiquetée par l'épitope V5 à son extrémité C-terminale) ne conférerait aucun phénotype particulier aux cellules HeLa, ce qui nous a orientés vers un modèle de répression de FAM110B. En priorité, nous avons choisi la technique classique d'interférence à l'ARN. Les premières expériences ont été réalisées avec des siRNAs d'origines commerciales différentes (Eurogentec, Qiagen, et Invitrogen) ciblant différentes régions de l'ARNm. Quarante huit heures après transfection, l'expression de FAM110B dans des cellules transfectées par les siRNAs anti-FAM110B était comparée à celle obtenue dans des cellules transfectées par des siRNAs contrôle ne ciblant en théorie aucun gène. La figure 26A montre les résultats obtenus avec le mélange de siRNAs de la société Eurogentec pour trois concentrations de siRNAs utilisées, 100, 200 et 300 nM. On constate bien une forte diminution du niveau d'expression de FAM110B dans les cellules HeLa transfectées par ce mélange par rapport aux cellules transfectées par le siRNA contrôle. Malheureusement, il n'a pas été possible de reproduire ce résultat, malgré un nombre conséquent d'autres tentatives, la commande de nouveaux siRNAs, ou l'essai de siRNA de sources commerciales différentes et l'utilisation de plusieurs agents de transfection différents.

En collaboration avec l'équipe du Dr N. Adashi (Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, Yokohama, Japon) nous avons également tenté d'obtenir une lignée KO pour le gène FAM110B. Cette équipe utilise comme modèle les cellules leucémiques humaines pré-B Nalm-6 dont le ciblage de gène par recombinaison homologue est très efficace [Adachi et al. 2006] ce qui permet d'obtenir en quelques mois une lignée KO pour un grand nombre de gènes. Cette collaboration nous a rapidement permis d'obtenir des lignées Nalm-6 FAM110B +/- dans lesquelles l'élimination d'un allèle de FAM110B entraînait une réduction d'environ 50% du niveau de protéine par rapport aux cellules sauvages (Figure 26B). En revanche, il a été impossible d'isoler des clones Nalm-6 FAM110B -/-, suggérant fortement que cette protéine est essentielle à la survie cellulaire.

Nous nous sommes alors orientés vers une stratégie de répression de FAM110B à l'aide de shRNAs par une stratégie d'infection lentivirale. Cinq séquences de shRNAs anti-FAM110B incluses dans des vecteurs lentiviraux ont été testées dans des cellules HeLa. La diminution d'expression de FAM110B obtenue avec ces shRNAs a été comparée à celle obtenue dans des cellules contrôle infectées par le vecteur vide (pLKO-1). Plusieurs MOI ont été testées et le niveau de FAM110B a été contrôlé à différents temps après l'infection (1, 3, 6, 9, et 12 et 15 jours). Nous avons déterminé

que la répression transitoire de FAM110B était obtenu 6 jours après l'infection avec une MOI de 10, et qu'elle était optimale (soit environ 80%) pour la construction A10, les autres shRNAs n'ayant pas ou beaucoup moins d'effet (Figure 26C). Nous pensions pouvoir utiliser cette construction pour obtenir un clone stable de cellules HeLa n'exprimant pas ou très peu FAM110B, mais cela n'a pas été possible, probablement pour les mêmes raisons qu'il n'a pas été possible d'obtenir de Nalm-6 KO pour ce gène du fait de se son caractère essentiel à la division cellulaire. Dans le reste de notre travail nous avons donc été contraints d'utiliser des infections lentivirales transitoires pour étudier les effets de la répression de FAM110B.

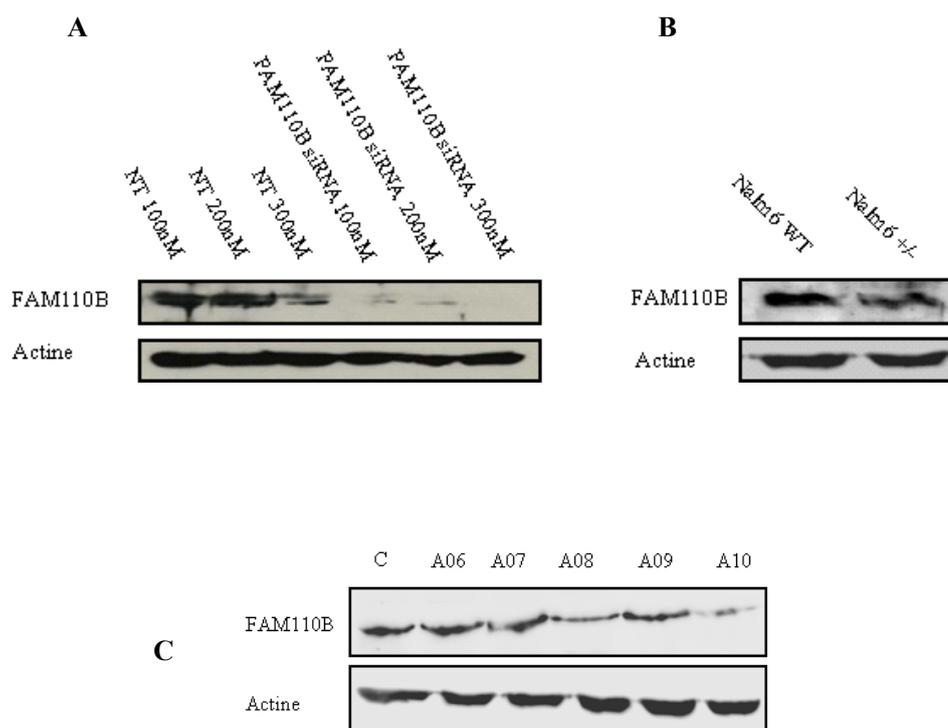


Figure 26: Les différents modèles de répression de FAM110B. (A) Modèle de répression par siRNAs. Les cellules HeLa ont été transfectées par différentes concentrations de siRNAs NT (contrôle) ou siRNAs anti-FAM110B (mélange de 4 siRNAs Eurogentec) pendant 48 h et le niveau de FAM110B endogène mesuré par Western Blot. **(B)** Mesure du niveau d'expression de FAM110B dans la lignée Nalm-6 sauvages (Nalm-6 WT) et la lignée Nalm6 FAM100B +/- . **(C)** Modèle de répression par infection lentivirale de 5 shRNAs anti-FAM110B différents (A06 à A10). L'infection est réalisée avec une MOI de 10. Le niveau de FAM110B est évalué par Western Blot 6 jours après l'infection et comparé au niveau de FAM110B dans les cellules transduites avec le vecteur contrôle. L'actine a été utilisée comme témoin de charge.

De ces résultats, il est très vite apparu que FAM110B était certainement essentielle à la survie des cellules eucaryotes mais que l'utilisation d'un modèle de répression transitoire de son expression permettrait d'avoir accès aux voies métaboliques dans lesquelles elle est impliquée.

II Phénotypes liés à la répression de FAM110B

II.1 Effet de la sousexpression de FAM110B sur la prolifération cellulaire

Nous avons dans un premier temps étudié les conséquences de la diminution de l'expression de FAM110B sur la prolifération des cellules HeLa. Nous avons comparé la prolifération cellulaire des cellules contrôle (transduites par un vecteur lentiviral ne ciblant aucun gène) et celle des cellules HeLa transduites par le vecteur lentiviral A10 ciblant FAM110B en mesurant l'intensité de fluorescence d'un marqueur des membranes cytoplasmiques, le 1, 1'-dioctadécyl-3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine perchlorate (DiI). Cette mesure a été effectuée au moment de l'incorporation du marqueur (temps 0), puis aux temps 24 h, 48 h et 72 h après le marquage pour calculer des index de prolifération cellulaire (voir matériels et méthodes). Les résultats sont présentés sur la figure 27. Le temps 0 correspond au 3^{ème} jour après l'infection. Alors que les cellules contrôle présentent un profil « classique » de doublement de population, les cellules qui sousexpriment FAM110B sont caractérisées, dès le 5^{ème} jour après l'infection, par une diminution nette de la prolifération cellulaire évaluée à environ 2 fois celle des cellules contrôle. L'écart entre les deux lignées s'accroît au 6^{ème} jour après l'infection.

Ces résultats montrent clairement que la réduction du niveau de FAM110B inhibe la croissance des cellules HeLa, le temps de doublement passant de 24 h à plus de 72 h. Ce résultat démontre que FAM110B joue un rôle important dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Cette donnée a été confirmée indépendamment par deux autres études [Hauge et al. 2007; Vainio et al. 2011].

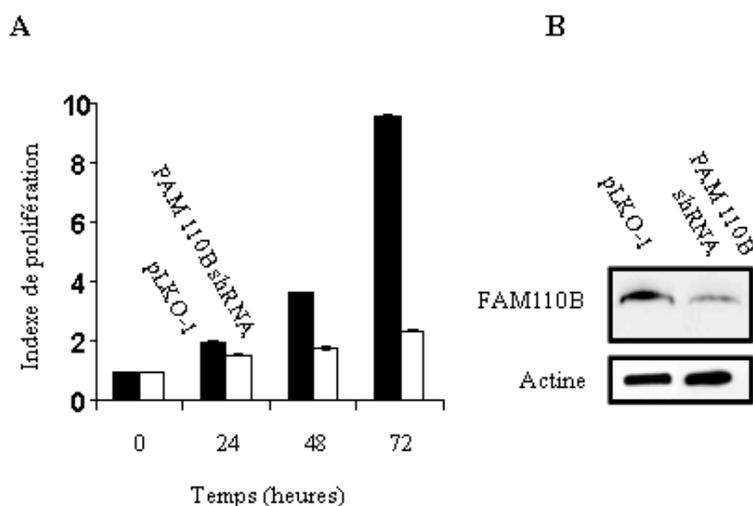


Figure 27: La diminution transitoire de l'expression de FAM110B inhibe la prolifération des cellules HeLa. (A) La cinétique de prolifération de cellules HeLa transfectées par un shRNA anti FAM110B et par le vecteur vide (pLKO-1). (B) Western Blot réalisé le 6^{ème} jour après l'infection à partir de lysats cellulaires des cellules HeLa.

II.2 Effet de la sous-expression de FAM110B sur le cycle cellulaire

En parallèle, nous avons recherché les dysfonctionnements engendrés par cette diminution du niveau de FAM110B au niveau du cycle cellulaire par la technique de cytométrie de flux. La figure 28A compare l'évolution des profils de cycle cellulaire des cellules HeLa contrôle (pLKO-1) et infectées par le vecteur A10 au cours des 7 jours suivants l'infection lentivirale.

Les cellules contrôle ne montrent aucune altération de leur profil avec une répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire qui correspond aux valeurs les plus fréquemment rencontrées, soit environ 70% de cellules en phase G1, 15% en phase S et 13% en phase G2/M (Figure 28A). En revanche, pour les cellules HeLa dans lesquelles FAM110B est réprimée, on observe une augmentation drastique du nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire (environ 60%) qui est accompagnée d'une diminution proportionnelle du pourcentage de cellules en phase G1 (environ 20%) (Figure 28A), le pourcentage de cellules en phase G2/M restant inchangé. Ce blocage en phase S du cycle se produit dès le 2^{ème} jour après l'infection et se traduit *a posteriori* par la mort d'une partie des cellules qui se manifeste par la détection d'un pic en sub-G1, caractéristique de cellules apoptotiques, au bout du 7^{ème} jour. La figure 28B correspond aux profils des cycles des cellules HeLa A10 et contrôle (1 et 2) et à leur superposition, au 6^{ème} jour après l'infection.

Ces résultats confirment donc l'importance de FAM110B dans la prolifération cellulaire et permettent d'expliquer le ralentissement de la croissance par un blocage des cellules en phase S du cycle cellulaire.

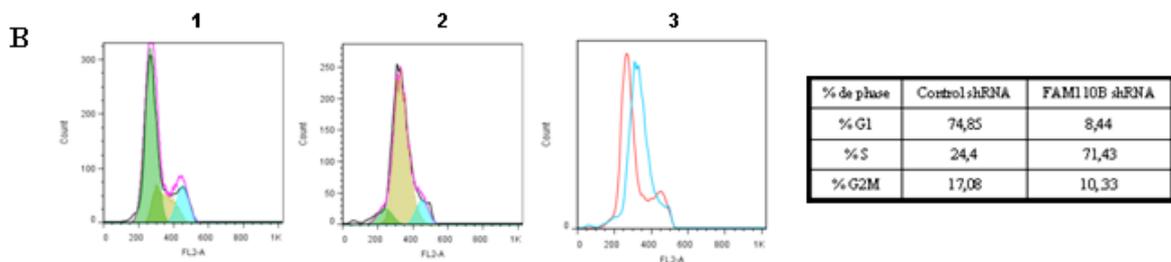
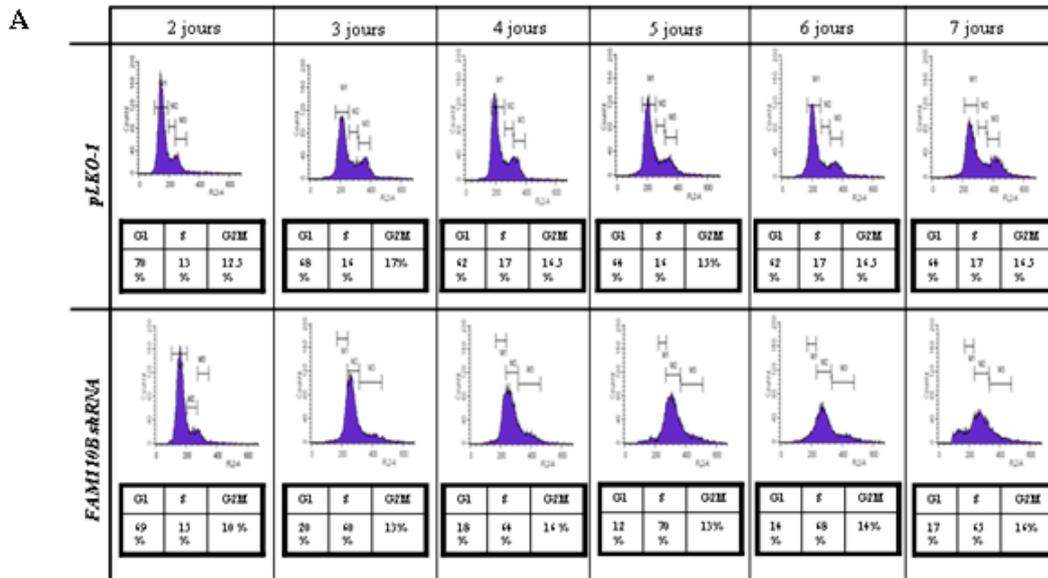


Figure 28: Effet de la répression de FAM110B sur le cycle cellulaire. (A) Profils des cycles cellulaires réalisés quotidiennement du 2^{ème} au 7^{ème} jour après l'infection des cellules par le shRNA A10 et le vecteur vide (pLKO-1). (B) Profils des cycles cellulaires, 6 jours après l'infection, réalisés dans des cellules contrôle (1) et HeLa A10 (2) et superposition des profils des deux lignées. En insert, distribution, dans les deux lignées, des cellules selon les différentes phases du cycle cellulaire.

II.3 Autres phénotypes liés à la sous-expression de FAM110B

L'observation sous microscope des cellules HeLa lors de la mise au point de la répression de FAM110B par les lentivirus, révélait un important changement de morphologie. En effet, comme le montre la figure 29, les cellules HeLa A10 acquièrent une forme effilée ou « *spindle-shape* » qui ressemble à la structure communément décrite pour les cellules mésenchymateuses.



Figure 29: Changement de morphologie des cellules HeLa suite à la sous-expression de FAM110B par le shRNA A10. (A) Morphologie des cellules contrôle infectées par le vecteur vide (pLKO-1) et des cellules infectées par le vecteur A10 6 jours après l'infection. Les clichés sont réalisés au microscope photonique objectif X20 (B) Vérification de la répression de FAM110B dans les cellules HeLa A10 par Western Blot (50 µg de protéines de lysats totaux ont été utilisés). L'actine est utilisée comme témoin de charge.

Ces cellules, à l'opposé des cellules épithéliales, se caractérisent par une grande capacité migratoire et la modulation de l'expression de certains marqueurs moléculaires (E-cadhérine, β -caténine, Slug, Snail, Fibronectine, TGF- β , Vimentine, les MMPs, etc...) qui leur confèrent des propriétés invasives. Cette observation importante nous a permis d'envisager plusieurs hypothèses concernant les voies dans lesquelles FAM110B pouvait jouer un rôle. On pense en premier lieu aux différents processus d'invasion, de migration et d'adhésion cellulaire, souvent inter-dépendants et également au processus complexe de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui revêt un caractère particulièrement important en cancérologie. Nous avons donc abordé ce nouvel aspect de recherche en étudiant l'influence de FAM110B sur la migration cellulaire et recherché le lien entre FAM110B et les facteurs régulant ces voies.

II.3.1 Influence de la répression de FAM110B sur la migration cellulaire

La migration cellulaire a été évaluée par le test de blessure encore appelé « *scratch test* ». Le principe consiste à réaliser une strie au niveau d'un tapis cellulaire et de mesurer au cours du temps la capacité des cellules à « recoloniser » cette blessure. La « cicatrisation » de la blessure est donc proportionnelle à la capacité de migration des cellules. Nous avons donc comparé grâce à ce test les cellules HeLa contrôle et les cellules HeLa sous-exprimant FAM110B. Une semi-quantification de la cicatrisation a été réalisée par mesure de la distance entre les bordures de la blessure aux temps 0, 7 et 10 h. Les résultats sont présentés figure 30.

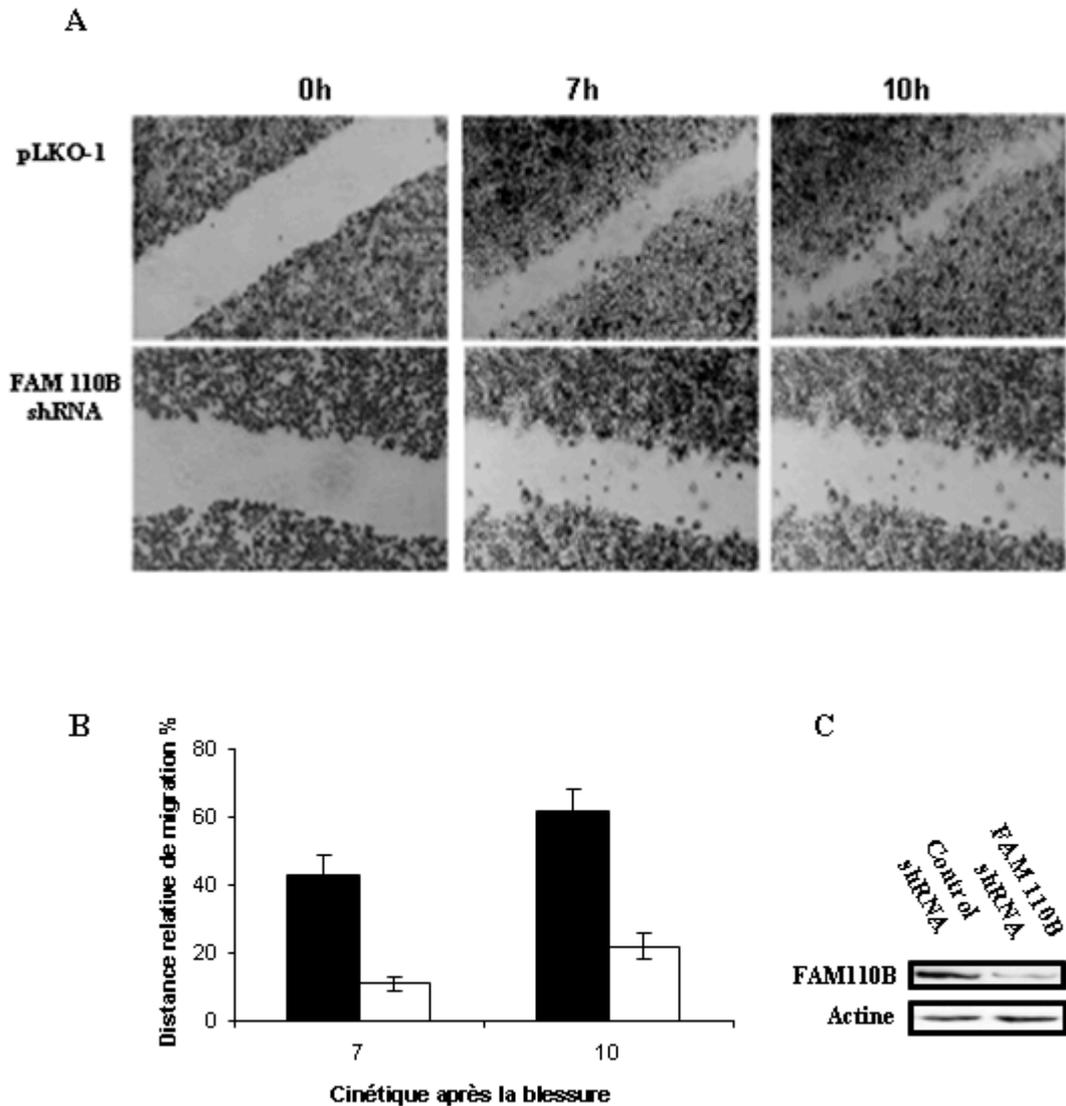


Figure 30: Test de migration «*Scratch test*» de cellules HeLa sousexprimant FAM110B. (A) Comparaison de la cinétique de cicatrisation de blessure entre les cellules contrôle (infectées par le vecteur pLKO-1 vide) et les cellules infectées par le virus exprimant un shRNA anti FAM110B (construction A10). (B) Quantification de la distance relative de migration (distance au temps t /distance au temps 0) exprimée en % (C) Western Blot de vérification de la réduction d'expression de FAM110B dans les cellules transduites par le shRNA anti FAM110B.

Pour les cellules contrôle, la recolonisation est nettement visible dès 7 h après la blessure qui est presque totalement « refermée » au bout de 10 h. En revanche, ce phénomène est clairement inhibé dans les cellules HeLa présentant une réduction de FAM110B, seules quelques cellules étant visibles au niveau de la blessure après 10 h (Figure 30).

Ces résultats ont été confirmés en utilisant une autre méthode d'évaluation de la migration cellulaire à travers une membrane poreuse méthodologie comparable celle de la chambre de *Boyden* (Figure 31A). Les cellules HeLa contrôle et infectées par la

construction A10 (shRNA dirigé contre FAM110B) sont déposées sur une membrane (diamètre des pores 0,8 μM) et les cellules ayant traversées cette membrane sont quantifiées au bout de 24 h. Les résultats confirment que les cellules sousexprimant FAM110B ont perdu leur capacité de migration par rapport aux cellules contrôle avec une quantité de cellules qui ont traversé la membrane poreuse réduite d'environ 3 fois (Figure 31B).

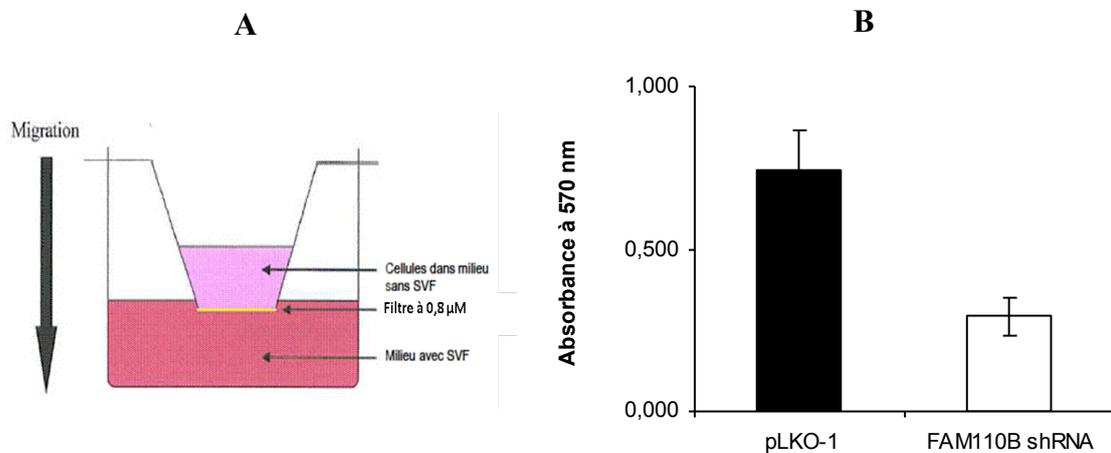


Figure 31 : Test de migration « chambre de Boyden » de cellules HeLa sousexprimant FAM110B. (A) Principe du test de mesure de la migration cellulaire (B) Comparaison de la capacité migratoire des cellules HeLa contrôle (infectées avec le vecteur pLKO-1) et des cellules HeLa infectées avec le vecteur exprimant un shRNA dirigé contre FAM110B. Les cellules ayant traversé la membrane après 24 h d'incubation sont colorées au cristal violet, rincées et après lyse des cellules, l'absorbance est mesurée à 570 nm par lecture au spectrophotomètre. Les résultats représentent la moyenne \pm sd de 2 expériences indépendantes.

II.3.2 Les différentes voies métaboliques dérégulées par la répression de FAM110B : l'approche des puces d'expression ou Microarray

Pour tenter d'avoir une vision plus globale sur les différentes voies dans lesquelles FAM110B peut intervenir, nous avons également étudié l'effet de la répression transitoire de FAM110B sur l'expression des gènes par une analyse de transcriptomique en utilisant la technologie des puces *Affymetrix*. Nous avons comparé le transcriptome des cellules HeLa contrôle infectées avec le vecteur pLKO-1 avec celui des cellules HeLa infectées par le vecteur exprimant la construction A10 du shRNA dirigé contre FAM110B. Deux séries d'extraction d'ARN indépendantes ont été réalisées pour chaque condition à partir de deux infections indépendantes. L'analyse comparative de l'expression des gènes dans les cellules HeLa A10 et les cellules contrôle a mis en évidence une modulation de l'expression de plus 1000 gènes avec un

seuil de significativité important ($p < 0,005$) (voir annexe 1). Parmi ces gènes, un certain nombre sont spécifiquement impliqués dans les processus de migration et d'invasion cellulaire (Tableau VII).

Tableau VII: Les gènes impliqués dans les processus de migration et d'invasion

Gene name/ <i>Protein</i>	Fold change	T	adjusted p-value
CDH1/ <i>E-cadherin</i>	+ 3.5	+ 10.43	0,004327506
CLDN1/ <i>Claudin 1</i>	+ 1.15	+ 9.92	0,004826932
CLDN4/ <i>Claudin 4</i>	+ 1.63	+ 10.51	0,00425145
COL1A1/ <i>Collagen 1 $\alpha 1$</i>	+ 1.26	+ 9.43	0,00543833
COL4A4/ <i>Collagen 4 $\alpha 4$</i>	- 1.013	- 9.26	0,005729999
COL8A1/ <i>Collagen 8 $\alpha 1$</i>	- 1.59	- 13.32	0,002503548
FNBP1/ <i>Fibronectin</i>	+ 2.63	+ 8.67	0,004459886
ITGA4/ <i>Integrin $\alpha 4$</i>	+ 1.37	+ 10.52	0,008506968
MUC1/ <i>Mucin 1</i>	- 1.38	- 8.18	0,007864757
MUC16/ <i>Mucin 16</i>	- 0.94	- 9.42	0,005474829
TWIST2/ <i>Twist 2</i>	- 0.91	- 8.94	0,006372101
MMP2/ <i>Matrix metalloproteinase-2</i>	+ 2	+ 8.33	0,007505833
IL8/ <i>Interleukin 8</i>	+ 2.57	+ 16.11	0,001855614
SERPINE1/ <i>Serpine peptidase inhibitor</i>	+ 2.82	+ 8.11	0,008085579
VEGFC/ <i>Vascular endothelial growth factor</i>	+ 2.45	+ 25.11	0,001609366

Fold change: \log_2 (ARNm HeLa A10/ARNm HeLa pLKO-1) ; T: adjusted-t value

II.3.2.1 Etude de la régulation de l'expression de la E-cadhérine par FAM110B

Les résultats de la figure 32 montrent qu'effectivement, la réduction de FAM110B dans les cellules HeLa est accompagnée d'une augmentation significative du niveau protéique de la E-cadhérine (la lignée HuH7 étant utilisée comme contrôle positif de l'expression de la E-cadhérine). En accord avec les résultats de la littérature qui montrent que les cellules HeLa sont constitutivement déficientes en E-cadhérine en raison de la méthylation de son promoteur, aucune bande n'est révélée avec l'anticorps

anti-E-cadhérine dans les cellules infectées par le plasmide contrôle (Figure 32). De façon intéressante, nous notons également une répression de l'expression de la N-cadhérine dans les cellules HeLa A10 comparées aux cellules contrôle. Ce phénomène a fréquemment été décrit dans la littérature comme phénomène inverse de l'EMT ou « reverse EMT »: passage d'un phénotype mésenchymateux à un phénotype épithélial. Celle-ci se traduit par la perte des capacités migratoires des cellules, ce qui est en accord avec les résultats que nous avons obtenus dans les tests de migration (Figure 30 et 31).

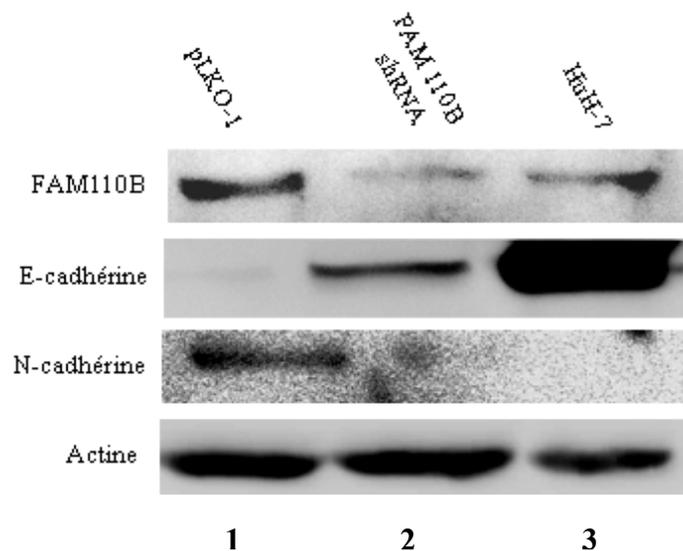


Figure 32: Effet de la réduction du niveau protéique de FAM110B sur l'expression de la E-cadhérine et de la N-cadhérine. Analyse par Western Blot sur 50 µg de lysats totaux des cellules HeLa contrôle infectées par le vecteur pLKO-1 (1), des cellules HeLa infectées par la construction A10 du shRNA anti FAM110B (2). Les cellules de foie HuH7 ont été utilisées comme contrôle positif de l'expression de la E-cadhérine. L'actine est utilisée comme contrôle de charge.

Cette augmentation de la E-cadhérine dans les cellules FAM110B déficientes a été confirmée par microscopie confocale dont les images sont présentées sur la figure 33. Dans les cellules HeLa contrôle, l'absence d'expression de la E-cadhérine se traduit par un signal de fluorescence léger correspondant au bruit de fond (Figure 33A). Dans les cellules où l'expression de FAM110B est diminuée, sans modification des réglages d'acquisition d'image par rapport aux cellules contrôle, on note une forte augmentation du signal de fluorescence, ce qui confirme l'augmentation du niveau d'expression de la E-cadhérine au niveau protéique (Figure 33B).

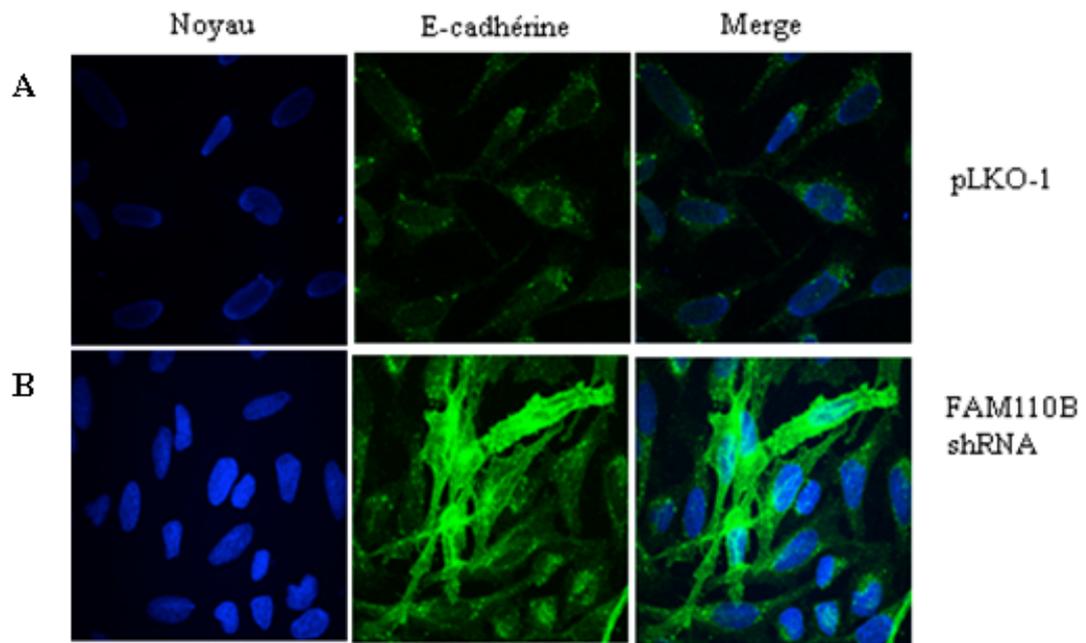


Figure 33: Immunofluorescence de la E-cadhérine réalisée dans des cellules HeLa contrôle (A) ou sousexprimant FAM110B (B). En bleu : noyaux cellulaires colorés au Hoechst. En vert, marquage de la E-cadhérine avec un anticorps anti-E-cadhérine de souris couplé à l’Alexa Fluor 488. Merge : superposition de la révélation des noyaux et de la E-cadhérine.

Comme nous l’avons évoqué dans la partie introductive, la E-cadhérine est finement régulée au niveau transcriptionnel par des mécanismes complexes faisant intervenir plusieurs protéines qui jouent un rôle d’activateur ou de répresseur de sa transcription, en se fixant au niveau de séquences cibles du promoteur du gène. Notre choix s’est porté sur deux répresseurs qui sont les plus largement étudiés dans ce contexte : Snail (SNAI1) et Slug (SNAI2). Nous avons voulu savoir si l’augmentation de l’expression de la E-cadhérine qui est observée en réponse à la diminution d’expression de FAM110B était liée à une diminution de sa répression par SNAIL ou SLUG. L’analyse par Western blot du niveau de ces deux protéines montre une diminution significative du niveau de SLUG dans les cellules où l’expression de FAM110B est diminuée par rapport aux cellules contrôle, alors que le niveau de SNAIL reste inchangé (Figure 34). Ceci démontre que dans les cellules HeLa, l’augmentation de l’expression de la E-cadhérine induite par la diminution transitoire du niveau de FAM110B est liée, au moins en partie, à une inhibition de sa répression par le facteur SLUG.

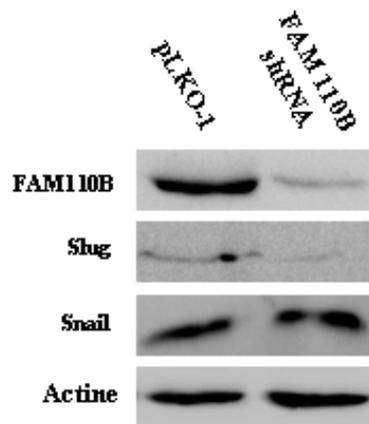


Figure 34: Effet de la réduction transitoire de l'expression de FAM110B sur l'expression des répresseurs transcriptionnels de la E-cadhérine, SLUG et SNAIL. Les Western Blot ont été réalisés avec 50 µg de protéines de lysats totaux. L'actine a été utilisée comme contrôle de charge.

D'une manière intéressante, une étude a montré le rôle de la β -caténine dans la régulation de SLUG et par conséquent de la E-cadhérine (Conacci-Sorrell M, 2003). En effet, dans les cellules qui prolifèrent activement, la β -caténine migre dans le noyau où elle interagit notamment avec le facteur de transcription TCF/LEF. Ce complexe se fixe au niveau du promoteur de SLUG et active sa transcription. Or, notre équipe a préalablement obtenu des résultats montrant une interaction de FAM110B avec la β -caténine. Nous avons donc testé l'hypothèse d'une possible régulation du niveau de la β -caténine par FAM110B qui serait, probablement, engendré par un défaut de sa phosphorylation ou bien un dysfonctionnement du protéasome.

II.3.2.2 Influence de la répression de FAM110B sur la régulation de la β -caténine

Nous avons donc évalué par Western Blot le niveau d'expression de la β -caténine dans les mêmes lysats cellulaires que ceux utilisés précédemment. Les résultats obtenus révèlent une augmentation de la β -caténine dans la lignée où l'expression de FAM110B est diminuée (Figure 35).

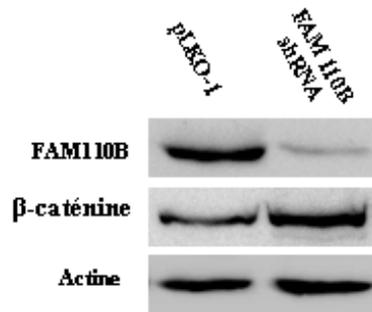


Figure 35: Effet de la diminution transitoire de l'expression de FAM110B sur l'expression de la β -caténine dans des cellules HeLa. Le niveau de β -caténine a été évalué par Western Blot dans des lysats totaux (50 μ g de protéines). L'actine est utilisée comme témoin de charge

Cette surexpression de la β -caténine a été également confirmée par microscopie confocale dont les images sont présentées sur la figure 36A. Dans les cellules contrôle, on remarque que la fluorescence correspondant à la β -caténine est majoritairement membranaire avec un taux d'intensité relativement faible alors que dans les cellules HeLa dans lesquelles l'expression de FAM110B a été transitoirement diminuée, on note une forte augmentation de la fluorescence. Ce résultat a été confirmé indépendamment par d'autres images obtenues par analyse au cytomètre à balayage laser (CompuCysTM), permettant l'analyse quantitative d'un plus grand nombre de cellules de façon automatisée (Figure 36B).

Nous avons ensuite tenté de connaître la raison de cette augmentation d'expression de la β -caténine en testant si cela pouvait être dû à une inhibition de sa dégradation par le protéasome, dégradation qui nécessite au préalable sa phosphorylation par la GSK3- β . Nous avons donc vérifié si une diminution de quantité ou d'activité de la GSK3- β pouvait être à l'origine de l'augmentation de β -caténine que nous observons en réponse à la diminution de FAM110B. Comme le montrent les résultats de Western Blot de la figure 37, la répression de FAM110B entraîne non seulement une diminution de la quantité totale de GSK3- β , mais également une augmentation de sa forme inactive phosphorylée sur la sérine 9, ces deux résultats pouvant contribuer à l'inhibition de la dégradation de la β -caténine.

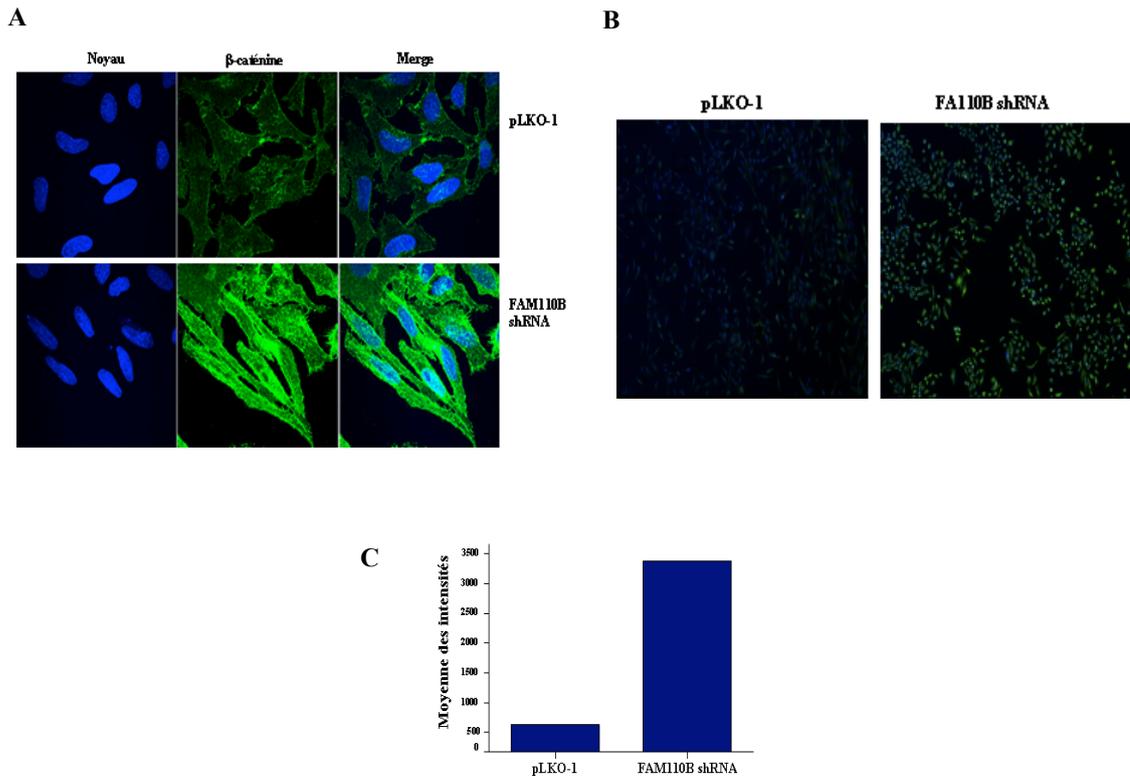


Figure 36: Validation de l'augmentation du niveau d'expression de la β -caténine. Immunofluorescence dirigée contre la β -caténine (vert) réalisée sur des cellules HeLa exprimant ou pas FAM110B analysée par microscopie confocale (A) et dans un cytomètre à balayage laser (B). (C) Diagramme représentant la quantification de l'intensité du marquage de la β -caténine en fonction de l'expression de FAM110B. En bleu : noyaux cellulaires colorés au Hoechst. Merge : superposition de la révélation des noyaux et de la β -caténine.

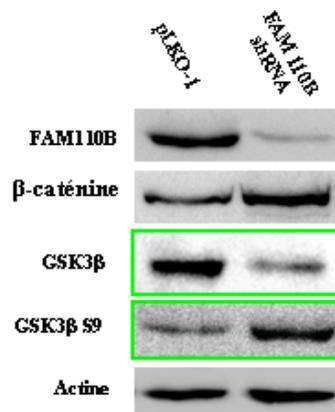


Figure 37: La sousexpression de FAM110B dans les cellules HeLa engendre une diminution de la GSK3- β totale et une augmentation de sa forme inactive. Les Western Blots ont été réalisés avec des lysats totaux (50 μ g de protéine). L'actine a été utilisée comme contrôle de charge.

Classiquement, dans les cellules en voie de prolifération, une augmentation de la β -caténine cytoplasmique par inhibition de sa dégradation se traduit par un transfert de

la protéine dans le noyau où elle exerce son activité transcriptionnelle. Paradoxalement, nous avons observé dans les cellules sousexprimant FAM110B une diminution de l'expression de SLUG et une inhibition de la prolifération cellulaire (Figure 38) indiquant très probablement une dérégulation de l'activité nucléaire de la β -caténine. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons analysé l'expression d'un des gènes cible connu de la β -caténine, le gène c-myc. Les résultats de Western Blot de la figure 38 montrent une diminution de l'expression de c-myc dans les cellules HeLa dans lesquelles l'expression de FAM110B est diminuée, ce qui suggère que l'activité transcriptionnelle de la β -caténine est réduite dans ces cellules.

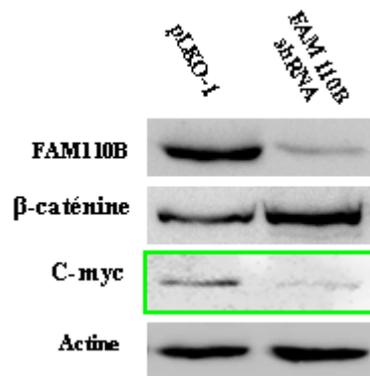


Figure 38: Evaluation de l'expression de c-myc dans les cellules sousexprimant ou non FAM110B. Les Western Blot ont été réalisés avec des lysats totaux (50 μ g de protéine). L'actine a été utilisée comme contrôle de charge.

Nous avons observé précédemment une augmentation globale de la β -caténine en réponse à la diminution transitoire de FAM110B (Figure 35). A priori cette augmentation est contradictoire avec la diminution concomitante de l'expression de SLUG, à moins que cette augmentation ne soit restreinte au niveau du cytoplasme. Nous avons donc mesuré les niveaux de la β -caténine dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules HeLa en réponse à une diminution transitoire de FAM110B par Western Blot (Figure 39). Les résultats montrent effectivement que la diminution de FAM110B entraîne une diminution de plus d'environ 80% de la fraction nucléaire de la β -caténine avec dans le même temps une augmentation de sa quantité dans le cytoplasme.

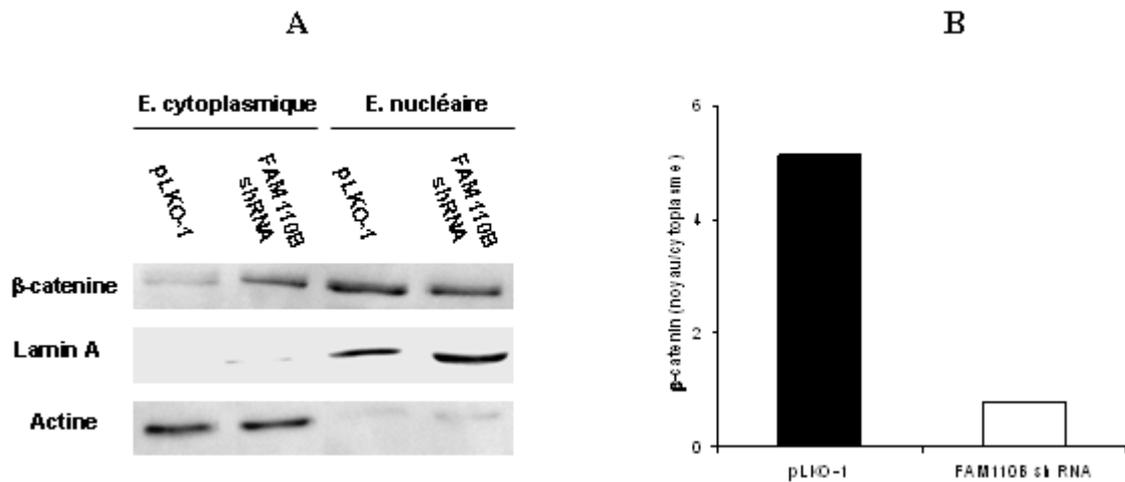


Figure 39: Etude la répartition de la β -caténine dans les cellules sousexprimant ou non FAM110B. Western Blot anti β -caténine sur des extraits cytoplasmiques et nucléaires provenant de cellules HeLa A10 et HeLa contrôle. La Lamine A est utilisée comme témoin de charge de la fraction nucléaire et de contamination de la fraction cytoplasmique. L'actine est utilisée comme témoin de charge de la fraction cytoplasmique et de contrôle de la contamination nucléaire.

Ce résultat montre clairement le rôle que joue FAM110B dans la régulation de la localisation subcellulaire de la β -caténine et plus précisément dans son transport du cytoplasme vers le noyau.

II.3.2.3 Rôle potentiel de FAM110B dans la régulation d'autres voies métaboliques impliquées dans les mécanismes tumoraux

Il existe aujourd'hui des systèmes qui permettent de cribler au niveau fonctionnel l'implication éventuelle d'un facteur donné dans une voie métabolique particulière, si tant est que l'on connaisse des gènes rapporteurs caractéristiques de ces voies. Nous avons utilisé ce type de système pour tenter de connaître l'implication de FAM110B dans les dix voies les plus rapportées en cancérologie. Pour ce faire nous avons utilisé un kit qui permet de mesurer l'activité transcriptionnelle de dix promoteurs de gènes caractéristiques de ces voies de façon individuelle, chaque promoteur étant couplé à un gène rapporteur de la luciférase (Tableau XII). Nous avons mesuré, dans les conditions de sousexpression de FAM110B, l'activation de ces gènes rapporteurs témoignant de l'intervention ou non de FAM110B dans la voie étudiée. Pour réaliser cette étude nous avons utilisé le kit Cignal Finder™ Cancer 10-Pathway Reporter Array (luc). Ce kit contient une série de vecteurs contenant chacun un promoteur de gène spécifique d'une voie avec comme rapporteur la luciférase Renilla, et un vecteur

contenant le promoteur CMV avec comme rapporteur la luciférase Firefly pour être utilisé comme contrôle de transfection. Le test consiste à co-transfecter les deux types de plasmides dans les cellules contrôle ou les cellules dans lesquelles FAM110B est diminuée pour comparer l'activité transcriptionnelle endogène de chaque promoteur. Les résultats sont présentés sur la figure 40. Ils sont exprimés sous forme de ratio de luminescence obtenu pour chaque promoteur (chaque voie) étudié entre cellules contrôle et sousexprimant FAM110B. Ils montrent que plusieurs voies métaboliques telles que les voies Notch, Wnt, TGF- β et celle du cycle cellulaire (pRB-E2F) sont significativement inhibées lorsque FAM110B est diminuée (Figure 40, barres rouges). L'effet modulateur de ces voies lié à la diminution de FAM110B n'est pas lié à un problème de transfection dans la mesure où la luminescence obtenue pour le contrôle de transfection est similaire dans l'ensemble des conditions testées (Figure 40, barres noires). Ces résultats démontrent donc un rôle plus général de FAM110B dans de multiples voies essentielles à la prolifération cellulaire au sens large.

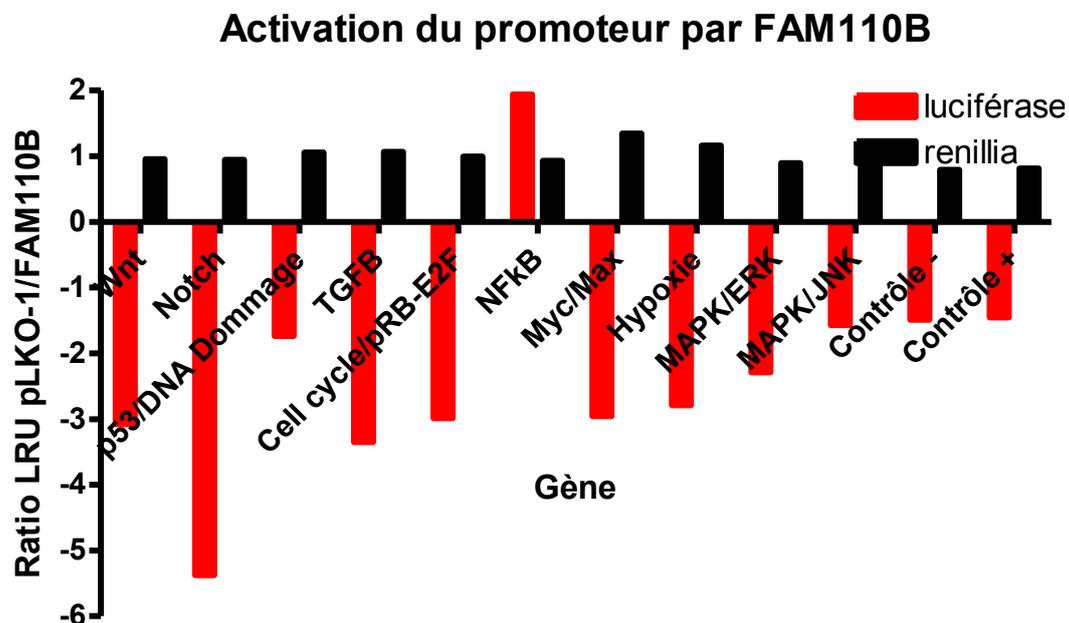


Figure 40: Test du criblage de l'activité fonctionnelle sur 10 promoteurs impliqués dans les mécanismes tumoraux. Test de criblage réalisé sur la lignée tumorale HeLa déficiente ou non en FAM110B. LRU = Unité de luminescence émise. Les histogrammes noirs indiquent le taux de transfection plasmidique et les histogrammes rouges représentent l'activité transcriptionnelle des gènes rapporteurs appartenant aux différentes voies impliquées dans les mécanismes tumoraux.

III Recherche de partenaires de FAM110B par la technique du double hybride

Toujours dans le but de nous orienter vers l'identification d'une fonction biologique pour FAM110B, nous avons entrepris en parallèle la recherche de partenaires potentiels de cette protéine en utilisant l'approche classique de double hybride chez la levure dont le principe est détaillé dans la partie matériels et méthodes. Cette recherche a nécessité tout d'abord la construction d'un vecteur codant l'ADNc de la protéine chimère de FAM110B qui sera utilisée comme appât pour le criblage d'interactions avec d'autres protéines contenues dans une banque d'expression de cDNA humains.

III.1 Construction de l'ADNc codant pour la protéine de fusion appât : DF gal4/FAM110B

La construction du plasmide appât a été réalisée par PCR à partir d'un plasmide pcDNA3.1 contenant l'ADNc de FAM110B (pcDNA3.1/FAM110B-V5his). Nous avons généré un amplifiat de l'ADNc de FAM110B d'une taille de 1,1 kb flanqué de deux sites de restriction pour les enzymes EcoRI et BamHI (Figure 41A). Ce produit de PCR a ensuite été inséré dans le plasmide pGBT9-DF préalablement digéré par les mêmes enzymes. La figure 41B montre la vérification d'un des produits de ligation obtenu avec l'obtention de deux produits de digestion par EcoRI et BamHI, correspondant à l'ADNc de FAM110B (1,1 Kb) et au plasmide pGBT9-DF linéarisé (5,4 Kb).

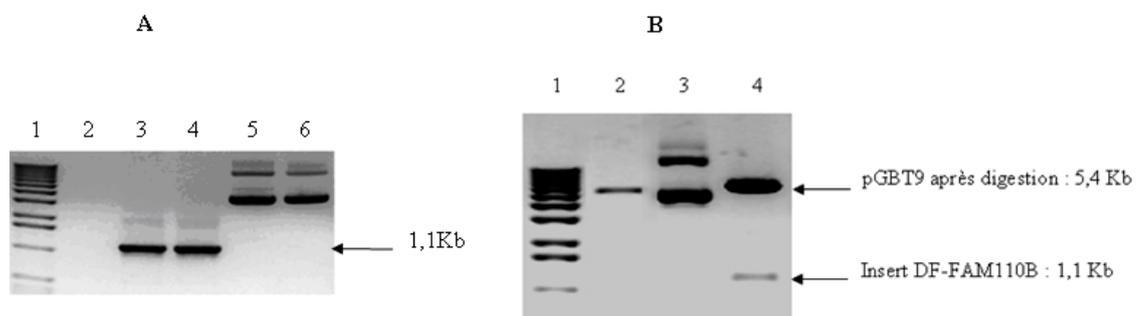


Figure 41: (A) Visualisation des produits de PCR sur gel d'agarose à 1% : piste 1 : marqueur de poids moléculaire ; piste 2 : témoin négatif de PCR (sans ADN matrice) ; pistes 3 et 4 : produit de PCR EcoRI-FAM110B-BamHI ; pistes 5 et 6 : plasmide pGBT9/DF-FAM110B non digéré. (B) Vérification de la construction pGBT9-DF-FAM110B. Piste 1 : marqueur de poids moléculaire ; piste 2 : plasmide pGBT9 vide digéré par EcoRI+BamHI, piste 3 : plasmide pGBT9/DF-FAM110B non digéré ; piste 4 : plasmide pGBT9/DF-FAM110B digéré par EcoRI+BamHI.

Nous nous sommes également assurés par séquençage direct du produit de ligation qu'il n'existait pas de décalage de cadre de lecture entre la séquence de FAM110B et la séquence DF (Figure 42).

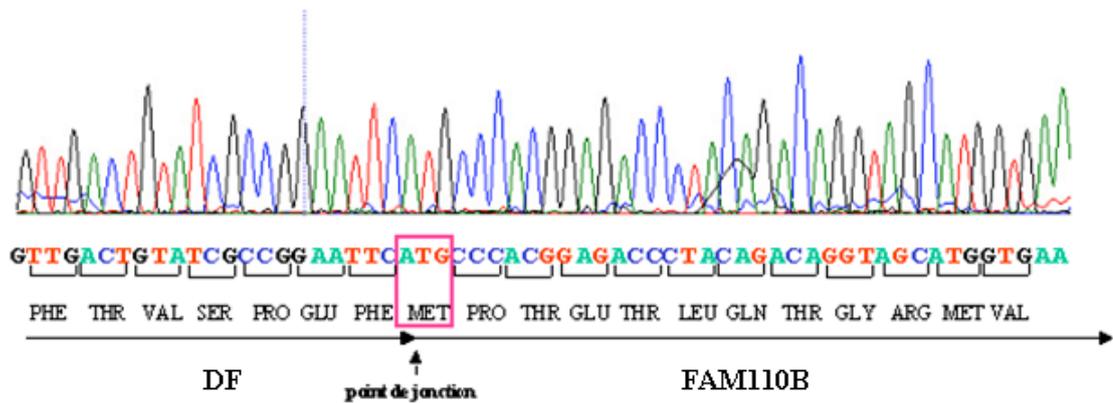


Figure 42: Séquence de la zone de jonction entre le domaine de fixation de Gal4p de pGBT9-DF et de FAM110B

III.2 Contrôles avant le croisement des souches de levures Mata et Mata

III.2.1 Test d'auto-activation de la protéine FAM110B

Ce test préalable permet de vérifier que la protéine FAM110B fusionnée au domaine de fixation à l'ADN de Gal4p n'est pas, en elle-même, activatrice du gène rapporteur *HIS3* en absence du domaine d'activation de Gal4p. Si tel était le cas, nous n'aurions pas pu utiliser cette approche pour rechercher des partenaires de FAM110B. Plusieurs plasmides contrôle ont également été utilisés : les plasmides pGBT9 vide, pGBT9/DF-FAM110B et pGBT9-DF-intégrase insérés dans les souches de levure haploïdes AH109 Mata α et les plasmides pGAD-GH vide, pGAD-GH-12C et pGAD-GH-38B insérés dans les souches de levure haploïdes Y187 Mata. La présence de ces plasmides dans les deux souches est vérifiée par culture des levures haploïdes sur milieux sélectif SD Agar-Trp ou SD Agar-Leu en fonction du plasmide (Figure 43A).

Différents croisements entre les souches de levure AH109 Mata α et Y187 Mata sont ensuite réalisés et les levures diploïdes résultantes cultivées sur milieu SD Agar-Leu-Trp. Parallèlement, une sélection des différents croisements est réalisée sur milieu sélectif SD Agar-Leu-Trp-His+3AT pour tester l'activation du gène rapporteur *HIS3*, c'est-à-dire l'interaction entre les protéines codées par les différents plasmides. La figure 43B montre les résultats obtenus. Le croisement des souches contenant pGAD-

GH vide avec les souches contenant l'un des trois plasmides pGBT9 (pGBT9-DF vide, pGBT9-DF-FAM110B et PGBT9-DF-Intégrase) donnent des souches diploïdes qui poussent sur milieu SD Agar-Trp-Leu mais qui ne poussent pas sur milieu SD Agar-Leu-Trp-His+3AT, démontrant que la protéine DF-FAM110B n'est pas auto-activatrice (au même titre que DF-Intégrase). Ces résultats sont validés par l'autre série de croisements entre la souche contenant pGAD-GH 12c et les souches contenant l'un des trois plasmides pGBT9. En effet, toutes les souches diploïdes résultant du croisement poussent sur milieu SD Agar-Trp-Leu mais seule la souche résultant du croisement pGAD-GH 12c et pGBT9-DF-Intégrase pousse sur milieu SD Agar-Leu-Trp-His+3AT. Ce résultat sert de contrôle positif d'activation du gène HIS3 car la protéine 12c est connue pour interagir avec la protéine DF-Intégrase du HIV1. Nous constatons aussi que la protéine 12c n'interagit pas avec DF-FAM110B.

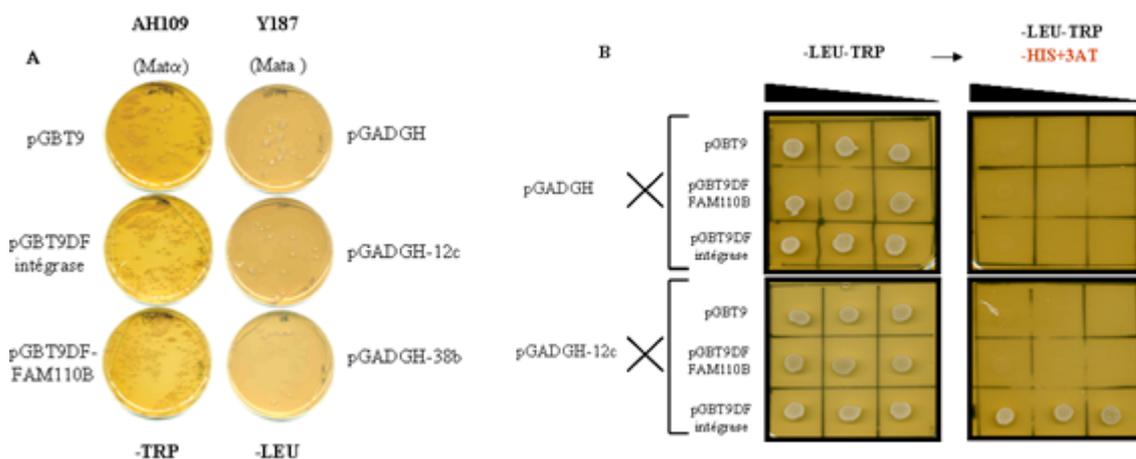


Figure 43: Résultats des croisements des souches de levure Y187 pGAD-GH vide et Y187 pGAD-GH-12c par des souches de levures AH109 transformées par différentes constructions plasmidiques de pGBT9. (A) Culture des différentes souches de levures haploïdes AH109 et Y187 transformées par différents plasmides sur milieux sélectifs SD Agar-Trp et SD Agar-Leu, respectivement. (B) : test d'auto-activation de la protéine FAM110B.

III.2.2 Vérification de l'expression de la protéine de fusion DF-FAM110B

Une autre étape importante était également de vérifier que la protéine appât, dès lors qu'elle était introduite dans les souches Mat α (AH109), était bien exprimée. La figure 44 présente les résultats de Western Blot obtenus à partir d'un extrait total de levure AH 109 transformée par le plasmide pGBT9/DF-FAM110B. Les résultats font apparaître une bande d'environ 55 KDa correspondant à la fusion entre la protéine FAM110B (40 KDa) et le domaine de fixation à l'ADN (15 KDa). Cette bande est

absente dans les souches de levure AH109 transformées par les plasmides pGBT9 vide et pGBT9-DF-Intégrase.

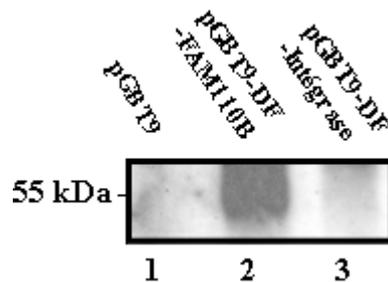


Figure 44: Détection de la protéine DF-FAM110B par Western Blot avec l'anticorps anti-FAM110B dans des extraits de levures AH109 transformées par pGBT9 vide (piste 1), pGBT9/DF-FAM110B (piste 2), pGBT9/DF-Intégrase (piste 3).

Remarque : la difficulté de révélation de la protéine DF-FAM110B est liée au faible nombre de copies d'ADN plasmidique présentes dans les levures et au faible rendement de l'étape d'extraction lié à la difficulté de fragmenter efficacement les parois des levures.

III.3 Croisement des levures et contrôles.

III.3.1 Efficacité du croisement

L'efficacité du croisement correspond au pourcentage des clones de levures diploïdes obtenues à partir du croisement des levures haploïdes contenant d'un côté l'appât et de l'autre la banque d'ADNc à cribler. Elle dépend de la viabilité des souches haploïdes sur leurs milieux sélectifs respectifs (Figure 45). Afin de conserver une bonne représentativité des inserts de la banque, il est impératif que la souche haploïde contenant la banque (Y187) soit en quantité limitante par rapport à la souche contenant l'appât. Le croisement est considéré comme correct si son efficacité est de 5 à 8%. L'efficacité se calcule donc en tenant compte de la souche limitante selon la formule :

$$\frac{\text{Nbre de colonies formées par mL de levures diploïdes}}{\text{Nbre de colonies formées par mL de levures haploïdes de la banque}} \times 100$$

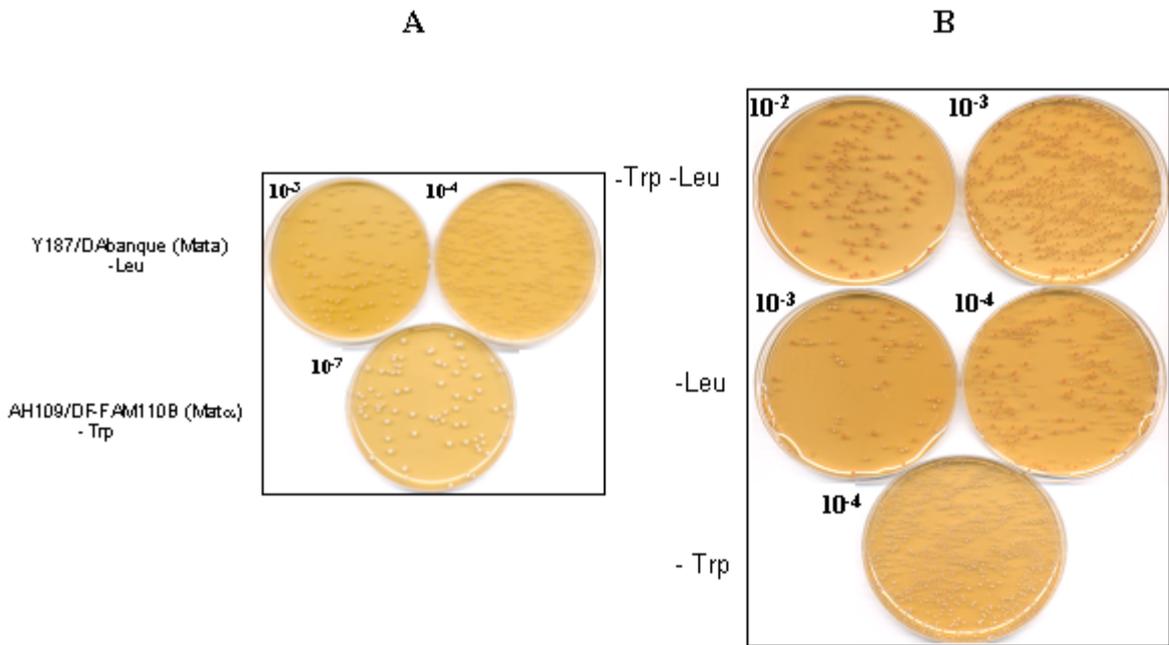


Figure 45: (A) Viabilité des souches haploïdes AH109 contenant l'appât et Y187 contenant la banque d'ADNc. (B) Viabilité des souches diploïdes résultant du croisement des souches haploïdes AH109 et Y187.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Viabilité de la souche Y187 = $1,6 \cdot 10^8$ cfu/mL

Viabilité de la souche AH109 = $3,95 \cdot 10^9$ cfu/mL

Dans ces conditions, la souche Y187 est bien en quantité limitante par rapport à la souche AH109.

Viabilité des diploïdes = $1,17 \cdot 10^7$ cfu/mL

Efficacité du croisement = $(1,17 \cdot 10^7 \text{ cfu/mL} / 1,6 \cdot 10^8 \text{ cfu/mL}) \times 100 = 7,3 \%$

Ces résultats sont parfaitement compatibles avec la poursuite du criblage.

III.3.2 Sélection des diploïdes après croisement

Le mélange du croisement est étalé sur milieu sélectif SD Agar-Trp-Leu-His+3AT pour sélectionner les clones positifs pour une interaction entre la protéine DF-FAM110B et les protéines issues de l'ADNc des différents fragments de la banque fusionnée au domaine d'activation. 297 clones ont émergés de cette sélection. Chaque colonie est identifiée par un chiffre correspondant à un numéro de boîte de culture suivie d'une lettre correspondant au nombre de colonies par boîte.

III.3.3 Le test en gouttes

Parmi les clones issus de cette première sélection, un certain nombre d'entre eux représentent des « faux positifs » dont la croissance sur ce milieu de sélection est simplement liée au fait qu'ils utilisent comme source de nutriment les cadavres des levures mortes qui n'ont pas émergées de la sélection. Ces faux positifs ont pu être écartés par repiquage de dilutions successives de ces clones sur milieu sélectif SD Agar-Trp-Leu-His+3AT. Seuls 209 clones parmi les 297 clones initiaux ont été retenus. Un exemple de résultat du test en gouttes est représenté sur la figure 46 permettant d'éliminer les clones 49D, 53F et 53G.

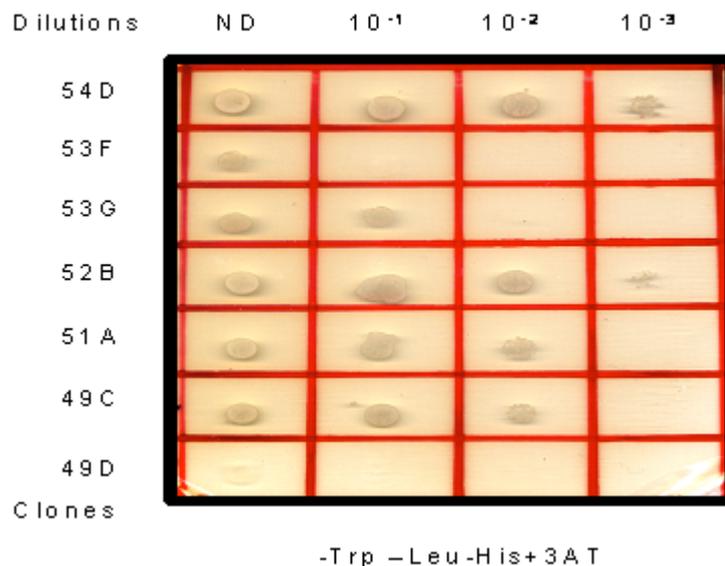
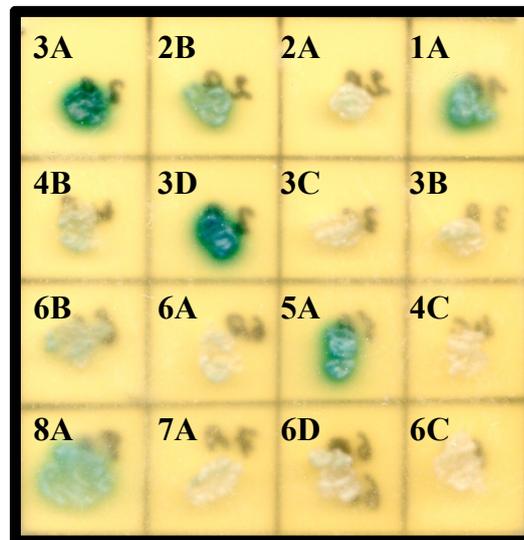


Figure 46: Résultats des tests en gouttes de 7 clonesensemencés sur milieu SD Agar-Leu-Trp-His+3AT aux 3 dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}

III.3.4 Le test X- α -gal

Les souches de levure possèdent un gène endogène qui code pour une enzyme α -galactosidase capable d'hydrolyser le substrat chromogène X- α -gal pour donner une couleur bleue. Le gène MEL1 n'est activé qu'en présence d'une interaction entre les deux domaines de la protéine Gal4p. Pour éliminer d'autres clones faussement positifs, les clones issus de la sélection du test en gouttes sont repiqués sur le milieu sélectif SD Agar-Trp-Leu-His+3AT auquel on ajoute le substrat de l'enzyme. Un exemple des résultats obtenus est représenté sur la figure 47. Seules les colonies « bleues » et bleutées ont été sélectionnées. Ainsi, 112 clones positifs pour une interaction entre DF-

FAM110B et une protéine fusionnée au domaine d'activation de Gal4p issue de la banque d'ADNc ont été retenus.



-Trp -Leu -His + X- -Gal

Figure 47: Résultats du test X- α -gal. Les clones diploïdes sont repiqués sur un milieu SD Agar-Trp-Leu-His+3AT en présence X- α -gal. Seuls les clones bleus sont positifs pour ce test.

III.4 Identification des candidats d'interaction avec DF-FAM110B

L'identification des protéines susceptibles d'interagir avec DF-FAM110B a été réalisée à partir des données de séquençage des plasmides de la banque contenus dans les 112 clones de levures diploïdes retenus après les différents cribles de sélection. La comparaison de ces séquences aux séquences nucléotidiques disponibles dans les banques de données a permis l'identification des gènes et des protéines correspondantes. L'ensemble des 64 clones analysés ont permis d'identifier 9 protéines différentes pouvant potentiellement interagir avec DF-FAM110B (Tableau VIII). Le gène le plus souvent représenté est celui de 14.3.3 ϵ retrouvé 27 fois sur les 64 clones analysés, loin devant les autres protéines. Comme le reste des membres de la famille 14.3.3, 14.3.3 ϵ est impliquée dans un certain nombre de voies liées à la prolifération cellulaire. Il a de plus une spécificité intéressante qui est son implication spécifique dans la modulation de la réponse cellulaire aux inhibiteurs de Topo2 comme l'étoposide [Kurz et al. 2000].

Nous avons donc voulu valider dans un premier temps le résultat de double-hybride en vérifiant s'il existait bien une interaction physique entre FAM110B et 14.3.3ε dans des cellules humaines en culture.

Tableau VIII: Les différentes protéines identifiées par le crible de double-hybride chez la levure susceptibles d'interagir avec FAM110B.

Nom des protéines interactantes	Fréquence
14.3.3ε (YWHAE)	27
NudE1	9
Caseine kinase 1δ	2
Debrin like (DBNL)	2
Ras interacting protein 1 (RASIP1)	2
Caseine kinase 1 ε	1
Nucleoporin 155 Kda (NUP155)	1
Homo sapiens ribosomal protein S15 (RPS15)	1
UXT	1
Homosapiens growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2)	1
Mitotic arrest deficient-like 2 (MAD2L2)	1
Ribosomal protein LI3a (RPLI3A)	1
Spermatide perinuclear RNA binding protein (STRBP)	1

III.4.1 Validation d'une interaction potentielle entre FAM110B et la protéine 14.3.3ε dans des cellules humaines en culture

Pour tenter de mettre en évidence l'interaction de FAM110B avec 14.3.3ε par la technique d'immunoprécipitation, nous avons surexprimé une forme étiquetée V5 de FAM110B dans des cellules HeLa. Parallèlement, la protéine GFP-V5 a été surexprimée dans le même type de cellules pour être utilisé comme contrôle négatif et s'assurer de la spécificité de l'interaction. L'immunoprécipitation a été réalisée à partir de 700 µg des lysats cellulaires des cellules surexprimant FAM110B-V5 ou GFP-V5. Les résultats de la figure 48 révèlent bien la présence des protéines FAM110B-V5 et GFP-V5 dans les culots d'immunoprécipitation anti-V5. L'utilisation de l'anticorps anti-14.3.3ε permet également de montrer la présence de 14.3.3ε dans le culot d'immunoprécipitation où FAM110B-V5 est retrouvée, démontrant l'interaction entre

ces deux protéines (Figure 48A). Cette interaction semble spécifique dans la mesure où 14.3.3ε n'est pas retrouvée précipitée par la protéine contrôle GFP-V5 (Figure 48A). A l'inverse, comme le montre la figure 48B, l'immunoprécipitation croisée de 14.3.3ε entraîne bien une coprécipitation de FAM110B dans les cellules exprimant cette forme ectopique de FAM110B. En revanche, l'anticorps anti V5 ne révèle aucune bande de la protéine contrôle GFP-V5. Ces résultats confirment donc les données d'interaction obtenues par la technique du double-hybride chez la levure.

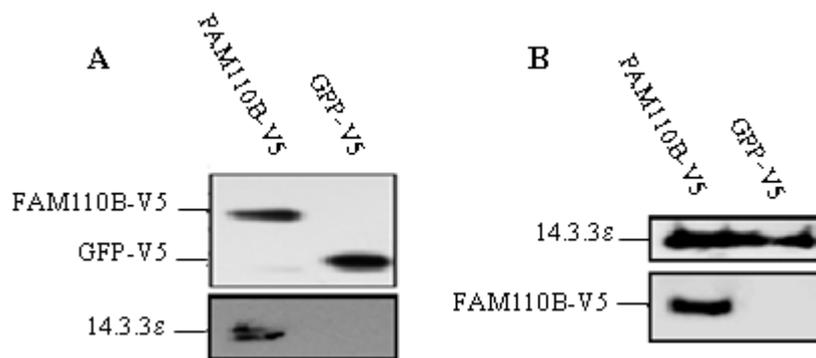


Figure 48: Validation de l'interaction FAM110B/14.3.3ε dans les cellules HeLa. (A) Western Blot anti-14.3.3ε après IP anti-V5 réalisées sur des lysats cellulaires de cellules surexprimant FAM110B-V5-His ou GFP-V5-His. (B) Western Blot anti-V5 après immunoprécipitation anti-14.3.3ε sur les mêmes lignées.

III.4.2 Recherche de sites d'interactions de 14.3.3ε au niveau de FAM110B

De façon intéressante, la recherche de motifs fonctionnels dans la séquence de FAM110B humaine à l'aide de l'outil ELM (*Eukaryotic Linear Motifs*; <http://elm.eu.org/>) a permis de mettre en évidence deux sites de liaison potentielle à 14.3.3ε nécessitant la présence de sérine(s) phosphorylée(s) (sérines 255 et 261 pour le premier site et sérines 301 et 312 pour le deuxième site). Afin de vérifier si ces acides aminés sont effectivement impliqués dans la liaison de FAM110B à 14.3.3ε, nous avons effectué des mutagénèses dirigées contre ces deux sites en remplaçant chaque sérine par une alanine.

III.4.3 Validation des sites d'interactions entre FAM110B et 14.3.3ε par immunoprécipitation

Après transfection des cellules HeLa par les différentes constructions plasmidiques (FAM110B-V5, GFP-V5 et FAM110B S255/261A-V5, FAM110B S301/312A-V5), les lysats cellulaires ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-V5

et les culots analysés avec soit les anticorps anti-V5 (contrôle de l'immunoprécipitation) soit avec les anticorps anti-14.3.3ε . Les résultats de la figure 49 révèlent la présence de la protéine 14.3.3ε uniquement au niveau des échantillons correspondant à la surexpression de FAM110B sauvage. En revanche, aucun signal n'est détecté au niveau des échantillons correspondant aux différentes formes mutées de FAM110B, ni au niveau du contrôle négatif GFP-V5.

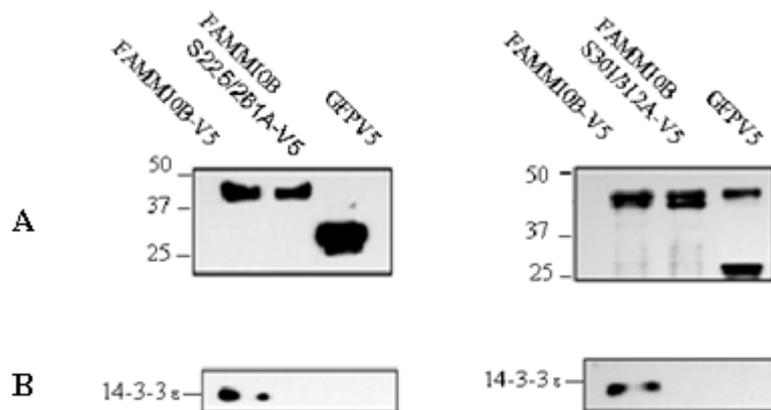


Figure 49: Validation des sites d'interaction de FAM110B et 14.3.3 ε. (A) Western Blot anti-V5, après IP anti-V5 de lysat cellulaire provenant de cellules HeLa surexprimant FAM110B-V5, les formes mutées de FAM110B-V5 et GFP-V5. (B) Les mêmes membranes ont été déshybridées et révélées par un anticorps anti-14.3.3 ε.

Ces résultats démontrent que l'interaction de FAM110B avec la protéine 14.3.3ε a lieu au niveau des sites S255/261 et S301/312.

III.4.4 Effets des mutations des sites de liaison à 14.3.3ε sur la localisation intracellulaire de FAM110B

Les protéines 14.3.3 sont connues pour jouer un rôle dans la « séquestration » de certaines protéines au niveau du cytoplasme et réguler leur « transport » au niveau d'autres compartiments de la cellule. Nous avons donc voulu explorer les conséquences de la suppression de l'interaction entre FAM110B et 14.3.3ε sur une éventuelle « relocalisation » de FAM110B au niveau subcellulaire. Nous avons pour cela surexprimé les formes mutées de FAM110B dans des cellules HeLa et MCF7 et analysé par la technique de microscopie confocale la répercussion de ces mutations sur la localisation subcellulaire des différentes formes de FAM110B. Les images obtenues présentées sur la figure 50, montrent que les formes mutées de FAM110B (fluorescence rouge) sont réparties de façon assez homogène dans l'ensemble des compartiments

cellulaires, contrairement à ce qui est observé pour la forme sauvage majoritairement localisée au niveau cytoplasmique. Ceci montre que les mutations des sérines 255 et 261 et des sérines 301 et 312, responsables d'une probable dissociation de l'interaction entre FAM110B et 14.3.3 ϵ , entraînent une relocalisation d'une partie de FAM110B vers le noyau des cellules HeLa et MCF-7.

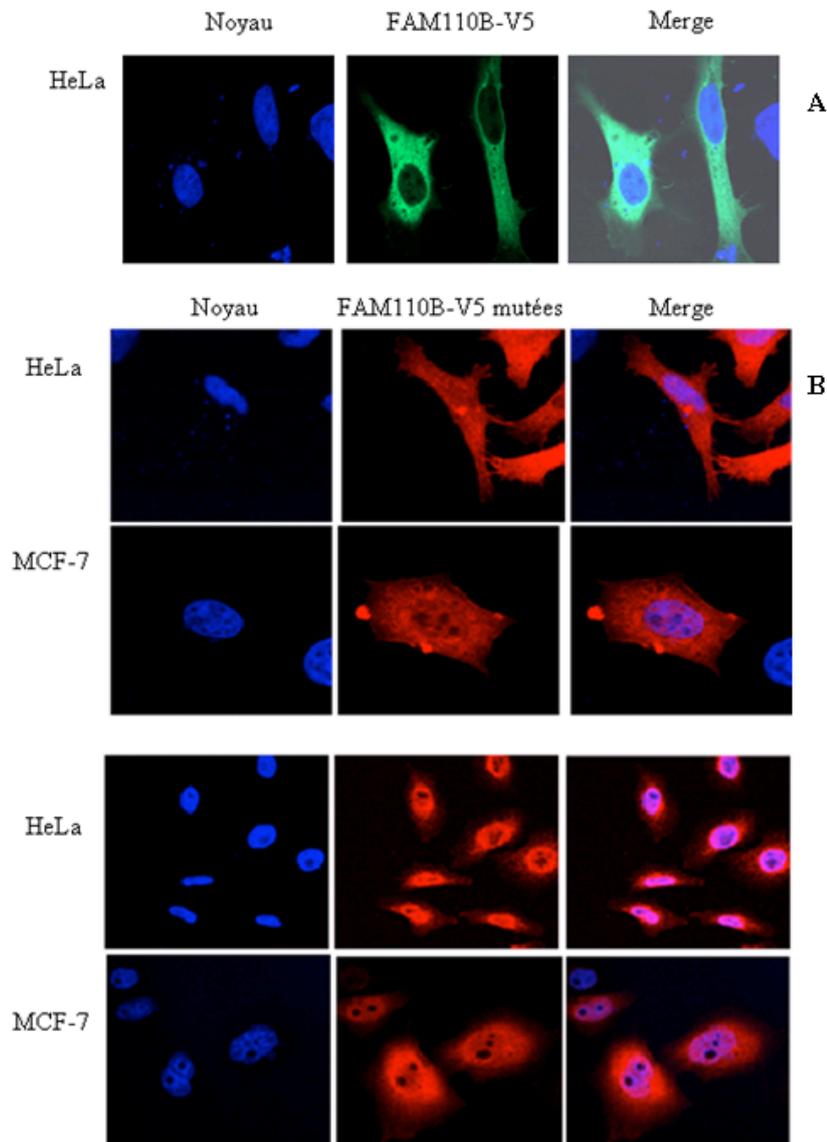


Figure 50: Localisation cellulaire des formes mutées de FAM110B dans des cellules HeLa et MCF-7 par microscopie confocale. (A) visualisation de FAM110B sauvage (fluorescence verte). (B) visualisation de FAM110BS255/261A-V5. (C) visualisation de FAM110BS301/312A-V5 (fluorescence rouge). En bleu : noyaux cellulaires colorés au Hoechst. Merge : superposition de la révélation des noyaux et des différentes formes de FAM110B.

IV Effet de la répression de FAM110B dans la réponse cellulaire aux inhibiteurs de Topoisomérases

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'identification de FAM110B provient d'une campagne de criblage fonctionnel d'éléments génétiques suppresseurs (GSEs) dans laquelle l'agent de sélection utilisé était la 9-OH-E, un inhibiteur de Topo2 qui fait partie de la famille des poisons de l'enzyme [Gros et al. 2003]. Ce criblage a permis d'isoler 11 GSEs correspondant à 11 gènes différents parmi lesquels le GSE13 dont la séquence correspondait à une partie de la région 5'-terminale de FAM110B. En dehors de la caractérisation fonctionnelle de FAM110B qui a constitué la majeure partie de notre travail de Thèse, nous avons également étudié plus en détail l'implication de FAM110B dans la sensibilité à diverses classes d'agents anticancéreux, notamment aux inhibiteurs de Topoisomérases qui nous intéressent au premier plan. Comme nous le verrons, les résultats obtenus dans ce cadre sont encore très préliminaires mais constituent une première base pour tenter de mieux comprendre au niveau moléculaire le rôle de FAM110B dans la régulation de la sensibilité cellulaire à ces inhibiteurs.

Le laboratoire avait montré que l'expression du GSE13 conférait aux cellules DC-3F une résistance à la 9-OH-E [Gros et al. 2003], mais aussi à l'étoposide (donnée non publiée) probablement par un effet dominant négatif. Ayant caractérisé FAM110B comme étant le gène dont est issu ce GSE, nous avons dans un premier temps voulu confirmer que la répression du gène correspondant, FAM110B conduisait aussi à un phénotype de résistance aux inhibiteurs de Topo2. Nous avons pour cela mesuré l'effet de la répression transitoire de FAM110B sur la sensibilité des cellules HeLa à la 9-OH-E (l'agent de sélection utilisé dans l'étude initiale) et à l'étoposide. Nous avons également étendu cette étude à d'autres classes d'agents anticancéreux comme les inhibiteurs de Topo1 (CPT), les agents alkylants (cisplatine) ainsi que les poisons du fuseau (vincristine et taxol), afin d'évaluer le rôle plus général de FAM110B dans la régulation de la réponse aux agents cytotoxiques.

Nous avons mesuré l'effet de la répression transitoire de FAM110B par infection avec les lentivirus exprimant la construction A10 du shRNA dirigé contre FAM110B sur la sensibilité aux inhibiteurs de Topo1 et 2. Cinq jours après infection par les lentivirus, les cellules HeLa A10 et HeLa contrôle (infectées par le lentivirus pLKO-1) ont été traitées par des doses croissantes d'inhibiteurs de Topo2 (9-OHE ou étoposide), ou d'inhibiteur de Topo1 (CPT) pendant 24 h. L'inhibition de croissance a ensuite été évaluée par un test au MTT (voir matériel et méthodes). Les résultats montrent

clairement que la répression de FAM110B confère une forte résistance des cellules HeLa aux deux inhibiteurs de Topo2, avec une augmentation d'IC₅₀ d'un facteur de 10 (Figure 51A). Ces résultats renforcent les résultats obtenus avec le GSE13 et confirment que le gène FAM110B est impliqué dans les mécanismes de sensibilité à cette classe d'inhibiteurs. A l'inverse, il apparaît que la réduction du niveau de FAM110B confère une hypersensibilité des cellules HeLa à la camptothécine (Figure 51B).

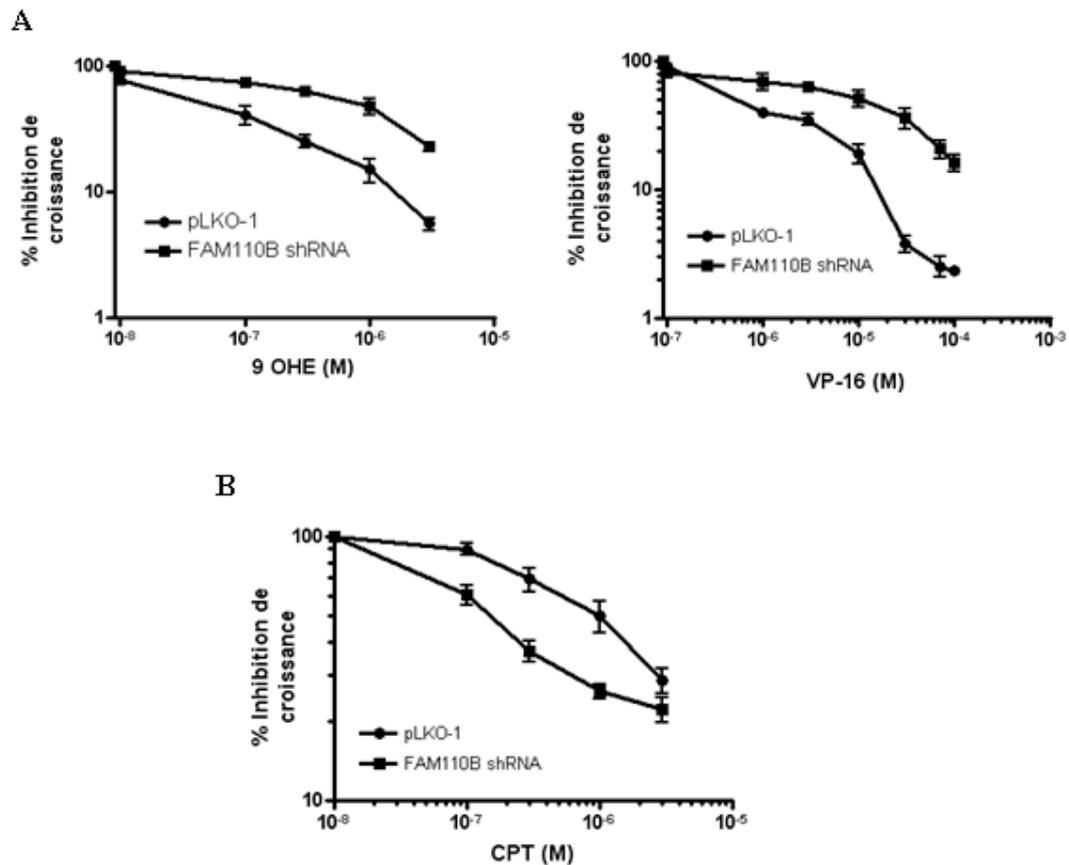


Figure 51: Effet de la répression transitoire de FAM110B sur la sensibilité des cellules HeLa aux inhibiteurs de Topoisomérases. Cinq jours après l'infection par le vecteur vide (pLKO-1) ou ciblant FAM110B (sh RNA FAM110B A10) les cellules HeLa sont traitées par des concentrations croissantes d'inhibiteur de Topo2 (A) ou de Topo1 (B) pendant 24 h et la cytotoxicité mesurée par un test de MTT. Les données sont exprimées en pourcentages d'inhibition de croissance par rapport aux cellules non traitées (moyenne \pm SD, n=3).

Etant donné que la cytotoxicité de ces inhibiteurs requiert la stabilisation des complexes covalents ADN-Topoisomérases, nous avons voulu savoir si la résistance à l'étoposide (ou la sensibilité à la camptothécine) conférée par la réduction du niveau de FAM110B était associée à une différence du nombre de ces complexes. Nous avons pour cela utilisé la technique ICE (pour *Immuno Complex of Enzyme*) afin de détecter la présence de ces complexes dans des cellules HeLa sous-exprimant ou non FAM110B en

réponse à un traitement court avec ces deux types d'inhibiteurs de Topo (2 h avec 50 μ M d'étoposide ou 1 μ M de CPT, figure 52). La technique d'ICE permet d'isoler, par centrifugation sur un gradient de chlorure de césium, les Topoisomérases liées de manière covalente à l'ADN et de révéler leur présence à l'aide d'un anticorps spécifique par Western Blot après transfert des fractions contenant l'ADN sur une membrane de protéine. Comme le montre la figure 52A, le nombre de complexes ADN-Topo1 stabilisé par la CPT est identique entre les cellules contrôle et les cellules dans lesquelles le niveau de FAM110B est réduit, suggérant que la plus grande sensibilité observée chez ces cellules n'est pas liée à une altération du nombre de complexes mais probablement à des événements moléculaires en aval de la stabilisation des complexes. L'absence de complexe pour les mêmes cellules traitées par l'étoposide valide la spécificité des bandes obtenues avec la Topo1.

En ce qui concerne les résultats obtenus pour l'étoposide, la figure 52B fait apparaître une diminution significative du nombre des complexes ADN-Topo2 stabilisés par le médicament dans les cellules HeLa dans lesquelles le niveau de FAM110B est transitoirement réduit. Cette réduction est similaire pour les deux isoformes de la Topo2 (Figure 52B). Ces résultats sont en accord avec la résistance des cellules HeLa shRNA FAM110B à l'étoposide. Nous avons voulu savoir quelle était la raison de cette diminution. Une hypothèse simple que nous avons pu tester est que la réduction du niveau de complexes ADN-Topo2 observée en réponse à l'étoposide est liée à une diminution de la quantité de Topo2. Le résultat de la figure 53 montre effectivement que la réduction transitoire de l'expression de FAM110B entraîne bien une réduction significative du niveau de Topo2 α . Ce résultat suggère donc que la réduction du niveau de Topo2 est, au moins en partie, responsable de la réduction du nombre de complexes stabilisés par l'étoposide dans les cellules HeLa où le niveau de FAM110B est réduit, expliquant la résistance de ces cellules à cet inhibiteur. Il reste à étudier les raisons de cette réduction du niveau d'expression de la Topo2 qui peut être multiple : augmentation de sa dégradation par le protéasome, ou inhibition transcriptionnelle par des mécanismes qui restent à investiguer.

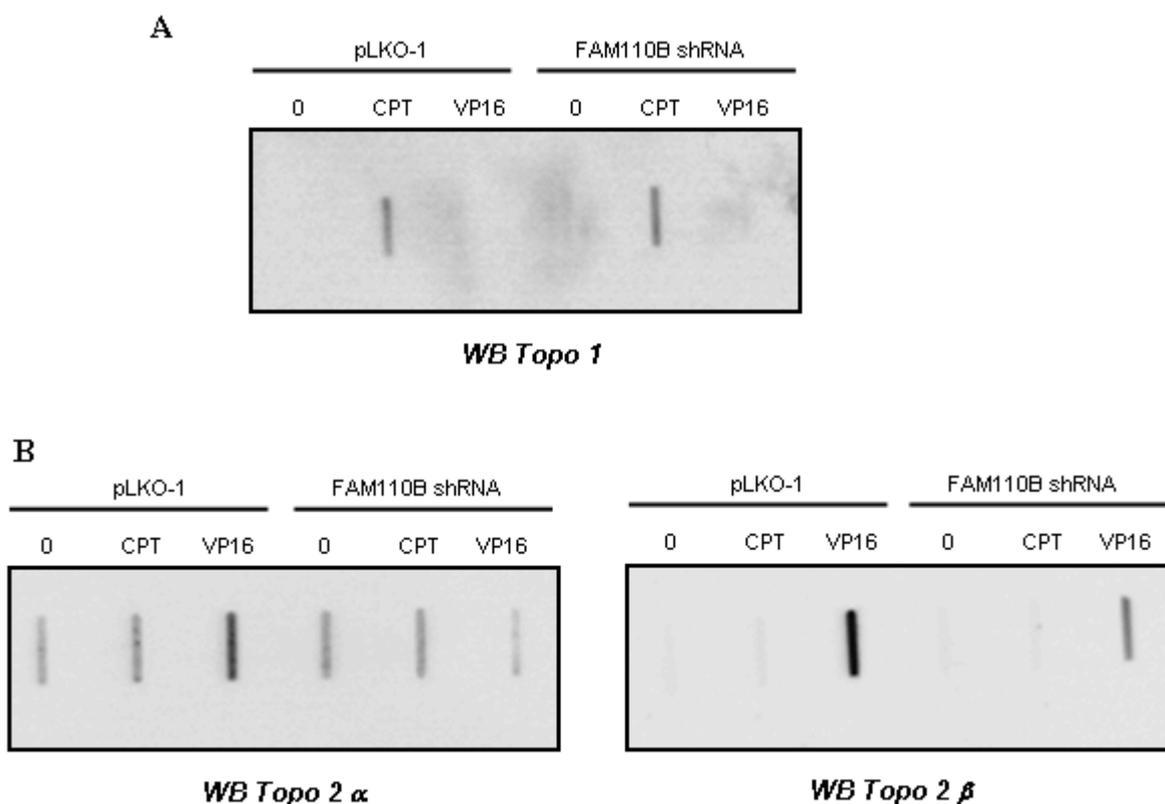


Figure 52: Quantités de complexes ADN-Topoisomérases dans les cellules HeLa A10 et contrôle évaluées par la technique ICE après 2 h de traitement ou non par la CPT (1 μ M) et le VP-16 (50 μ M). Après lyse des cellules (sarcosyl 1%), les fractions contenant l'ADN sont isolées par gradient de CsCl et analysées pour leur contenu en Topo1 (A) et en Topo 2 α et Topo2 β (B) par Western Blot après transfert sur membrane Immobilon-P.

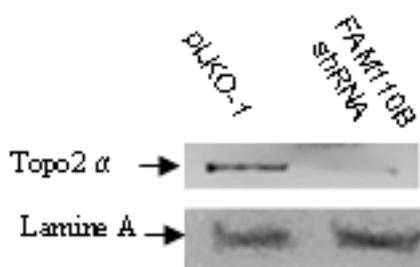


Figure 53: Effet de la répression transitoire de FAM110B sur l'expression de la Topo2 α dans des extraits nucléaires (100 μ g de protéine) de cellules HeLa. Le Western Blot est réalisé 5 jours après l'infection et la lamine A est utilisée comme témoin de charge des échantillons.

Outre son rôle dans la modulation de la réponse cellulaire à certain poisons de la famille des inhibiteurs des Topoisomérases, nous avons également étudié l'effet de la réduction du niveau de FAM110B sur la sensibilité cellulaire à d'autres agents anticancéreux couramment utilisés en clinique. La figure 54 présente les résultats obtenus pour un représentant de la famille des agents alkylants, le cisplatine et deux

poisons des microtubules, le taxol et la vincristine. Ces résultats montrent que la réduction du niveau de FAM110B induit une forte sensibilisation des cellules aux deux poisons de tubulines alors qu'elle confère une sensibilité au cisplatine.

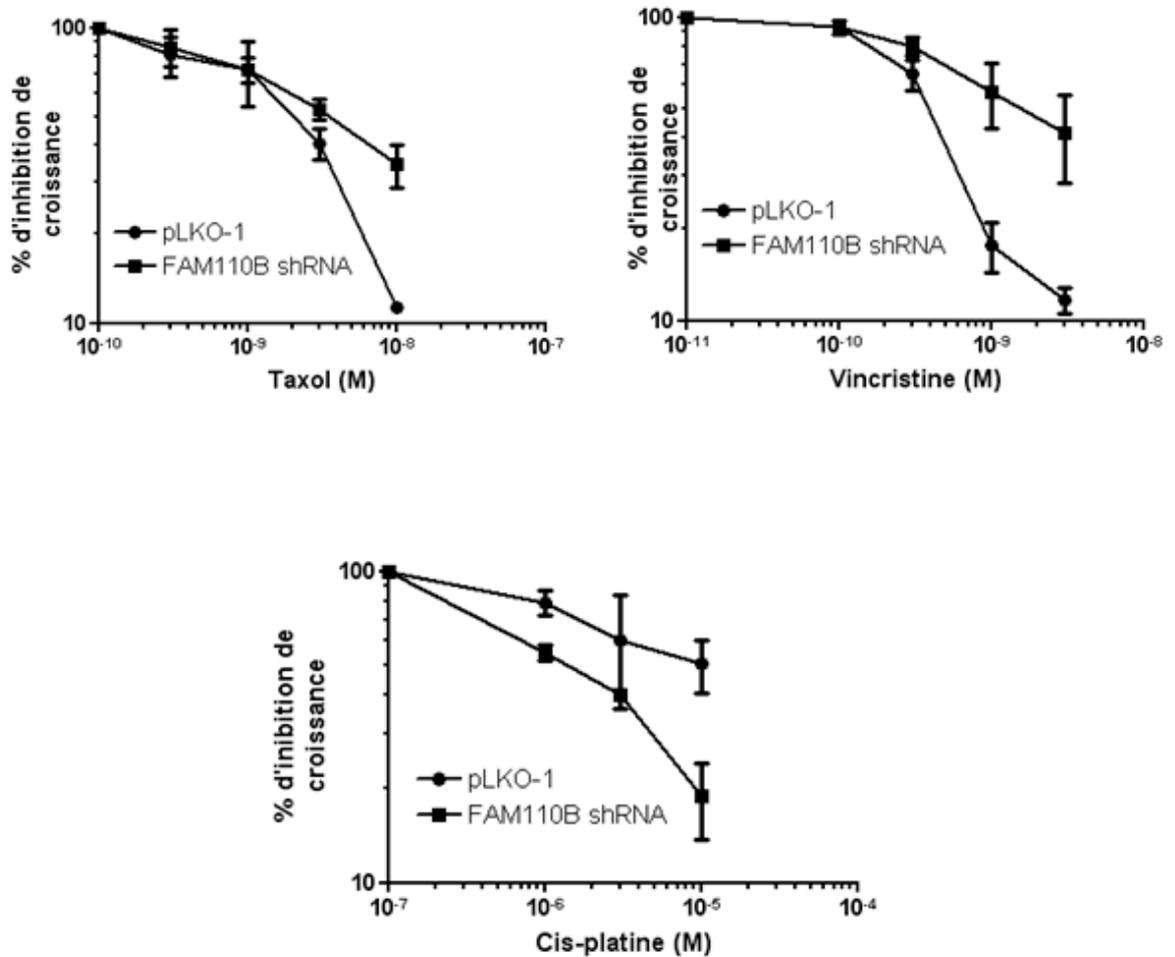


Figure 54: Effet de la répression transitoire de FAM110B sur la sensibilité des cellules HeLa aux poisons des microtubules (taxol et vincristine) et au cisplatine. Cinq jours après l'infection par les lentivirus contrôle (pLKO-1) ou ciblant FAM110B (sh RNA FAM110B A10) les cellules HeLa sont traitées par des concentrations croissantes de médicaments pendant 24 h et la cytotoxicité mesurée par un test de MTT. Les données sont exprimées en pourcentages d'inhibition de croissance par rapport aux cellules non traitées (moyenne \pm SD, n=3).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Notre travail de thèse a été consacré à la caractérisation de FAM110B, une nouvelle protéine qui a été identifiée il y a quelques années par deux approches indépendantes. Une approche menée dans notre laboratoire qui consistait à rechercher de nouveaux gènes de sensibilité à un inhibiteur des ADN Topo2, la 9-hydroxyellipticine (9-OHE), par la technique de sélection d'éléments génétiques suppresseurs (GSEs) [Gros et al. 2003]. Ce crible fonctionnel avait abouti à l'identification de 11 GSEs, qui sont des fragments d'ADN de 200 à 500 paires de bases capables de conférer une résistance aux inhibiteurs de Topo2 lorsqu'ils sont introduits dans des cellules sensibles. Parmi ces GSEs, le GSE13 possédait une séquence identique à un gène putatif nommé c8orf72, gène qui correspond aujourd'hui à FAM110B selon la nomenclature HUGO. L'autre approche consistait, elle, à rechercher des partenaires d'une protéine centrosomale et avait identifié FAM110A, un homologue de FAM110B qui avec FAM110C représentent les trois membres de la famille FAM110 [Hauge et al. 2007]. Alors que FAM110A et C sont essentiellement centrosomique [Hauge et al. 2007], FAM110B présente une localisation diffuse au niveau du cytoplasme dans différentes lignées cancéreuses analysées.

L'objectif principal de notre travail était d'identifier une fonction biologique pour FAM110B ou du moins d'identifier les voies dans lesquelles cette protéine pouvait être impliquée. Un certain nombre de données nous ont rapidement indiqué que cette protéine était certainement essentielle à la survie des cellules eucaryotes et jouait probablement un rôle important dans la prolifération cellulaire. Ces données proviennent d'observations réalisées lors des multiples tentatives de diminution de l'expression de FAM110B dans le but d'obtenir un modèle de répression de FAM110B dans des cellules humaines. La répression transitoire de FAM110B par interférence à l'ARN induit une diminution de la prolifération cellulaire d'environ 4 fois par rapport aux cellules contrôle (Figure 27). Cet effet est directement lié au blocage des cellules en phase S du cycle cellulaire observé dans les cellules qui sousexpriment FAM110B (Figure 28). Ce rôle essentiel dans la prolifération est renforcé par le fait que nous n'avons jamais pu obtenir de clones stables de répression de FAM110B avec un système d'expression lentiviral de shRNA ou de cellules knock-out pour ce gène en utilisant le modèle de cellules pré-B Nalm-6 [Adachi et al. 2006]. Dans le modèle Nalm-6 nous avons pu obtenir des clones hémizygotés Nalm-6 FAM110B (+/-) exprimant, comme attendu, 50% de la protéine (Figure 26B) mais nous n'avons jamais

pu isoler de clones FAM110B $-/-$. Ce caractère essentiel de FAM110B dans la survie cellulaire a été également rapporté dans deux études récentes. La sous-expression de FAM110B dans des cellules cancéreuses prostatiques induit une inhibition de leur prolifération [Vainio et al. 2011] alors que sa surexpression dans des cellules cancéreuses rénales engendre un blocage du cycle cellulaire en phase G1 [Hauge et al. 2007].

La prolifération cellulaire est orchestrée par plusieurs voies de signalisation très complexes incluant notamment les voies Hedgehog [Karhadkar et al. 2004; Mill et al. 2003], TGF β [Salm et al. 2011], Wnt [Moon 2005], ou Notch [Miele and Osborne 1999]. Or, nous avons montré grâce à un crible fonctionnel explorant les dix voies de signalisation les plus souvent impliquées en cancérologie, que la sous-expression de FAM110B entraîne l'inhibition de trois d'entre elles : TGF- β , Notch et Wnt (Figure 40). Une interaction entre FAM110B et la β -caténine ayant été démontrée dans notre équipe, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'implication de FAM110B dans la voie Wnt.

Nous avons montré que FAM110B intervient dans le métabolisme de la β -caténine et régule sa répartition subcellulaire. La sous-expression de FAM110B dans les cellules HeLa entraîne une augmentation du niveau protéique de la β -caténine (Figure 35). L'augmentation du niveau de β -caténine est souvent associée à une diminution de sa dégradation par le protéasome 26S qui nécessite au préalable sa phosphorylation par la kinase GSK3 β [Cadigan and Peifer 2009]. D'une façon intéressante, nous avons montré que les cellules sous-exprimant FAM110B présentent non seulement une diminution de la GSK3 β , mais également une augmentation de sa forme inactive GSK3 β -S9 (Figure 37). Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation de la β -caténine dans les cellules déficientes en FAM110B résulte d'une inhibition de sa phosphorylation, ce que nous avons voulu contrôler. Mais, l'anticorps monoclonal dirigé contre la forme active de la β -caténine phosphorylée sur les résidus sérines 33 et 37 n'a pas permis de mettre en évidence cette forme de la protéine dans les cellules contrôle. Il nous faudra, par conséquent, confirmer la diminution de la forme phosphorylée de la β -caténine en testant d'autres anticorps. L'inactivation de la GSK3 β entraîne habituellement une accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme, suivie de sa translocation dans le noyau où elle interagit avec les facteurs TCF/LEF activant la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire tels que

cycline D1 [Takayasu et al. 2001], c-Jun [Saadeddin et al. 2009], c-Myc [He et al. 1998] ou VEGF [Dilek et al. 2010]. Dans les cellules HeLa, la sous-expression de FAM110B entraîne une diminution de la fraction nucléaire de la β -caténine (Figure 39) correspondant à une diminution de son activité nucléaire qui se traduit à la fois par une diminution de l'expression de c-myc et de la prolifération cellulaire (Figure 38 et 27). Ces résultats sont en faveur du caractère potentiellement oncogénique de FAM110B et souligne le rôle que pourrait avoir le ciblage de cette protéine en cancérologie.

Le crible du double hybride chez la levure a permis d'identifier un certain nombre de protéines potentiellement partenaires de FAM110B (Tableau VIII). Parmi ces protéines, la protéine 14.3.3 ϵ est la plus fréquemment retrouvée et nous avons validé par immunoprécipitation cette interaction dans les cellules HeLa (Figure 48). La protéine 14.3.3 ϵ est impliquée dans plusieurs mécanismes vitaux tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose, la réparation des dommages à l'ADN [Choi et al. 2011; Hermeking 2003; Okumura et al. 2005; Ravi et al.; Tzivion et al. 2001]. Les protéines 14.3.3 ont la capacité de réguler la fonction de leurs cibles en modulant leur activité, leur capacité d'interagir avec d'autres protéines ou en modifiant leur localisation subcellulaire [Bridges and Moorhead 2005; Tzivion et al. 2001]. L'interaction des protéines 14.3.3 avec leur cible peut empêcher l'interaction de cette dernière avec d'autres protéines en masquant un motif phosphorylé. C'est le cas de la protéine IRS-1 « *Insulin receptor substrate-1* » : la liaison d'un dimère de 14.3.3 à IRS-1 diminue sa capacité à recruter et activer la PI3K « *phosphatidyl-inositol-3 kinase* » [Chung et al. 2009; Kosaki et al. 1998]. Les protéines 14.3.3 peuvent également permettre l'interaction de deux protéines cibles. C'est le cas de la protéine kinase C zeta (PKC ζ) et de la protéine codée par le proto-oncogène Raf qui peut ainsi être activé [Van Der Hoeven et al. 2000]. C'est aussi le cas de la déacétylase SIR-2.1 et du facteur de transcription DAF-16 chez *C. elegans* qui forment ainsi un complexe activant des gènes de réponse au stress [Berdichevsky et al. 2006]. L'interaction des protéines 14.3.3 avec leurs partenaires peut aussi avoir pour fonction de les préserver d'une déphosphorylation et d'une protéolyse. Enfin, la liaison d'un dimère de protéines 14.3.3 avec son partenaire peut modifier la localisation subcellulaire de celui-ci [Muslin and Xing 2000]. En effet, le dimère peut masquer la séquence signal de sa cible et l'empêcher ainsi de parvenir à son site d'action. Il existe plusieurs exemples de

translocation de certains ligands nucléaires des protéines 14.3.3 suivie de leur rétention dans le cytoplasme. Ainsi, la protéine 14.3.3 contrôle la distribution intracellulaire de la phosphatase Cdc25C et de la kinase Chk1, impliquées dans le cycle cellulaire, et participe à la régulation d'un point de contrôle de mitose [Dunaway et al. 2005; Lopez-Girona et al. 1999]. De la même façon, les protéines 14.3.3 participent à l'inhibition de l'activité des facteurs de transcription de la famille Forkhead, FKHRL1 pour les mammifères et DAF-16 pour *C. elegans*, en les séquestrant dans le cytoplasme [Brunet et al. 1999; Cahill et al. 2001]. Les différentes fonctions des protéines 14.3.3 leur permettent donc de réguler activement le rôle de leurs cibles, d'autant plus qu'elles peuvent exercer plusieurs effets sur le même partenaire pour influencer sa fonction.

Comme nous l'avons démontré, la mutation de FAM110B au niveau des sites d'interaction avec 14.3.3 ϵ entraîne une relocalisation des formes mutées dans le noyau (Figure 50). Ceci suggère que la localisation subcellulaire de FAM110B dépend, au moins en partie, de son état de phosphorylation. Nous rappellerons que deux kinases, les caséines kinase 1 δ et ϵ , ont également été identifiées comme partenaires potentiels de FAM110B par notre crible de double hybride. Il serait intéressant de valider cette interaction dans des cellules eucaryotes par la technique d'immunoprécipitation. Nous pourrions également étudier l'intervention de ces kinases dans la phosphorylation des résidus sérine (S255/261; S301/312).

Des études récentes ont montré que 14.3.3 ϵ intervient, en coopération avec la protéine Chibby (Cby) dans la translocation de la β -caténine du noyau vers le cytoplasme [Li et al. 2009a; Li et al. 2008; Takemaru et al. 2009]. Etant donné les interactions de FAM110B avec la β -caténine et 14.3.3 ϵ , il est possible d'envisager un mécanisme dans lequel FAM110B phosphorylée (au niveau des sérines S255/261 et S301/312) serait séquestrée dans le cytoplasme par suite de son interaction avec 14.3.3 ϵ . A l'inverse, l'absence d'interaction avec 14.3.3 ϵ liée à une réduction du niveau de phosphorylation de FAM110B favoriserait son interaction avec la β -caténine et permettrait la translocation de cette dernière dans le noyau, une hypothèse que nous sommes en train de vérifier en étudiant l'interaction des formes mutées de FAM110B avec la β -caténine par immunoprécipitation. Si cette hypothèse est vraie, il reste à déterminer par quel mécanisme la translocation de ces protéines au noyau s'effectue, puisqu'aucune d'entre elles ne possède de séquence d'adressage au noyau. Ayant identifié la nucléoporine comme interagant de FAM110B par double-hybride (Tableau VIII), une possibilité est

que cette translocation repose sur cette interaction. En effet, les protéines de la famille des nucléoporines sont les constituants majeurs des complexes du pore nucléaire des cellules eucaryotes. Elles sont impliquées dans le transport bilatéral des ARN messagers ou des protéines du noyau vers le cytoplasme [Imamoto 2006]. Il serait donc intéressant d'étudier l'existence d'un éventuel complexe ternaire entre FAM110B/ β -caténine et la nucléoporine et d'étudier également l'effet de la répression de cette dernière sur le trafic nucléo-cytoplasmique de la β -caténine.

Une autre partie de la caractérisation de FAM110B a reposé sur l'observation du changement de morphologie des cellules dans lesquelles FAM110B est sous-exprimée. Ces cellules acquièrent une forme allongées amiboïdes rappelant la structure des cellules fibroblastiques ou mésenchymateuses (Figure 29). Plusieurs études corrélient ce changement de forme à une modulation de leur potentiel migratoire et invasif [Godde et al. 2010; Gos et al. 2009]. En utilisant deux tests fonctionnels de motilité cellulaire, le test de blessure (*scratch test*) et la migration en chambre de Boyden, nous avons montré que les cellules sous-exprimant FAM110B migrent beaucoup moins que les cellules contrôle (Figure 30). Ce résultat majeur témoigne du rôle de FAM110B dans la migration cellulaire. Au niveau moléculaire, l'utilisation de différentes approches *Microarray*, Western Blot et immunofluorescence, révèle que la répression de FAM110B engendre une modulation de l'expression des E- et N-cadhérines, deux protéines qui jouent justement un rôle crucial dans les processus de migration et d'adhésion cellulaire ainsi que dans les interactions cellules-cellules [Gravdal et al. 2007]. Dans les cellules où l'expression de FAM110B est réprimée, nous notons une surexpression de la E-cadhérine associée à une répression de la N-cadhérine (Tableau VII, figure 32 et 33). Cette altération ou « *switch* » est associée au processus de transitions et explique l'inhibition du potentiel migratoire des cellules qui passent d'un état mésenchymateux (E-cadhérine réduite/N-cadhérine élevée) à un état épithélial (E-cadhérine élevée/N-cadhérine réduite) [Gravdal et al. 2007]. Cette altération du niveau d'expression de la E-cadhérine est souvent lié à un contrôle au niveau transcriptionnel par les nombreux répresseurs tels que Snail et Slug, ZEB1 et ZEB2 ou Twist et E47 qui se fixent au niveau de séquences spécifiques dans le promoteur du gène [Peinado et al. 2007]. Parmi eux, Snail (SNAI1) et Slug (SNAI2) sont les plus étudiés. Dans les cellules HeLa, FAM110B régule l'expression de la E-cadhérine par l'intermédiaire de Slug et non de Snail (Figure 34). Dans les cellules en voie de prolifération, l'expression

de Slug est régulée par la fixation du complexe β -caténine/TCF sur la région promotrice de son gène engendrant l'inhibition de la transcription de la E-cadhérine [Conacci-Sorrell et al. 2003]. Ainsi dans les cellules sousexprimant FAM110B, la diminution de l'activité nucléaire de la β -caténine est accompagnée par une diminution de la transcription de Slug, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du niveau d'expression de la E-cadhérine et la diminution des capacités migratoires des cellules.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus nous ont amenés à proposer un modèle de la régulation du niveau de la E-cadhérine et de la localisation de la β -caténine par FAM110B (Figure 55). Dans ce modèle, la réduction du niveau de phosphorylation de FAM110B au niveau des sérines S255/261 et S301/312, résulterait en une inhibition de l'interaction entre FAM110B et 14.3.3 ϵ , ce qui favoriserait son association avec la β -caténine cytoplasmique, permettant la relocalisation de cette dernière vers le noyau. Le passage de ce complexe dans le noyau reposerait sur son interaction avec la nucléopore. La β -caténine nucléaire, jouerait son rôle d'activateur de gènes comme c-myc dont l'expression est indispensable à la prolifération cellulaire ou Slug qui, lorsqu'il est exprimé, inhibe l'expression de la E-cadhérine. A l'inverse, la protéine 14.3.3 ϵ , en association avec la protéine Chibby et la β -caténine préalablement phosphorylées par Akt, participerait au transport de la β -caténine du noyau vers le cytoplasme. Elle serait ensuite soit dégradée par le protéasome, soit séquestrée par la E-cadhérine au niveau membranaire dans les jonctions intracellulaires.

De plus, nous avons montré que FAM110B joue un rôle important dans la migration cellulaire lié, au moins en partie, à sa capacité à moduler l'expression de la E-cadhérine impliquant la régulation de l'un de ses répresseurs, Slug. L'augmentation de l'expression de la E-cadhérine est fréquemment rencontrée lors des phénomènes de reverse EMT (transition de l'état mésenchymateux vers l'état épithélial). Dans les cellules cancéreuses humaines HeLa, la sousexpression de FAM110B induit à la fois une diminution de leur prolifération qui est associée à une plus faible capacité de migration et d'invasion. Ce rôle de FAM110B en cancérologie a été décrit dans une étude récente [Vainio et al. 2011] dans laquelle les auteurs ont démontré, dans des cellules cancéreuses prostatiques, LNCaP, caractérisées par leur agressivité métastatique, que le niveau d'ARNm de FAM110B est plus élevé que celui des cellules saines. De plus, la sousexpression de FAM110B dans la lignée LNCaP induit une diminution de la prolifération cellulaire associée à une augmentation de la mortalité des

cellules par apoptose [Vainio et al. 2011]. A l'inverse, l'expression ectopique de FAM110B favorise la prolifération cellulaire dans ces cellules [Hauge et al. 2007]. Ces résultats sont en parfait accord avec nos observations et suggèrent que FAM110B pourrait être utilisée comme nouvelle cible en cancérologie.

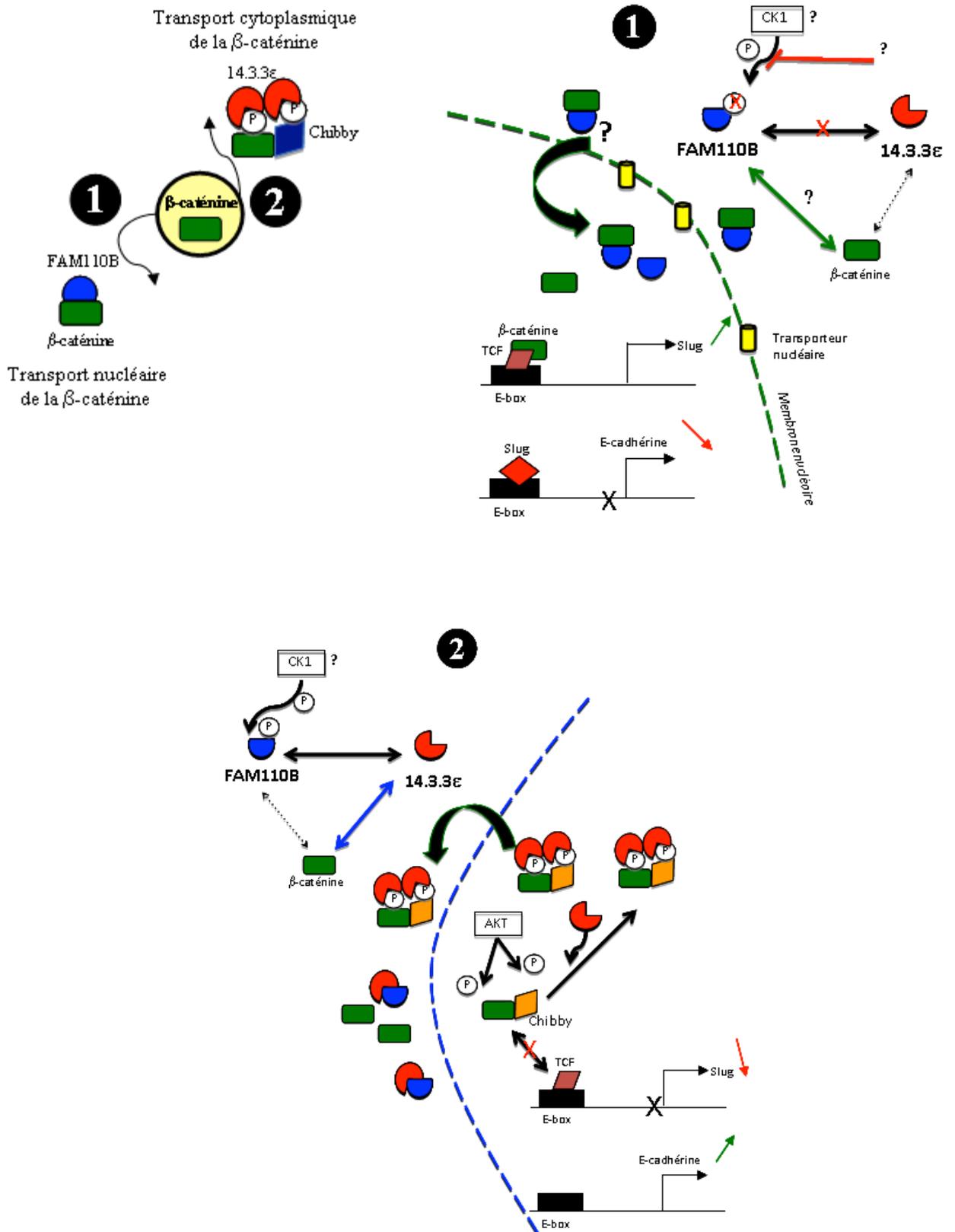


Figure 55: Modèle d'interaction de FAM110B avec les protéines 14.3.3ε et β-caténine et leurs conséquences potentielles sur la régulation de l'expression de la E-cadhérine et de la localisation de la β-caténine (Voir texte pour détails).

Outre son rôle potentiel dans la migration et la prolifération cellulaire que nous avons mis en évidence, nous avons également montré que FAM110B régulateur la réponse cellulaire aux inhibiteurs de Topoisomérases. Nous avons montré que la réduction du niveau d'expression de FAM110B dans des cellules HeLa engendrait une hypersensibilité à la CPT (Figure 51). Cette hypersensibilité n'est pas accompagnée d'un changement du nombre de complexes ADN-Topo1 par rapport aux cellules contrôle (Figure 52), ce qui suggère que la différence de sensibilité est liée à des événements post-complexes. L'hypothèse la plus vraisemblable est qu'à même nombre de complexes stabilisés par la CPT, plus de cassures double-brin cytotoxiques sont produites dans les cellules où FAM110B est réprimée. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la cytotoxicité de la CPT dépend de la réplication de l'ADN [Pommier et al. 1998] et que justement la réduction du niveau de FAM110B est accompagnée d'un blocage des cellules en phase S du cycle cellulaire, ce qui augmente la probabilité de collisions entre les fourches de réplication et le complexe stabilisé par la CPT (Figure 28). Nous vérifierons cette hypothèse en comparant le niveau de cassures double-brin entre les cellules contrôle et les cellules réprimées pour FAM110B en évaluant un marqueur de cassures double brin, H2AX qui est massivement phosphorylée et se localise à proximité de la lésion, sur une région estimée à deux mégabases de part et d'autre de la cassure [Rogakou et al. 1998]. D'autres marqueurs comme p53 ou p21 pourront être également mesurés. La surexpression de p21 est une réponse classiquement observée à la suite d'un stress cellulaire provoquant des dommages à l'ADN [Garner and Raj 2008; Gartel and Radhakrishnan 2005; Ju et al. 2007; Nath 2005; Niculescu et al. 1998]. Elle contribue à l'arrêt du cycle cellulaire, nécessaire à la réparation des lésions. En réponse à la CPT, p21 peut aussi bien induire l'apoptose que la réprimer en induisant le processus de sénescence [Fujiwara et al. 2008; Gartel and Tyner 2002; Han et al. 2002; Roninson 2003; Roninson et al. 2001].

Contrairement aux résultats obtenus pour la CPT, nous avons observé que la diminution de l'expression de FAM110B induit une résistance à deux inhibiteurs de Topo2 (la 9-OHE et l'étoposide) (Figure 52). Ces résultats confirment les données obtenues lors du crible fonctionnel ayant conduit à l'identification de FAM110B, puisque le GSE13 (issu de FAM110B) confère bien une résistance à la 9-OHE ainsi qu'à l'étoposide en inhibant la fonction de FAM110B par un effet dominant négatif [Gros et al. 2003]. Après traitement à l'étoposide, le nombre de complexe de clivage ADN-Topo2 (α et β) diminue fortement dans les cellules où l'expression de FAM110B

est réduite comparé aux cellules contrôle. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de ce phénomène. Une possibilité est que la réduction de FAM110B ait un effet sur le transport et/ou le métabolisme du médicament dont l'altération a un effet direct sur la stabilisation des complexes. Une autre possibilité est que la réduction de FAM110B ait un effet direct ou indirect sur la quantité et/ou l'activité de la Topo2, conduisant à une diminution du nombre de ces complexes.

Nous avons en premier lieu testé l'hypothèse simple que la diminution de FAM110B entraînait une diminution de la quantité de Topo2, ce qui est effectivement le cas pour la Topo2 α dont le niveau est réduit d'environ 80% par rapport aux cellules contrôle (Figure 53). Cette réduction du niveau de Topo2 peut-être liée à une diminution de son expression ou à une augmentation de sa dégradation [Kang and Chung 2002; Le Mee et al. 2000; Matsumoto et al. 1997; Morgan et al. 2000; Son et al. 1998]. Une autre possibilité, non mutuellement exclusive, est que la diminution de FAM110B entraîne une inhibition de l'activité catalytique de la Topo2. Ce type d'altération a souvent été mis en cause pour expliquer la résistance aux inhibiteurs de Topo2 [Beck et al. 1993; Burgess et al. 2008; Huang et al. 2007a; Kurz et al. 2000]. Cette activité dépend étroitement de l'état de phosphorylation de l'enzyme par la caséine kinase 2 [Bojanowski et al. 1993; Dang et al. 1994] ou la protéine kinase C [Wells et al. 1995]. Par ailleurs, l'activité de la Topo2 est maximale pendant la phase G2M du cycle cellulaire [Burden et al. 1993; Saijo et al. 1992; Wells and Hickson 1995]. D'autres protéines sont aussi impliquées dans la régulation de l'activité catalytique de la Topo2 telles que les facteurs de transcription CREB, ATF-2 et c-jun qui stimulent la décaténation de l'ADN [Kroll et al. 1993] ou la protéine pRB qui inhibe son activité de décaténation [Bhat et al. 1999]. De manière intéressante, des études ont montré que les deux partenaires de FAM110B, 14.3.3 ϵ et β -caténine sont aussi impliqués dans la régulation de l'activité catalytique de la Topo2.

Une étude a montré que la Topo2 préalablement phosphorylée par la CK2 sur les résidus sérines 1080/1088 interagissait spécifiquement avec 14.3.3 ϵ [Kurz et al. 2000]. Dans cette étude, les auteurs ont démontré en utilisant un test « comet » dans des cellules HL-60 traitées à l'étoposide, que la surexpression de 14.3.3 ϵ conduisait à une diminution de l'endommagement à l'ADN liée à une diminution de fixation de la Topo2 sur son substrat et une diminution concomitante du nombre de complexe stabilisés par l'étoposide. Une des hypothèses que nous pouvons proposer est que l'interaction de

FAM110B avec 14.3.3ε au niveau cytoplasmique permet de réguler son interaction avec la Topo2 au niveau nucléaire. Ainsi, la diminution de la quantité de FAM110B permettrait à une quantité plus importante de protéine 14.3.3ε d'être délocalisée dans le noyau pour interagir avec la Topo2 et inhiber la stabilisation des complexes par l'étoposide. Afin de vérifier cette hypothèse, nous envisageons d'étudier la localisation subcellulaire de 14.3.3ε dans les conditions où FAM110B est diminuée. Nous devrions également observer que la surexpression de FAM110B conduise à une hypersensibilité des cellules aux inhibiteurs de Topo2.

Une autre hypothèse pourrait être que FAM110B, qui est également présente au niveau nucléaire, bien qu'en quantité moindre, puisse en association avec 14.3.3ε jouer un rôle de stabilisation de la Topo2. Dans ce sens, nous avons mis en évidence une interaction de la Topo2α avec FAM110B dans des lysats totaux de cellules HeLa (non montrés), mais ce résultat très préliminaire ne nous permet pas pour l'instant de confirmer une telle hypothèse. Des immunoprécipitations à l'aide d'extraits nucléaires permettraient déjà de préciser le niveau d'interaction de ces protéines dans ce compartiment.

La β-caténine est également connue pour interagir avec la Topo2 au niveau d'une région délimitée par les acides aminés 951 à 1301, et conduire à une augmentation de l'activité catalytique de l'enzyme [Huang et al. 2007a]. Le traitement des cellules HeLa par des doses croissantes d'inhibiteurs de Topo2 (merbarone et étoposide) montre qu'en absence de la β-caténine, l'activité catalytique de l'enzyme diminue considérablement alors qu'elle est maximale quand la β-caténine est présente [Huang et al. 2007a]. Les auteurs montrent aussi que l'interaction entre ces deux protéines joue un rôle important dans l'activation du complexe de transcription β-caténine/TCF4 indispensable pour l'activation des gènes de survie cellulaire. Dans ce cadre, une diminution de la fraction nucléaire de la β-caténine, dont l'expression est essentielle à l'activité de la Topo2, pourrait expliquer, au moins en partie, la résistance à l'étoposide des cellules présentant une réduction de l'expression de FAM110B.

Afin de déterminer si FAM110B pouvait avoir un rôle plus global dans la réponse au stress, nous avons étendu notre étude à d'autres agents anticancéreux que les inhibiteurs de Topoisomérases. Les premiers résultats obtenus montrent que les cellules sousexprimant FAM110B sont résistantes aux inhibiteurs de tubulines, vincristine (inhibiteur de polymérisation) et taxol (inhibiteur de dépolymérisation) et qu'à l'inverse,

elles sont plus sensibles au cis-platine que les cellules contrôle (Figure 54). Ces résultats confirment le rôle assez large de FAM110B dans la réponse aux différents stress conduisant à une dérégulation de la prolifération cellulaire.

En cela, FAM110B représente une nouvelle cible potentielle intéressante en cancérologie dont le ciblage permettrait d'inhiber la croissance cellulaire et/ou la migration mais pourrait aussi servir à potentialiser l'action de certains médicaments comme les inhibiteurs de Topo1 ou les dérivés du platine largement utilisés en clinique.

CONCLUSION

Malgré les progrès thérapeutiques considérables réalisés ces dernières années, le cancer est encore considéré comme un véritable problème de santé publique. A un stade d'évolution avancé, l'impossibilité de recourir à la chirurgie, oriente vers une chimiothérapie dont l'efficacité reste encore limitée par le problème de résistance dont les causes sont multifactorielles. Dans le but de rechercher de nouveaux gènes impliqués dans la sensibilité aux inhibiteurs de Topo2, le laboratoire a identifié le gène FAM110B dont la répression conduit à une résistance à cette classe de médicaments. La caractérisation de ce gène a permis d'obtenir un certain nombre de résultats montrant clairement son caractère essentiel dans la survie et la prolifération cellulaire. Au cours de ce travail nous avons également pu identifier un certain nombre de partenaires potentiels de FAM110B, dont la β -caténine et la protéine 14.3.3 ϵ qui sont également impliqués dans plusieurs voies régulant la prolifération cellulaire. De plus, nous avons montré que FAM110B est impliquée dans la migration cellulaire en régulant directement ou indirectement l'expression d'un de ses répresseurs, Slug. L'augmentation de l'expression de la E-cadhérine dans des cellules sous-exprimant FAM110B est accompagnée d'une diminution de l'expression de la N-cadhérine, un phénomène qui est fréquemment observé lors de la reverse EMT, passage d'un stade mésenchymateux à un stade épithélial au cours duquel des cellules à caractère invasif et métastatique acquièrent des propriétés adhésives associées à une perte de leur propriétés de migration et d'invasion.

Enfin, nous avons pu démontrer que FAM110B est également impliquée dans la sensibilité cellulaire à divers agents anticancéreux. Sa répression induit une sensibilisation à la camptothécine et au cisplatine alors qu'elle confère une résistance aux poisons de tubuline (taxol et vincristine) et aux inhibiteurs de Topo2. Cette dernière est accompagnée d'une diminution du nombre de complexes de clivage ADN-enzyme associée à une réduction du niveau de Topo2 dont il faudra préciser le mécanisme.

L'ensemble de ces résultats conduisent à penser que FAM110B peut être considérée comme une nouvelle cible potentielle en cancérologie et son inhibition être utilisée pour potentialiser l'action de thérapeutiques existantes tels que les dérivés de la camptothécine ou les dérivés du platine qui sont largement utilisés en clinique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adachi N, Miyaike M, Kato S, Kanamaru R, Koyama H, Kikuchi A: Cellular distribution of mammalian DNA topoisomerase II is determined by its catalytically dispensable C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3135-42.
- Adachi N, So S, Iizumi S, Nomura Y, Murai K, Yamakawa C, Miyagawa K, Koyama H: The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. *DNA Cell Biol.* 2006;25:19-24.
- Adachi N, Suzuki H, Iizumi S, Koyama H: Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *J Biol Chem.* 2003;278:35897-902. Epub 2003 Jul 3.
- Agostinho M, Santos V, Ferreira F, Costa R, Cardoso J, Pinheiro I, Rino J, Jaffray E, Hay RT, Ferreira J: Conjugation of human topoisomerase 2 alpha with small ubiquitin-like modifiers 2/3 in response to topoisomerase inhibitors: cell cycle stage and chromosome domain specificity. *Cancer Res.* 2008;68:2409-18.
- Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I: Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 2002;16:1066-76.
- Andl CD, Rustgi AK: No one-way street: cross-talk between e-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling: a mechanism to regulate RTK activity. *Cancer Biol Ther.* 2005;4:28-31. Epub 2005 Jan 15.
- Aratani Y, Andoh T, Koyama H: Effects of DNA topoisomerase inhibitors on nonhomologous and homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res.* 1996;362:181-91.
- Arnaudeau C, Lundin C, Helleday T: DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol.* 2001;307:1235-45.
- Asgeirsson KS, Olafsdottir K, Jonasson JG, Ogmundsdottir HM: The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer. *Cytokine.* 1998;10:720-8.
- Ashihara E: [RNA interference for cancer therapies]. *Gan*;37:2033-41.
- Auerkari EI: Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2006;42:5-13. Epub 2005 Jun 22.
- Austin CA, Sng JH, Patel S, Fisher LM: Novel HeLa topoisomerase II is the II beta isoform: complete coding sequence and homology with other type II topoisomerases. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1172:283-91.

- Azarova AM, Lyu YL, Lin CP, Tsai YC, Lau JY, Wang JC, Liu LF: Roles of DNA topoisomerase II isozymes in chemotherapy and secondary malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:11014-9. Epub 2007 Jun 19.
- Barbera MJ, Puig I, Dominguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiro S, Baulida J, Franci C, Dedhar S, Larue L, Garcia de Herreros A: Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene*. 2004;23:7345-54.
- Barrallo-Gimeno A, Nieto MA: The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 2005;132:3151-61.
- Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A: The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2000;2:84-9.
- Beck WT, Danks MK, Wolverson JS, Kim R, Chen M: Drug resistance associated with altered DNA topoisomerase II. *Adv Enzyme Regul* 1993;33:113-27.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W: Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. 1996;382:638-42.
- Berdichevsky A, Viswanathan M, Horvitz HR, Guarente L: *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell*. 2006;125:1165-77.
- Beretta GL, Perego P, Zunino F: Targeting topoisomerase I: molecular mechanisms and cellular determinants of response to topoisomerase I inhibitors. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12:1243-56.
- Berx G, Becker KF, Hofler H, van Roy F: Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* 1998a;12:226-37.
- Berx G, Nollet F, van Roy F: Dysregulation of the E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell Adhes Commun* 1998b;6:171-84.
- Berx G, Van Roy F: The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001;3:289-93.
- Bhat UG, Raychaudhuri P, Beck WT: Functional interaction between human topoisomerase IIalpha and retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:7859-64.
- Biason P, Masier S, Toffoli G: UGT1A1*28 and other UGT1A polymorphisms as determinants of irinotecan toxicity. *J Chemother*. 2008;20:158-65.

- Birchmeier W, Behrens J: Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1198:11-26.
- Bojanowski K, Filhol O, Cochet C, Chambaz EM, Larsen AK: DNA topoisomerase II and casein kinase II associate in a molecular complex that is catalytically active. *J Biol Chem*. 1993;268:22920-6.
- Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A: The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci*. 2003;116:499-511.
- Bowman KJ, Newell DR, Calvert AH, Curtin NJ: Differential effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II inhibitor cytotoxicity in L1210 cells in vitro. *Br J Cancer*. 2001;84:106-12.
- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T: beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol*. 1999;155:1033-8.
- Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM: The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;213:123-61.
- Brannon M, Gomperts M, Sumoy L, Moon RT, Kimelman D: A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev*. 1997;11:2359-70.
- Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W: Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*. 2006;16:51-9. Epub 2005 Dec 27.
- Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W: Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev*. 2004;18:2225-30. Epub 2004 Sep 1.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM: bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*. 2003;113:25-36.
- Bridges D, Moorhead GB: 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE*. 2005;2005:re10.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME: Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96:857-68.

- Burden DA, Goldsmith LJ, Sullivan DM: Cell-cycle-dependent phosphorylation and activity of Chinese-hamster ovary topoisomerase II. *Biochem J.* 1993;293:297-304.
- Burgess DJ, Doles J, Zender L, Xue W, Ma B, McCombie WR, Hannon GJ, Lowe SW, Hemann MT: Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:9053-8.
- Cadigan KM, Peifer M: Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1:a002881.
- Cahill CM, Tzivion G, Nasrin N, Ogg S, Dore J, Ruvkun G, Alexander-Bridges M: Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways. *J Biol Chem.* 2001;276:13402-10. Epub 2000 Dec 20.
- Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Neto FA, Rainho CA, Rogatto SR: CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC Cancer.* 2006;6:48.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA: The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000;2:76-83.
- Cardellini E, Bramucci M, Gianfranceschi GL, Durban E: Human topoisomerase I is phosphorylated in vitro on its amino terminal domain by protein kinase NII. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994;375:255-9.
- Cardellini E, Durban E: Phosphorylation of human topoisomerase I by protein kinase C in vitro and in phorbol 12-myristate 13-acetate-activated HL-60 promyelocytic leukaemia cells. *Biochem J* 1993;291:303-7.
- Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G: Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett.* 2002;176:123-8.
- Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Roose J, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M, Bejsovec A: Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature.* 1998;395:604-8.
- Champoux JJ: Mechanism of catalysis by eukaryotic DNA topoisomerase I. *Adv Pharmacol* 1994;71-82.
- Champoux JJ: DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 2001;70:369-413.
- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 2004;303:83-6. Epub 2003 Dec 4.

- Chene P, Rudloff J, Schoepfer J, Furet P, Meier P, Qian Z, Schlaeppli JM, Schmitz R, Radimerski T: Catalytic inhibition of topoisomerase II by a novel rationally designed ATP-competitive purine analogue. *BMC Chem Biol.* 2009;9:1.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S: The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:9578-82.
- Chikamori K, Grabowski DR, Kinter M, Willard BB, Yadav S, Aebersold RH, Bukowski RM, Hickson ID, Andersen AH, Ganapathi R, Ganapathi MK: Phosphorylation of serine 1106 in the catalytic domain of topoisomerase II alpha regulates enzymatic activity and drug sensitivity. *J Biol Chem.* 2003;278:12696-702. Epub 2003 Feb 4.
- Choi JE, Hur W, Jung CK, Piao LS, Lyoo K, Hong SW, Kim SW, Yoon HY, Yoon SK: Silencing of 14-3-3zeta over-expression in hepatocellular carcinoma inhibits tumor growth and enhances chemosensitivity to cis-diammined dichloridoplatinum. *Cancer*;303:99-107. Epub 2011 Feb 22.
- Christmann M, Tomicic MT, Gestrich C, Roos WP, Bohr VA, Kaina B: WRN protects against topo I but not topo II inhibitors by preventing DNA break formation. *DNA Repair (Amst).* 2008;7:1999-2009. Epub 2008 Oct 15.
- Christofori G, Semb H: The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* 1999;24:73-6.
- Chung JJ, Okamoto Y, Coblitz B, Li M, Qiu Y, Shikano S: PI3K/Akt signalling-mediated protein surface expression sensed by 14-3-3 interacting motif. *Febs J.* 2009;276:5547-58. Epub 2009 Aug 19.
- Classen S, Olland S, Berger JM: Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10629-34. Epub 2003 Sep 8.
- Clevers H: Inflating cell numbers by Wnt. *Mol Cell.* 2002;10:1260-1.
- Cliby WA, Lewis KA, Lilly KK, Kaufmann SH: S phase and G2 arrests induced by topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function. *J Biol Chem.* 2002;277:1599-606. Epub 2001 Nov 7.
- Cliffe A, Hamada F, Bienz M: A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Curr Biol.* 2003;13:960-6.
- Come C, Arnoux V, Bibeau F, Savagner P: Roles of the transcription factors snail and slug during mammary morphogenesis and breast carcinoma progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2004;9:183-93.

- Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschuere K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F: The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell*. 2001;7:1267-78.
- Comoglio PM, Boccaccio C, Trusolino L: Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:565-71.
- Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A: Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol*. 2003;163:847-57. Epub 2003 Nov 17.
- Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A: The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest*. 2002;109:987-91.
- Cortes Ledesma F, El Khamisy SF, Zuma MC, Osborn K, Caldecott KW: A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature*. 2009;461:674-8.
- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM: The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*. 1999;18:2883-91.
- Czubaty A, Girstun A, Kowalska-Loth B, Trzcinska AM, Purta E, Winczura A, Grajkowski W, Staron K: Proteomic analysis of complexes formed by human topoisomerase I. *Biochim Biophys Acta* 2005;1749:133-41.
- D'Souza B, Taylor-Papadimitriou J: Overexpression of ERBB2 in human mammary epithelial cells signals inhibition of transcription of the E-cadherin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:7202-6.
- Dang Q, Alghisi GC, Gasser SM: Phosphorylation of the C-terminal domain of yeast topoisomerase II by casein kinase II affects DNA-protein interaction. *J Mol Biol*. 1994;243:10-24.
- De Craene B, van Roy F, Berx G: Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal*. 2005;17:535-47.
- de las Alas MM, Los G, Lin X, Kurdi-Haidar B, Manorek G, Howell SB: Identification of transdominant-negative genetic suppressor elements derived from hMSH2 that mediate resistance to 6-thioguanine. *Mol Pharmacol*. 2002;62:1198-206.
- Delaporte C, Gros L, Frey S, Cocard D, Cavarec L, Dubar A, Gudkov A, Jacquemin-Sablon A: Selection of genetic suppressor elements conferring resistance to DNA topoisomerase II inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* 1999;886:187-90.
- Deng C, Brown JA, You D, Brown JM: Multiple endonucleases function to repair covalent topoisomerase I complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2005;170:591-600. Epub 2005 Apr 16.

- Dilek FH, Topak N, Tokyol C, Akbulut G, Dilek ON: beta-Catenin and its relation to VEGF and cyclin D1 expression in pT3 rectosigmoid cancers. *Turk*;21:365-71.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA: Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355:2408-17.
- Dunaway S, Liu HY, Walworth NC: Interaction of 14-3-3 protein with Chk1 affects localization and checkpoint function. *J Cell Sci*. 2005;118:39-50. Epub 2004 Dec 7.
- Durban E, Goodenough M, Mills J, Busch H: Topoisomerase I phosphorylation in vitro and in rapidly growing Novikoff hepatoma cells. *Embo J* 1985;4:2921-6.
- Dusre L, Mimnaugh EG, Myers CE, Sinha BK: Potentiation of doxorubicin cytotoxicity by buthionine sulfoximine in multidrug-resistant human breast tumor cells. *Cancer Res*. 1989;49:511-5.
- Duyndam MC, van Berkel MP, Dorsman JC, Rockx DA, Pinedo HM, Boven E: Cisplatin and doxorubicin repress Vascular Endothelial Growth Factor expression and differentially down-regulate Hypoxia-inducible Factor I activity in human ovarian cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2007;74:191-201. Epub 2007 Apr 6.
- Easwaran V, Lee SH, Inge L, Guo L, Goldbeck C, Garrett E, Wiesmann M, Garcia PD, Fuller JH, Chan V, Randazzo F, Gundel R, Warren RS, Escobedo J, Aukerman SL, Taylor RN, Fantl WJ: beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res*. 2003;63:3145-53.
- Elliott AM, Al-Hajj MA: ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome. *Mol Cancer Res*. 2009;7:79-87.
- Fields S, Song O: A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. 1989;340:245-6.
- Flatten K, Dai NT, Vroman BT, Loegering D, Erlichman C, Karnitz LM, Kaufmann SH: The role of checkpoint kinase 1 in sensitivity to topoisomerase I poisons. *J Biol Chem*. 2005;280:14349-55. Epub 2005 Feb 7.
- Fodde R, Brabletz T: Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19:150-8. Epub 2007 Feb 16.
- Forterre P, Gribaldo S, Gadelle D, Serre MC: Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*. 2007;89:427-46. Epub 2007 Jan 4.

- Fortune JM, Osheroff N: Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by blocking DNA cleavage. *J Biol Chem.* 1998;273:17643-50.
- Fujiwara K, Daido S, Yamamoto A, Kobayashi R, Yokoyama T, Aoki H, Iwado E, Shinojima N, Kondo Y, Kondo S: Pivotal role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in apoptosis and autophagy. *J Biol Chem.* 2008;283:388-97. Epub 2007 Oct 24.
- Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, Pilch DR, Rogakou EP, Celeste A, Chen HT, Nussenzweig A, Aladjem MI, Bonner WM, Pommier Y: Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 2003;278:20303-12.
- Ganapathi R, Constantinou A, Kamath N, Dubyak G, Grabowski D, Krivacic K: Resistance to etoposide in human leukemia HL-60 cells: reduction in drug-induced DNA cleavage associated with hypophosphorylation of topoisomerase II phosphopeptides. *Mol Pharmacol* 1996;50:243-8.
- Garner E, Raj K: Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. *Cell Cycle.* 2008;7:277-82. Epub 2007 Nov 18.
- Gartel AL, Radhakrishnan SK: Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res.* 2005;65:3980-5.
- Gartel AL, Tyner AL: The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2002;1:639-49.
- Gavert N, Sheffer M, Raveh S, Spaderna S, Shtutman M, Brabletz T, Barany F, Paty P, Notterman D, Domany E, Ben-Ze'ev A: Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res.* 2007;67:7703-12.
- Giles RH, van Es JH, Clevers H: Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1653:1-24.
- Gilroy KL, Leontiou C, Padget K, Lakey JH, Austin CA: mAMSA resistant human topoisomerase IIbeta mutation G465D has reduced ATP hydrolysis activity. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:1597-607. Print 2006.
- Godde NJ, Galea RC, Elsum IA, Humbert PO: Cell polarity in motion: redefining mammary tissue organization through EMT and cell polarity transitions. *J;*15:149-68. Epub 2010 May 12.
- Goldwasser F, Bae I, Valenti M, Torres K, Pommier Y: Topoisomerase I-related parameters and camptothecin activity in the colon carcinoma cell lines from the National Cancer Institute anticancer screen. *Cancer Res.* 1995;55:2116-21.

- Gos M, Miloszevska J, Przybyszewska M: [Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression]. *Postepy Biochem* 2009;55:121-8.
- Goswami A, Qiu S, Dexheimer TS, Ranganathan P, Burikhanov R, Pommier Y, Rangnekar VM: Par-4 binds to topoisomerase 1 and attenuates its DNA relaxation activity. *Cancer Res* 2008;68:6190-8.
- Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM: E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol*. 2001;153:1049-60.
- Gradl D, Kuhl M, Wedlich D: The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol*. 1999;19:5576-87.
- Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA: A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13:7003-11.
- Gros L, Delaporte C, Frey S, Decesse J, de Saint-Vincent BR, Cavarec L, Dubart A, Gudkov AV, Jacquemin-Sablon A: Identification of new drug sensitivity genes using genetic suppressor elements: protein arginine N-methyltransferase mediates cell sensitivity to DNA-damaging agents. *Cancer Res*. 2003;63:164-71.
- Hajra KM, Chen DY, Fearon ER: The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res*. 2002;62:1613-8.
- Han Z, Wei W, Dunaway S, Darnowski JW, Calabresi P, Sedivy J, Hendrickson EA, Balan KV, Pantazis P, Wyche JH: Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J Biol Chem*. 2002;277:17154-60. Epub 2002 Mar 4.
- Hande KR: Topoisomerase II inhibitors. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 2003;21:103-25.
- Harris TJ, Peifer M: Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends Cell Biol*. 2005;15:234-7.
- Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P: Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol*. 1998;8:573-81.
- Hauge H, Patzke S, Aasheim HC: Characterization of the FAM110 gene family. *Genomics*. 2007;90:14-27. Epub 2007 May 11.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM: A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435:828-33.

- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998;281:1509-12.
- Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F, Kemler R: The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *Embo J*. 2000;19:1839-50.
- Hermeking H: The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:931-43.
- Hinz JM, Helleday T, Meuth M: Reduced apoptotic response to camptothecin in CHO cells deficient in XRCC3. *Carcinogenesis* 2003;24:249-53.
- Hirano R, Interthal H, Huang C, Nakamura T, Deguchi K, Choi K, Bhattacharjee MB, Arimura K, Umehara F, Izumo S, Northrop JL, Salih MA, Inoue K, Armstrong DL, Champoux JJ, Takashima H, Boerkoel CF: Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy: consequence of a Tdp1 recessive neomorphic mutation? *Embo J*. 2007;26:4732-43. Epub 2007 Oct 18.
- Hirohashi S: Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*. 1998;153:333-9.
- Hlubek F, Jung A, Kotzor N, Kirchner T, Brabletz T: Expression of the invasion factor laminin gamma2 in colorectal carcinomas is regulated by beta-catenin. *Cancer Res*. 2001;61:8089-93.
- Hlubek F, Spaderna S, Jung A, Kirchner T, Brabletz T: Beta-catenin activates a coordinated expression of the proinvasive factors laminin-5 gamma2 chain and MT1-MMP in colorectal carcinomas. *Int J Cancer*. 2004;108:321-6.
- Hochhaus A, Schenk T, Erben P, Ernst T, La Rosee P, Muller MC: Cause and management of therapy resistance. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009;22:367-79.
- Holm C, Covey JM, Kerrigan D, Pommier Y: Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells. *Cancer Res*. 1989;49:6365-8.
- Horie K, Tomida A, Sugimoto Y, Yasugi T, Yoshikawa H, Taketani Y, Tsuruo T: SUMO-1 conjugation to intact DNA topoisomerase I amplifies cleavable complex formation induced by camptothecin. *Oncogene*. 2002;21:7913-22.
- Howe LR, Brown AM: Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther*. 2004;3:36-41. Epub 2004 Jan 14.
- Huang H, He X: Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20:119-25. Epub 2008 Mar 12.

- Huang L, Shitashige M, Satow R, Honda K, Ono M, Yun J, Tomida A, Tsuruo T, Hirohashi S, Yamada T: Functional interaction of DNA topoisomerase IIalpha with the beta-catenin and T-cell factor-4 complex. *Gastroenterology*. 2007a;133:1569-78. Epub 2007 Aug 6.
- Huang RY, Kowalski D, Minderman H, Gandhi N, Johnson ES: Small ubiquitin-related modifier pathway is a major determinant of doxorubicin cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res*. 2007b;67:765-72.
- Huber AH, Nelson WJ, Weis WI: Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*. 1997;90:871-82.
- Huber AH, Weis WI: The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*. 2001;105:391-402.
- Hubert P, Caberg JH, Gilles C, Bousarghin L, Franzen-Detrooz E, Boniver J, Delvenne P: E-cadherin-dependent adhesion of dendritic and Langerhans cells to keratinocytes is defective in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions. *J Pathol*. 2005;206:346-55.
- Imamoto N: [Nuclear pore complex: structure, components and function]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 2006;51:1937-42.
- Jacob DA, Mercer SL, Osheroff N, Dewese JE: Etoposide quinone is a redox-dependent topoisomerase II poison. *Biochemistry*. 2011;50:5660-7. Epub 2011 Jun 2.
- Jiang WG, Mansel RE: E-cadherin complex and its abnormalities in human breast cancer. *Surg Oncol*. 2000;9:151-71.
- Ju Z, Choudhury AR, Rudolph KL: A dual role of p21 in stem cell aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1100:333-44.
- Kang MR, Chung IK: Down-regulation of DNA topoisomerase IIalpha in human colorectal carcinoma cells resistant to a protoberberine alkaloid, berberrubine. *Mol Pharmacol*. 2002;61:879-84.
- Kapoor R, Slade DL, Fujimori A, Pommier Y, Harker WG: Altered topoisomerase I expression in two subclones of human CEM leukemia selected for resistance to camptothecin. *Oncol Res* 1995;7:83-95.
- Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA: Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*. 2004;431:707-12. Epub 2004 Sep 12.
- Kato M: WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep*. 2005;14:1583-8.

- Katyal S, el-Khamisy SF, Russell HR, Li Y, Ju L, Caldecott KW, McKinnon PJ: TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair in neurons and is neuroprotective in vivo. *Embo J.* 2007;26:4720-31. Epub 2007 Oct 4.
- Kemler R: From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 1993;9:317-21.
- Kim KH, Kanbe T, Akashi T, Mizuguchi I, Kikuchi A: Identification of a single nuclear localization signal in the C-terminal domain of an *Aspergillus* DNA topoisomerase II. *Mol Genet Genomics.* 2002;268:287-97. Epub 2002 Oct 17.
- Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, Kishida M, Sakamoto I, Koyama S, Kikuchi A: Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem.* 1998;273:10823-6.
- Kordiyak GJ, Jakes S, Ingebritsen TS, Benbow RM: Casein kinase II stimulates *Xenopus laevis* DNA topoisomerase I by physical association. *Biochemistry* 1994;33:13484-91.
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H: Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science.* 1997;275:1784-7.
- Kosaki A, Yamada K, Suga J, Otaka A, Kuzuya H: 14-3-3beta protein associates with insulin receptor substrate 1 and decreases insulin-stimulated phosphatidylinositol 3'-kinase activity in 3T3L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 1998;273:940-4.
- Kouzarides T: SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell.* 2007;128:802.
- Krishnakumar R, Kraus WL: The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol*;39:8-24.
- Krogh S, Mortensen UH, Westergaard O, Bonven BJ: Eukaryotic topoisomerase I-DNA interaction is stabilized by helix curvature. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:1235-41.
- Kroll DJ, Sullivan DM, Gutierrez-Hartmann A, Hoeffler JP: Modification of DNA topoisomerase II activity via direct interactions with the cyclic adenosine-3',5'-monophosphate response element-binding protein and related transcription factors. *Mol Endocrinol.* 1993;7:305-18.
- Kubo A, Yoshikawa A, Hirashima T, Masuda N, Takada M, Takahara J, Fukuoka M, Nakagawa K: Point mutations of the topoisomerase IIalpha gene in patients with small cell lung cancer treated with etoposide. *Cancer Res.* 1996;56:1232-6.
- Kuphal F, Behrens J: E-cadherin modulates Wnt-dependent transcription in colorectal cancer cells but does not alter Wnt-independent gene expression in fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2006;312:457-67.

- Kurz EU, Leader KB, Kroll DJ, Clark M, Gieseler F: Modulation of human DNA topoisomerase II α function by interaction with 14-3-3 ϵ . *J Biol Chem.* 2000;275:13948-54.
- Le Mee S, Chaminade F, Delaporte C, Markovits J, Saucier JM, Jacquemin-Sablon A: Cellular resistance to the antitumor DNA topoisomerase II inhibitor S16020-2: importance of the N-[2(Dimethylamino)ethyl]carbamoyl side chain. *Mol Pharmacol.* 2000;58:709-18.
- Lee K, Qian DZ, Rey S, Wei H, Liu JO, Semenza GL: Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:2353-8. Epub 2009 Jan 23.
- Leppard JB, Champoux JJ: Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma.* 2005;114:75-85. Epub 2005 Apr 14.
- Lepper ER, Nooter K, Verweij J, Acharya MR, Figg WD, Sparreboom A: Mechanisms of resistance to anticancer drugs: the role of the polymorphic ABC transporters ABCB1 and ABCG2. *Pharmacogenomics.* 2005;6:115-38.
- Levy L, Neuveut C, Renard CA, Charneau P, Branchereau S, Gauthier F, Van Nhieu JT, Cherqui D, Petit-Bertron AF, Mathieu D, Buendia MA: Transcriptional activation of interleukin-8 by beta-catenin-Tcf4. *J Biol Chem.* 2002;277:42386-93. Epub 2002 Aug 27.
- Li FQ, Mofunanya A, Fischer V, Hall J, Takemaru K: Nuclear-cytoplasmic shuttling of Chibby controls beta-catenin signaling. *Mol Biol Cell* 2009a;21:311-22.
- Li FQ, Mofunanya A, Harris K, Takemaru K: Chibby cooperates with 14-3-3 to regulate beta-catenin subcellular distribution and signaling activity. *J Cell Biol.* 2008;181:1141-54. Epub 2008 Jun 23.
- Li QQ, Xu JD, Wang WJ, Cao XX, Chen Q, Tang F, Chen ZQ, Liu XP, Xu ZD: Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2009b;15:2657-65. Epub 2009 Mar 31.
- Lilien J, Balsamo J: The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17:459-65.
- Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ: Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol.* 1997;139:1861-72.
- Logan CY, Nusse R: The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.

- Lopez-Girona A, Furnari B, Mondesert O, Russell P: Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature*. 1999;397:172-5.
- Lowe JA, Jones P, Wilson DM: Network biology as a new approach to drug discovery. *Curr*;13:524-6.
- Lu Z, Hunter T: Wnt-independent beta-catenin transactivation in tumor development. *Cell Cycle*. 2004;3:571-3. Epub 2004 May 25.
- Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C: Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1603-8.
- Mano MS, Rosa DD, De Azambuja E, Ismael GF, Durbecq V: The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-IIalpha and their importance to the biology of solid tumours. *Cancer Treat Rev*. 2007;33:64-77. Epub 2006 Nov 17.
- Mansilla S, Bataller M, Portugal J: A nuclear budding mechanism in transiently arrested cells generates drug-sensitive and drug-resistant cells. *Biochem Pharmacol*. 2009;78:123-32. Epub 2009 Apr 5.
- Manzanares M, Locascio A, Nieto MA: The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution. *Trends Genet*. 2001;17:178-81.
- Mao Y, Desai SD, Liu LF: SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem*. 2000;275:26066-73.
- Mao Y, Desai SD, Ting CY, Hwang J, Liu LF: 26 S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *J Biol Chem* 2001;276:40652-8. Epub 2001 Aug 23.
- Marchand C, Antony S, Kohn KW, Cushman M, Ioanoviciu A, Staker BL, Burgin AB, Stewart L, Pommier Y: A novel norindenoisoquinoline structure reveals a common interfacial inhibitor paradigm for ternary trapping of the topoisomerase I-DNA covalent complex. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:287-95.
- Marchenko ND, Marchenko GN, Strongin AY: Unconventional activation mechanisms of MMP-26, a human matrix metalloproteinase with a unique PHCGXXD cysteine-switch motif. *J Biol Chem*. 2002;277:18967-72. Epub 2002 Mar 11.
- Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, Proksch E, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P: ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:9182-7. Epub 2005 Jun 15.

- Matsumoto Y, Matsumoto M, Minemura M, Takano H, Nagao S, Iglesias A, Fojo T: [Expression of ATP binding cassette superfamily (multidrug resistance-1, multidrug resistance-associated protein, human canalicular multispecific organ anion transporter) mRNA in etoposide and m-AMSA resistant cell lines]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 1997;24:1941-6.
- Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM: Wnt signaling in lung cancer. *Cancer Lett*. 2005;222:1-10.
- McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B: A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science*. 1991;254:1359-61.
- Meczes EL, Gilroy KL, West KL, Austin CA: The impact of the human DNA topoisomerase II C-terminal domain on activity. *PLoS One*. 2008;3:e1754.
- Mei JM, Borchert GL, Donald SP, Phang JM: Matrix metalloproteinase(s) mediate(s) NO-induced dissociation of beta-catenin from membrane bound E-cadherin and formation of nuclear beta-catenin/LEF-1 complex. *Carcinogenesis*. 2002;23:2119-22.
- Mestdagt M, Polette M, Buttice G, Noel A, Ueda A, Foidart JM, Gilles C: Transactivation of MCP-1/CCL2 by beta-catenin/TCF-4 in human breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2006;118:35-42.
- Miele L, Osborne B: Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol*. 1999;181:393-409.
- Mill P, Mo R, Fu H, Grachtchouk M, Kim PC, Dlugosz AA, Hui CC: Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development. *Genes Dev*. 2003;17:282-94.
- Miranda TB, Miranda M, Frankel A, Clarke S: PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. *J Biol Chem*. 2004;279:22902-7. Epub 2004 Mar 24.
- Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y: Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* 2001;12:469-76.
- Moon RT: Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE*. 2005;2005:cm1.
- Morgan SE, Cadena RS, Raimondi SC, Beck WT: Selection of human leukemic CEM cells for resistance to the DNA topoisomerase II catalytic inhibitor ICRF-187 results in increased levels of topoisomerase IIalpha and altered G(2)/M checkpoint and apoptotic responses. *Mol Pharmacol*. 2000;57:296-307.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW: Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 1997;275:1787-90.

- Muslin AJ, Xing H: 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal*. 2000;12:703-9.
- Nagahata T, Shimada T, Harada A, Nagai H, Onda M, Yokoyama S, Shiba T, Jin E, Kawanami O, Emi M: Amplification, up-regulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* disheveled gene, in primary breast cancers. *Cancer Sci*. 2003;94:515-8.
- Nagel R, le Sage C, Diosdado B, van der Waal M, Oude Vrielink JA, Bolijn A, Meijer GA, Agami R: Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2008;68:5795-802.
- Najy AJ, Day KC, Day ML: ADAM15 supports prostate cancer metastasis by modulating tumor cell-endothelial cell interaction. *Cancer Res*. 2008;68:1092-9.
- Nath KA: Provenance of the protective property of p21. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289:F512-3.
- Niculescu AB, 3rd, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI: Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol*. 1998;18:629-43.
- Nitiss JL: DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2009a;9:327-37. Epub 2009 Apr 20.
- Nitiss JL: Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2009b;9:338-50. Epub 2009 Apr 20.
- Nivens MC, Felder T, Galloway AH, Pena MM, Pouliot JJ, Spencer HT: Engineered resistance to camptothecin and antifolates by retroviral coexpression of tyrosyl DNA phosphodiesterase-I and thymidylate synthase. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004;53:107-15. Epub 2003 Nov 7.
- Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M: Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci*. 2001;114:111-118.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT: c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005;435:839-43.
- Ohtsuka K, Ohnishi H, Morii T, Fujiwara M, Kishino T, Ogura W, Chiba M, Matsushima S, Goya T, Watanabe T: Downregulated ABCG2 enhances sensitivity to topoisomerase I inhibitor in epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 1726;5:1726-33.

- Okumura H, Natsugoe S, Matsumoto M, Yokomakura N, Uchikado Y, Takatori H, Ishigami S, Takao S, Aikou T: Predictive value of p53 and 14-3-3sigma for the effect of chemoradiation therapy on esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol.* 2005;91:84-9.
- Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA: Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 2008;68:3645-54.
- Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R: E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci.* 1999;112:1237-45.
- Park JH, Ahn MY, Kim TH, Yoon S, Kang KW, Lee J, Moon HR, Jung JH, Chung HY, Kim HS: A new synthetic HDAC inhibitor, MHY218, induces apoptosis or autophagy-related cell death in tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Invest New Drugs*;2011:8.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A: Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007;7:415-28. Epub 2007 May 17.
- Peinado H, Quintanilla M, Cano A: Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem.* 2003;278:21113-23. Epub 2003 Mar 28.
- Perego P, Cossa G, Tinelli S, Corna E, Carenini N, Gatti L, De Cesare M, Ciusani E, Zunino F, Luison E, Canevari S, Zaffaroni N, Beretta GL: Role of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 and inter-players in regulation of tumor cell sensitivity to topoisomerase I inhibition. *Biochem Pharmacol*;2011:29.
- Perez-Moreno M, Fuchs E: Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell.* 2006;11:601-12.
- Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A: A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem.* 2001;276:27424-31. Epub 2001 Apr 17.
- Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G: A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* 1998;392:190-3.
- Perry I, Tselepis C, Hoyland J, Iqbal TH, Scott D, Sanders SA, Cooper BT, Jankowski JA: Reduced cadherin/catenin complex expression in celiac disease can be reproduced in vitro by cytokine stimulation. *Lab Invest.* 1999;79:1489-99.
- Piedra J, Miravet S, Castano J, Palmer HG, Heisterkamp N, Garcia de Herreros A, Dunach M: p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol.* 2003;23:2287-97.

- Plo I, Hernandez H, Kohlhagen G, Lautier D, Pommier Y, Laurent G: Overexpression of the atypical protein kinase C zeta reduces topoisomerase II catalytic activity, cleavable complexes formation, and drug-induced cytotoxicity in monocytic U937 leukemia cells. *J Biol Chem* 2002;277:31407-15. Epub 2002 Jun 24.
- Polakis P: Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 2000;14:1837-51.
- Polakis P: The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2007;17:45-51.
- Pommier Y: Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:789-802.
- Pommier Y: DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem Rev.* 2009;109:2894-902.
- Pommier Y, Kerrigan D, Hartman KD, Glazer RI: Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C. *J Biol Chem* 1990;265:9418-22.
- Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C: DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem*;17:421-33.
- Pommier Y, Pourquier P, Fan Y, Strumberg D: Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1400:83-105.
- Pommier Y, Pourquier P, Urasaki Y, Wu J, Laco GS: Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance. *Drug Resist Updat.* 1999;2:307-318.
- Powell SN, Kachnic LA: Therapeutic exploitation of tumor cell defects in homologous recombination. *Anticancer Agents Med Chem.* 2008;8:448-60.
- Primiano T, Baig M, Maliyekkel A, Chang BD, Fellars S, Sadhu J, Axenovich SA, Holzmayer TA, Roninson IB: Identification of potential anticancer drug targets through the selection of growth-inhibitory genetic suppressor elements. *Cancer Cell.* 2003;4:41-53.
- Rallabhandi P, Hashimoto K, Mo YY, Beck WT, Moitra PK, D'Arpa P: Sumoylation of topoisomerase I is involved in its partitioning between nucleoli and nucleoplasm and its clearing from nucleoli in response to camptothecin. *J Biol Chem.* 2002;277:40020-6. Epub 2002 Jul 30.
- Ravi D, Chen Y, Karia B, Brown A, Gu TT, Li J, Carey MS, Hennessy BT, Bishop AJ: 14-3-3 sigma expression effects G2/M response to oxygen and correlates with ovarian cancer metastasis. *PLoS*;6:e15864.
- Redon C, Pilch DR, Rogakou EP, Orr AH, Lowndes NF, Bonner WM: Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage. *EMBO Rep.* 2003;4:678-84.

- Reichmann E, Schwarz H, Deiner EM, Leitner I, Eilers M, Berger J, Busslinger M, Beug H: Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell*. 1992;71:1103-16.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G: The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403:901-6.
- Remacle JE, Kraft H, Lerchner W, Wuytens G, Collart C, Verschuere K, Smith JC, Huylebroeck D: New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *Embo J*. 1999;18:5073-84.
- Reya T, Clevers H: Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005;434:843-50.
- Roca J, Wang JC: DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism. *Cell*. 1994;77:609-16.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM: DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998;273:5858-68.
- Roninson IB: Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res*. 2003;63:2705-15.
- Roninson IB, Broude EV, Chang BD: If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat*. 2001;4:303-13.
- Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M: Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1999;274:36734-40.
- Rudini N, Dejana E: Adherens junctions. *Curr Biol*. 2008;18:R1080-2.
- Ryu H, Furuta M, Kirkpatrick D, Gygi SP, Azuma Y: PIASy-dependent SUMOylation regulates DNA topoisomerase IIalpha activity. *J* 2010;191:783-94.
- Saadeddin A, Babaei-Jadidi R, Spencer-Dene B, Nateri AS: The links between transcription, beta-catenin/JNK signaling, and carcinogenesis. *Mol Cancer Res*. 2009;7:1189-96. Epub 2009 Aug 11.
- Saijo M, Ui M, Enomoto T: Growth state and cell cycle dependent phosphorylation of DNA topoisomerase II in Swiss 3T3 cells. *Biochemistry*. 1992;31:359-63.
- Salm S, Burger PE, Wilson EL: TGF-beta and stem cell factor regulate cell proliferation in the proximal stem cell niche. *Prostate* 1002;2011:21505.
- Samuels DS, Shimizu Y, Shimizu N: Protein kinase C phosphorylates DNA topoisomerase I. *FEBS Lett* 1989;259:57-60.

- Saydam O, Shen Y, Wurdinger T, Senol O, Boke E, James MF, Tannous BA, Stemmer-Rachamimov AO, Yi M, Stephens RM, Fraefel C, Gusella JF, Krichevsky AM, Breakefield XO: Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2009;29:5923-40. Epub 2009 Aug 24.
- Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T: E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009;28:151-66.
- Shao RG, Cao CX, Zhang H, Kohn KW, Wold MS, Pommier Y: Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes. *Embo J* 1999;18:1397-406.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A: The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:5522-7.
- Sissi C, Palumbo M: The quinolone family: from antibacterial to anticancer agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2003;3:439-50.
- Skvortsova I, Skvortsov S, Raju U, Stasyk T, Riesterer O, Schottdorf EM, Popper BA, Schiestl B, Eichberger P, Debbage P, Neher A, Bonn GK, Huber LA, Milas L, Lukas P: Epithelial-to-mesenchymal transition and c-myc expression are the determinants of cetuximab-induced enhancement of squamous cell carcinoma radioresponse. *Radiother;*96:108-15. Epub 2010 May 5.
- Sliwinska MA, Mosieniak G, Wolanin K, Babik A, Piwocka K, Magalska A, Szczepanowska J, Fronk J, Sikora E: Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech Ageing Dev.* 2009;130:24-32. Epub 2008 May 1.
- Sng JH, Heaton VJ, Bell M, Maini P, Austin CA, Fisher LM: Molecular cloning and characterization of the human topoisomerase IIalpha and IIbeta genes: evidence for isoform evolution through gene duplication. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1444:395-406.
- Son YS, Suh JM, Ahn SH, Kim JC, Yi JY, Hur KC, Hong WS, Muller MT, Chung IK: Reduced activity of topoisomerase II in an Adriamycin-resistant human stomach-adenocarcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;41:353-60.
- Staker BL, Hjerrild K, Feese MD, Behnke CA, Burgin AB, Jr., Stewart L: The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:15387-92. Epub 2002 Nov 8.
- Steinberg MS, McNutt PM: Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:554-60.

- Stuchinskaya T, Mitchenall LA, Schoeffler AJ, Corbett KD, Berger JM, Bates AD, Maxwell A: How do type II topoisomerases use ATP hydrolysis to simplify DNA topology beyond equilibrium? Investigating the relaxation reaction of nonsupercoiling type II topoisomerases. *J Mol Biol.* 2009;385:1397-408. Epub 2008 Dec 7.
- Sullivan R, Graham CH: Hypoxia prevents etoposide-induced DNA damage in cancer cells through a mechanism involving hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:1702-13. Epub 2009 Jun 9.
- Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y, Furukawa Y: Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene.* 2002;21:5861-7.
- Takano H, Kohno K, Ono M, Uchida Y, Kuwano M: Increased phosphorylation of DNA topoisomerase II in etoposide-resistant mutants of human cancer KB cells. *Cancer Res* 1991;51:3951-7.
- Takayasu H, Horie H, Hiyama E, Matsunaga T, Hayashi Y, Watanabe Y, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ozaki T, Furuuchi K, Tada M, Ohnuma N, Nakagawara A: Frequent deletions and mutations of the beta-catenin gene are associated with overexpression of cyclin D1 and fibronectin and poorly differentiated histology in childhood hepatoblastoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7:901-8.
- Takeichi M: Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5:806-11.
- Takemaru K, Fischer V, Li FQ: Fine-tuning of nuclear-catenin by Chibby and 14-3-3. *Cell Cycle.* 2009;8:210-3. Epub 2009 Jan 12.
- Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X: A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell.* 2004;13:149-56.
- Tan KB, Mattern MR, Eng WK, McCabe FL, Johnson RK: Nonproductive rearrangement of DNA topoisomerase I and II genes: correlation with resistance to topoisomerase inhibitors. *J Natl Cancer Inst.* 1989;81:1732-5.
- Teicher BA: Next generation topoisomerase I inhibitors: Rationale and biomarker strategies. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:1262-71. Epub 2007 Oct 22.
- Tentori L, Dorio AS, Muzi A, Lacal PM, Ruffini F, Navarra P, Graziani G: The integrin antagonist cilengitide increases the antitumor activity of temozolomide against malignant melanoma. *Oncol Rep.* 2008;19:1039-43.
- Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:442-54.
- Thiery JP, Sleeman JP: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:131-42.

- Treszezamsky AD, Kachnic LA, Feng Z, Zhang J, Tokadjian C, Powell SN: BRCA1- and BRCA2-deficient cells are sensitive to etoposide-induced DNA double-strand breaks via topoisomerase II. *Cancer Res.* 2007;67:7078-81.
- Tsujii M, DuBois RN: Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell.* 1995;83:493-501.
- Tzivion G, Shen YH, Zhu J: 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene.* 2001;20:6331-8.
- Ubezio P, Lupi M, Branduardi D, Cappella P, Cavallini E, Colombo V, Matera G, Natoli C, Tomasoni D, D'Incalci M: Quantitative assessment of the complex dynamics of G1, S, and G2-M checkpoint activities. *Cancer Res.* 2009;69:5234-40. Epub 2009 Jun 9.
- Vainio P, Wolf M, Edgren H, He T, Kohonen P, Mpindi JP, Smit F, Verhaegh G, Schalken J, Perala M, Iljin K, Kallioniemi O: Integrative genomic, transcriptomic, and RNAi analysis indicates a potential oncogenic role for FAM110B in castration-resistant prostate cancer. *Prostate* 1002;2011:21487.
- Van Der Hoeven PC, Van Der Wal JC, Ruurs P, Van Dijk MC, Van Blitterswijk J: 14-3-3 isotypes facilitate coupling of protein kinase C-zeta to Raf-1: negative regulation by 14-3-3 phosphorylation. *Biochem J.* 2000;345 Pt 2:297-306.
- Verbiest V, Montaudon D, Tautu MT, Moukarzel J, Portail JP, Markovits J, Robert J, Ichas F, Pourquier P: Protein arginine (N)-methyl transferase 7 (PRMT7) as a potential target for the sensitization of tumor cells to camptothecins. *FEBS Lett.* 2008;582:1483-9. Epub 2008 Mar 31.
- Verschuere K, Remacle JE, Collart C, Kraft H, Baker BS, Tylzanowski P, Nelles L, Wuytens G, Su MT, Bodmer R, Smith JC, Huylebroeck D: SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem.* 1999;274:20489-98.
- Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga LH, Agami R: A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell.* 2006;124:1169-81.
- Walker JV, Nitiss JL: DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Invest* 2002;20:570-89.
- Wall ME, Wani MC: Camptothecin and taxol: discovery to clinic--thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 1995;55:753-60.
- Wang JC: Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:430-40.
- Wang X, Weaver DT: The ups and downs of DNA repair biomarkers for PARP inhibitor therapies. *Am;*1:301-327. Epub 2010 Jan 3.

- Wells NJ, Fry AM, Guano F, Norbury C, Hickson ID: Cell cycle phase-specific phosphorylation of human topoisomerase II alpha. Evidence of a role for protein kinase C. *J Biol Chem.* 1995;270:28357-63.
- Wells NJ, Hickson ID: Human topoisomerase II alpha is phosphorylated in a cell-cycle phase-dependent manner by a proline-directed kinase. *Eur J Biochem.* 1995;231:491-7.
- Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H, Pals ST: Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol.* 1999;154:515-23.
- Wong H, Alicke B, West KA, Pacheco P, La H, Januario T, Yauch RL, de Sauvage FJ, Gould SE: Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of vismodegib in preclinical models of mutational and ligand-dependent Hedgehog pathway activation. *Clin*;17:4682-92. Epub 2011 May 24.
- Wong SC, Lo SF, Lee KC, Yam JW, Chan JK, Wendy Hsiao WL: Expression of frizzled-related protein and Wnt-signalling molecules in invasive human breast tumours. *J Pathol.* 2002;196:145-53.
- Wu CC, Li TK, Farh L, Lin LY, Lin TS, Yu YJ, Yen TJ, Chiang CW, Chan NL: Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science.* 2011;333:459-62.
- Wu Z, Zheng S, Li Z, Tan J, Yu Q: E2F1 suppresses Wnt/beta-catenin activity through transactivation of beta-catenin interacting protein ICAT. *Oncogene* 1038;30:3979-84.
- Yanagawa S, Matsuda Y, Lee JS, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T, Ishimoto A: Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *Embo J.* 2002;21:1733-42.
- Yang J, Wu J, Tan C, Klein PS: PP2A:B56epsilon is required for Wnt/beta-catenin signaling during embryonic development. *Development.* 2003;130:5569-78. Epub 2003 Oct 1.
- Yang SW, Burgin AB, Jr., Huizenga BN, Robertson CA, Yao KC, Nash HA: A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11534-9.
- Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT: The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev.* 1996;10:1443-54.
- Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Bottlinger EP: Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *Embo J.* 2004;23:1155-65. Epub 2004 Feb 19.

- Zeng Z, Cortes-Ledesma F, El Khamisy SF, Caldecott KW: TDP2/TTRAP is the major 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase activity in vertebrate cells and is critical for cellular resistance to topoisomerase II-induced DNA damage. *J*;286:403-9. Epub 2010 Oct 28.
- Zhang X, Yin P, Di D, Luo G, Zheng L, Wei J, Zhang J, Shi Y, Xu N: IL-6 regulates MMP-10 expression via JAK2/STAT3 signaling pathway in a human lung adenocarcinoma cell line. *Anticancer Res*. 2009;29:4497-501.
- Zhang Y, Reinberg D: Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*. 2001;15:2343-60.
- Zhang YW, Regairaz M, Seiler JA, Agama KK, Doroshow JH, Pommier Y: Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic*;39:3607-20. Epub 2011 Jan 11.
- Zhu W, Leber B, Andrews DW: Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *Embo J*. 2001;20:5999-6007.
- Zirn B, Wittmann S, Graf N, Gessler M: Chibby, a novel antagonist of the Wnt pathway, is not involved in Wilms tumor development. *Cancer Lett*. 2005;220:115-20.

ANNEXE

Annexe1 : Effet de la répression de FAM110B dans des cellules HeLa en culture sur la modulation des 500 premiers gènes classés par ordre de significativité

ID	logFC	t	P.Value	adj.P.Val	Name
1556773_at	-2.903467279	-29.48802349	6.023506789	0.001609365	1556773_at
209946_at	-2.452463811	-25.19947275	1.597016515	0.001609365	VEGFC
215506_s_at	-2.895660373	-24.93958563	1.702963989	0.001609365	DIRAS3
204112_s_at	-2.347013825	-24.40907955	1.945570870	0.001609365	HNMT
202834_at	-2.175722771	-23.65625269	2.362016055	0.001609365	AGT
211756_at	-4.705778547	-22.74432211	3.012411262	0.001609365	PTHLH
208025_s_at	-3.687965985	-22.58853046	3.143214431	0.001609365	HMGA2
206300_s_at	-4.216297214	-22.08809238	3.610150050	0.001609365	PTHLH
221577_x_at	-2.286425288	-21.97138591	3.730307569	0.001609365	221577_x_at
244403_at	2.076581382	21.77856489	3.939129843	0.001609365	CRB1
205780_at	-2.713430535	-21.62457880	4.115655906	0.001609365	BIK
241355_at	1.943247472	21.51938721	4.241516698	0.001609365	HR
208881_x_at	2.019986760	21.37919848	4.416244679	0.001609365	IDI1
218273_s_at	-2.439531595	-21.30671369	4.509850187	0.001609365	PDP1
224675_at	2.661218970	21.18663620	4.671381218	0.001609365	MESDC2
233177_s_at	-2.301952093	-21.15768265	4.709620358	0.001609365	PNKD
204615_x_at	2.006844020	20.66308328	5.450019299	0.001664213	IDI1
223710_at	-1.958585307	-20.43491817	5.836483444	0.001664213	CCL26
204420_at	-1.839421127	-20.22262954	6.224811577	0.001664213	FOSL1
203126_at	2.033331310	20.08410143	6.494350778	0.001664213	IMPA2
224911_s_at	-2.224423299	-19.85447193	6.971496424	0.001664213	DCBLD2
230175_s_at	-2.230319888	-19.67877249	7.364101653	0.001664213	230175_s_at
207723_s_at	-2.245041316	-19.66867844	7.387423710	0.001664213	KLRC3
205227_at	-2.304173738	-19.65945681	7.408804848	0.001664213	IL1RAP
213029_at	2.198309202	19.54526500	7.679594189	0.001664213	NFIB
222572_at	-2.421813181	-19.30366082	8.291197298	0.001664213	PDP1
213603_s_at	-1.870120206	-19.28366964	8.344281860	0.001664213	RAC2
204885_s_at	1.851029342	19.21753542	8.522719447	0.001664213	MSLN
213714_at	1.806381164	18.90006565	9.443255775	0.001679489	CACNB2
209290_s_at	2.197622015	18.88351921	9.494305637	0.001679489	NFIB
210675_s_at	-3.651799165	-18.82926745	9.663940539	0.001679489	PTPRR
224496_s_at	1.729746915	18.70549141	1.006426783	0.001679489	TMEM107
210437_at	-2.178054229	-18.59806033	1.042735584	0.001679489	210437_at
230291_s_at	2.287660659	18.56985307	1.052518703	0.001679489	NFIB
202206_at	-1.770781220	-18.50583504	1.075118890	0.001679489	ARL4C
211668_s_at	-1.771269501	-18.40488857	1.111907111	0.001686610	PLAU
235649_at	1.797634205	18.17000288	1.203291298	0.001686610	ADAMTS8
202207_at	-1.786922077	-18.12817429	1.220462168	0.001686610	ARL4C
225524_at	-1.706187388	-17.99261767	1.278089611	0.001686610	ANTXR2
235451_at	1.816414473	17.99224998	1.278250150	0.001686610	SMAD5
204284_at	1.897935217	17.99205392	1.278335758	0.001686610	PPP1R3C
1554036_at	-1.626217619	-17.95279478	1.295613226	0.001686610	ZBTB24
217837_s_at	1.984656226	17.76123563	1.383891479	0.001752435	217837_s_at
213905_x_at	1.620562636	17.66308591	1.431809779	0.001752435	BGN
205139_s_at	2.422964419	17.47127359	1.531110073	0.001752435	UST
204011_at	-1.767220632	-17.46411168	1.534969337	0.001752435	SPRY2
229178_at	-1.811050230	-17.41150301	1.563665648	0.001752435	PRTG
206785_s_at	-2.215910734	-17.37481345	1.584046196	0.001752435	206785_s_at
219181_at	-2.893291561	-17.31383082	1.618605206	0.001752435	LIPG
202915_s_at	1.842453215	17.17477230	1.700724458	0.001752435	FAM20B
226233_at	1.699917093	17.14630092	1.718126751	0.001752435	B3GALNT2
214582_at	1.811317043	17.14140247	1.721141513	0.001752435	PDE3B
204933_s_at	1.801904176	17.11948039	1.734708720	0.001752435	TNFRSF11B
225502_at	2.085191977	17.10796578	1.741884461	0.001752435	DOCK8
211732_x_at	-2.056356966	-17.05845107	1.773135316	0.001752435	HNMT

231148_at	-2.078355629	-16.95812429	1.838466393	0.001752435	IGFL2
203889_at	-2.339038233	-16.89990914	1.877650704	0.001752435	SCG5
207111_at	-2.803353519	-16.84422002	1.916041672	0.001752435	EMR1
228716_at	1.601319038	16.83301863	1.923872958	0.001752435	THRB
222857_s_at	-1.574508790	-16.74940799	1.983512331	0.001752435	KCNMB4
219747_at	-1.848219181	-16.71483772	2.008794354	0.001752435	C4orf31
227085_at	1.831474784	16.70575840	2.015495943	0.001752435	H2AFV
221840_at	-2.427515876	-16.70066387	2.019267627	0.001752435	PTPRE
226492_at	1.619084903	16.57380196	2.115874969	0.001791550	SEMA6D
223484_at	-1.898763081	-16.55597789	2.129872260	0.001791550	C15orf48
206508_at	-2.439847516	-16.51442122	2.162924876	0.001791786	CD70
1553997_a_a	-1.480677440	-16.35359851	2.296553123	0.001855614	ASPHD1
225380_at	2.335558254	16.30823725	2.335954244	0.001855614	PKDCC
205590_at	-4.280530413	-16.27305272	2.367054793	0.001855614	RASGRP1
223082_at	-1.498623682	-16.23128456	2.404598548	0.001855614	SH3KBP1
241765_at	1.541670899	16.19739122	2.435570757	0.001855614	CPM
202859_x_at	-2.571069596	-16.17424017	2.456991809	0.001855614	IL8
201288_at	-1.724184593	-16.12476495	2.503504607	0.001855614	ARHGDI8
219137_s_at	1.573249364	16.11638310	2.511485073	0.001855614	MFF
225911_at	1.801048587	16.05064577	2.575105059	0.001859403	NPNT
211924_s_at	-1.887331620	-16.01564648	2.609736530	0.001859403	PLAUR
204279_at	-1.919562111	-15.98647028	2.639018272	0.001859403	PSMB9
232283_at	1.693085890	15.97301865	2.652646431	0.001859403	LYSMD1
235099_at	-1.963395888	-15.81327809	2.820867045	0.001936286	CMTM8
206772_at	2.015370374	15.79481338	2.841096162	0.001936286	PTH2R
224341_x_at	-1.745439268	-15.76817336	2.870578146	0.001936286	TLR4
203548_s_at	1.906271983	15.73836463	2.903987230	0.001936286	LPL
203865_s_at	1.474445566	15.48464763	3.207303567	0.002112762	ADARB1
201580_s_at	1.953229906	15.44205900	3.261734142	0.002121476	TMX4
226279_at	-1.848031771	-15.41403362	3.298134870	0.002121476	PRSS23
208946_s_at	1.604966058	15.34026543	3.396216030	0.002156224	BECN1
209289_at	2.056441605	15.30940209	3.438249309	0.002156224	NFIB
210845_s_at	-1.822252576	-15.27585970	3.484614999	0.002156224	PLAUR
205623_at	3.187596983	15.20413364	3.586209401	0.002156224	ALDH3A1
213032_at	2.441932642	15.16398461	3.644570881	0.002156224	NFIB
231013_at	-1.406472562	-15.12196259	3.706834523	0.002156224	231013_at
242245_at	1.585900941	15.09380876	3.749237950	0.002156224	242245_at
236081_at	1.601115184	15.09119772	3.753198866	0.002156224	SNCA
203549_s_at	1.772420627	15.06664770	3.790678484	0.002156224	LPL
224876_at	1.688068730	15.04663769	3.821547357	0.002156224	C5orf24
211126_s_at	1.493466001	15.01772197	3.866669717	0.002156224	CSR2
200934_at	1.789436304	14.98714845	3.915050418	0.002156224	DEK
231779_at	-1.430852953	-14.97875964	3.928447303	0.002156224	IRAK2
1568633_a_a	2.337008327	14.97499046	3.934483924	0.002156224	1568633_a_at
226017_at	-1.729757812	-14.96924155	3.943711877	0.002156224	CMTM7
229125_at	1.944472546	14.94033095	3.990499223	0.002160203	KANK4
202053_s_at	1.492962124	14.88251669	4.086001046	0.002176916	ALDH3A2
1559067_a_a	-1.802161434	-14.87357632	4.101004100	0.002176916	1559067_a_at
226722_at	1.337529259	14.84092018	4.156348946	0.002180781	FAM20C
205083_at	2.226614833	14.77751910	4.266284070	0.002180781	AOX1
222557_at	-1.466433932	-14.73960537	4.333630326	0.002180781	STMN3
1565269_s_a	1.732852333	14.73723887	4.337874536	0.002180781	ATF1
206247_at	-1.340118962	-14.72351170	4.362588550	0.002180781	MICB
205421_at	2.044563616	14.72202553	4.365273962	0.002180781	SLC22A3
209160_at	1.724040111	14.69423289	4.415847150	0.002180781	AKR1C3
225342_at	-1.444729361	-14.67892734	4.443987116	0.002180781	AK3L1

1554168_a_a	-1.531153298	-14.66635251	4.467261731	0.002180781	SH3KBP1
232617_at	-1.541001237	-14.64434002	4.508344460	0.002181360	CTSS
201859_at	-1.324603658	-14.58160438	4.627847706	0.002187286	SRGN
207030_s_at	1.542692105	-14.57092161	4.648559869	0.002187286	CSRP2
228737_at	-1.366369008	-14.55108494	4.687304812	0.002187286	TOX2
1552502_s_a	-1.626895459	-14.48954710	4.809896944	0.002187286	RHBDL2
222437_s_at	1.689518962	-14.46851386	4.852645057	0.002187286	222437_s_at
201278_at	1.494483974	-14.46616453	4.857447056	0.002187286	DAB2
238029_s_at	2.358920712	-14.43554212	4.920543985	0.002187286	SLC16A14
228562_at	1.947957508	-14.41933585	4.954319815	0.002187286	ZBTB10
208945_s_at	1.404592089	-14.40047338	4.993969467	0.002187286	BECN1
226510_at	1.302110040	-14.39061920	5.014829105	0.002187286	HEATR5A
228121_at	-1.568814972	-14.38978655	5.016596316	0.002187286	TGFB2
226905_at	-1.344719914	-14.35467817	5.091768435	0.002187286	FAM101B
210355_at	-1.681671334	-14.34050952	5.122473729	0.002187286	PTHLH
224698_at	1.796033587	-14.27022016	5.278000320	0.002187286	ESYT2
228653_at	1.359725338	-14.26579459	5.287973830	0.002187286	SAMD5
209587_at	1.361457695	-14.25171707	5.319844269	0.002187286	PITX1
218644_at	-1.448504138	-14.22931263	5.371025144	0.002187286	PLEK2
239155_at	-1.433890355	-14.20999510	5.415611525	0.002187286	239155_at
242323_at	1.478670860	-14.19613300	5.447870004	0.002187286	PLA2G12A
205935_at	2.201182082	-14.18314038	5.478306908	0.002187286	FOXF1
206907_at	-2.194001397	-14.17862761	5.488924608	0.002187286	TNFSF9
219763_at	1.531353620	-14.14128194	5.577710597	0.002187286	DENND1A
204471_at	-1.647566549	-14.13942060	5.582179001	0.002187286	GAP43
213967_at	2.035256753	-14.13514508	5.592458676	0.002187286	RALYL
224817_at	1.924972806	-14.12924749	5.606674213	0.002187286	SH3PXD2A
202902_s_at	-2.386428886	-14.12297916	5.621829169	0.002187286	CTSS
213275_x_at	-1.272164299	-14.11206163	5.648337721	0.002187286	CTSB
211467_s_at	1.597962806	-14.10408084	5.667807058	0.002187286	NFIB
206084_at	-3.676147779	-14.08427398	5.716462387	0.002187286	PTPRR
219202_at	-1.397830699	-14.07649694	5.735698437	0.002187286	RHDF2
201858_s_at	-1.565923740	-14.06641224	5.760753841	0.002187286	SRGN
223373_s_at	1.580155962	-14.04680033	5.809842637	0.002190711	PLA2G12A
202596_at	1.416225184	-13.87897189	6.250281856	0.002340644	ENSA
209909_s_at	-1.669126038	-13.85389797	6.319344473	0.002341883	TGFB2
236180_at	-1.619874648	-13.84672849	6.339253608	0.002341883	236180_at
214581_x_at	-1.983220361	-13.81807459	6.419550529	0.002356630	TNFRSF21
222103_at	2.102760865	-13.79823183	6.475844859	0.002358142	ATF1
202458_at	-1.472958978	-13.78536380	6.512656602	0.002358142	PRSS23
236565_s_at	-1.472867055	-13.75882931	6.589330178	0.002370208	LARP6
225728_at	1.296247489	-13.71686670	6.712723701	0.002385897	SORBS2
214053_at	1.240297571	-13.70765165	6.740177365	0.002385897	ERBB4
211506_s_at	-1.599620644	-13.69973711	6.763860150	0.002385897	IL8
228273_at	1.820369163	-13.64498057	6.930367742	0.002426282	228273_at
1559072_a_a	-1.261037943	-13.62016526	7.007384129	0.002426282	ELFN2
244032_at	1.253257950	-13.59211994	7.095618166	0.002426282	244032_at
201280_s_at	1.633905303	-13.59058627	7.100480164	0.002426282	DAB2
226676_at	1.232618996	-13.58828922	7.107769446	0.002426282	ZNF521
230831_at	-2.612060253	-13.55985018	7.198735326	0.002426282	FRMD5
223595_at	1.277738644	-13.55106157	7.227118358	0.002426282	TMEM133
206243_at	-1.494860783	-13.53144132	7.290950159	0.002426282	TIMP4
222832_s_at	1.418615245	-13.53039247	7.294380762	0.002426282	MFF
225173_at	-1.345985201	-13.52193383	7.322115694	0.002426282	ARHGAP18
210544_s_at	1.264618252	-13.42655622	7.643429509	0.002498754	ALDH3A2
205870_at	-2.262941929	-13.40223820	7.727940335	0.002498754	BDKRB2

202704_at	1.4405982557	13.396935220	7.746512497	0.002498754	TOB1
1553367_a_a	-2.007768739	-13.395272007	7.752348033	0.002498754	COX6B2
230178_s_at	1.3246803909	13.390439600	7.769331829	0.002498754	230178_s_at
209959_at	1.5965451720	13.372378660	7.833189744	0.002500287	NR4A3
209723_at	-1.232811974	-13.363288757	7.865558081	0.002500287	SERPINB9
227095_at	-1.617258460	-13.338714797	7.953840069	0.002503547	LEPR
1553672_at	-1.587013979	-13.325561698	8.001562611	0.002503547	ENAH
214587_at	1.5939081599	13.320856007	8.018716239	0.002503547	COL8A1
225092_at	1.8448436064	13.309857903	8.058973470	0.002503547	225092_at
228062_at	1.2353568665	13.259705408	8.245535718	0.002534015	NAP1L5
1558502_s_a	-1.230586630	-13.238765978	8.324901125	0.002534015	DNM3
208828_at	2.0944556842	13.230721794	8.355624812	0.002534015	POLE3
221782_at	1.8832923190	13.226739098	8.370884682	0.002534015	DNAJC10
201889_at	-1.727651319	-13.222077618	8.388786185	0.002534015	FAM3C
219008_at	1.5081711778	13.196112214	8.489314268	0.002536646	C2orf43
219959_at	1.4265476874	13.195863008	8.490285825	0.002536646	MOCOS
1556134_a_a	-2.220810847	-13.169269368	8.594705190	0.002553888	B3GNT5
227692_at	1.5645308507	13.126000492	8.767786207	0.002563916	GNAI1
228315_at	1.3197613952	13.122877958	8.780431713	0.002563916	228315_at
227236_at	-1.340032207	-13.119025998	8.796060243	0.002563916	TSPAN2
220522_at	1.8262553413	13.100877428	8.870127895	0.002563916	CRB1
203828_s_at	4.011966743	-13.095880848	8.890646152	0.002563916	IL32
201261_x_at	1.2992046822	13.091224658	8.909815971	0.002563916	BGN
226876_at	-1.276861715	-13.068587729	9.003696460	0.002574473	FAM101B
204897_at	-1.844852155	-13.059746189	9.040674203	0.002574473	PTGER4
228956_at	2.9176197990	13.035315327	9.143766159	0.002580269	UGT8
218510_x_at	1.1759545387	13.032574748	9.155415174	0.002580269	FAM134B
218528_s_at	-1.201090634	-12.986369999	9.354415134	0.002612253	RNF38
221864_at	-1.252049169	-12.984068509	9.364457353	0.002612253	ORAI3
233340_at	1.2818645232	12.965709758	9.445010191	0.002613408	SPINK5L3
218647_s_at	-1.180836225	-12.961363869	9.464195633	0.002613408	YRDC
235572_at	2.2259852238	12.876045848	9.850112114	0.002706305	SPC24
204467_s_at	1.4451330968	12.845117727	9.994473776	0.002732239	SNCA
223091_x_at	1.4670913724	12.808561893	1.016826484	0.002755605	MFF
207419_s_at	-1.241003810	-12.805964171	1.018074696	0.002755605	RAC2
235919_at	1.2074991189	12.771200264	1.034950279	0.002779529	235919_at
1558487_a_a	1.2915236517	12.761780178	1.039578579	0.002779529	TMED4
203024_s_at	-1.213014294	-12.756537531	1.042164760	0.002779529	C5orf15
220076_at	1.2609907122	12.733733940	1.053500473	0.002796123	ANKH
218651_s_at	-1.199675759	-12.674274331	1.083733809	0.002802847	LARP6
202843_at	-1.254021257	-12.666722441	1.087644942	0.002802847	DNAJB9
212148_at	1.256818913	12.663713717	1.089207705	0.002802847	PBX1
202330_s_at	2.4160385915	12.646426708	1.098237148	0.002802847	UNG
1568699_at	1.1563628686	12.636770101	1.103318648	0.002802847	C14orf179
223354_x_at	1.545362294	12.635612778	1.103929474	0.002802847	MFF
240180_at	1.3516568255	12.624987498	1.109555700	0.002802847	240180_at
218856_at	-1.982138173	-12.620130241	1.112138702	0.002802847	TNFRSF21
226358_at	-1.142507477	-12.618228161	1.113152084	0.002802847	APH1B
204690_at	1.295486485	12.607885903	1.118680893	0.002802847	STX8
213075_at	-1.366260323	-12.600922241	1.122421418	0.002802847	OLFML2A
225418_at	-1.353516995	-12.584145041	1.131492724	0.002802847	PVRL2
215913_s_at	1.3790418678	12.568190051	1.140198082	0.002802847	GULP1
235005_at	1.2789956960	12.561490947	1.143876275	0.002802847	DIS3L
205960_at	1.5921126229	12.560371483	1.144492260	0.002802847	PDK4
209576_at	1.6935231445	12.556125298	1.146832208	0.002802847	GNAI1
217913_at	1.1331023502	12.537106772	1.157380756	0.002802847	VPS4A

207565_s_at	-1.153206175	-12.53619093	1.157891540	0.002802847	MR1
204338_s_at	-1.338407385	-12.52871065	1.162073238	0.002802847	RGS4
202637_s_at	-1.482078718	-12.52833101	1.162285937	0.002802847	ICAM1
226633_at	1.799175418	12.52028825	1.166802492	0.002802847	RAB8B
211071_s_at	-1.180041033	-12.50116148	1.177625113	0.002802847	MLLT11
201467_s_at	1.132733063	12.48975316	1.184135516	0.002802847	NQO1
1552486_s_a	-1.852485997	-12.47337058	1.193557402	0.002802847	LACTB
236718_at	-1.138019468	-12.46852811	1.196358935	0.002802847	MYO10
209893_s_at	-1.126581797	-12.46258780	1.199805983	0.002802847	FUT4
212909_at	-1.361730833	-12.45574520	1.203790826	0.002802847	LYPD1
236088_at	1.775476763	12.45482242	1.204329384	0.002802847	NTNG1
222942_s_at	-1.386865715	-12.45418959	1.204698879	0.002802847	TIAM2
227145_at	-1.283255882	-12.41567717	1.227433774	0.002841531	LOXL4
236631_at	1.411983341	12.40111465	1.236159176	0.002841531	C21orf125
204457_s_at	1.593044161	12.39985476	1.236917418	0.002841531	GAS1
218469_at	-2.176865631	-12.36626050	1.257335019	0.002860687	GREM1
219628_at	1.164862333	12.34103885	1.272919875	0.002860687	ZMAT3
210086_at	1.494189360	12.33998478	1.273576036	0.002860687	HR
229256_at	-2.482012809	-12.33057512	1.279450936	0.002860687	PGM2L1
219961_s_at	1.247652258	12.32941632	1.280176592	0.002860687	PLK1S1
1552496_a_a	1.403002705	12.31062664	1.292009488	0.002860687	COBL
238854_at	1.258346450	12.30040612	1.298498901	0.002860687	238854_at
243366_s_at	-1.733910592	-12.30033318	1.298545354	0.002860687	243366_s_at
213836_s_at	-1.114480303	-12.28021217	1.311431773	0.002860687	WIP11
222735_at	1.533173431	12.25747643	1.326170784	0.002860687	TMEM38B
209417_s_at	-1.178552760	-12.25625234	1.326969740	0.002860687	IFI35
222512_at	1.168959628	12.23017055	1.344125896	0.002860687	NUB1
212246_at	-1.338249727	-12.22786409	1.345655325	0.002860687	MCFD2
230630_at	-1.139427046	-12.22599783	1.346894326	0.002860687	230630_at
225219_at	1.697693472	12.22439640	1.347958562	0.002860687	SMAD5
209869_at	1.449257117	12.20778834	1.359052888	0.002860687	ADRA2A
205205_at	-1.197141647	-12.20612943	1.360166831	0.002860687	RELB
212899_at	1.110297482	12.20569712	1.360457295	0.002860687	CDK19
219343_at	-1.143043482	-12.20438445	1.361339710	0.002860687	CDC37L1
205832_at	-2.281642174	-12.20371886	1.361787388	0.002860687	CPA4
225941_at	1.194182408	12.20084805	1.363720256	0.002860687	EIF4E3
226731_at	1.771215480	12.18706210	1.373046342	0.002860687	PELO
228255_at	1.169606613	12.18602412	1.373751504	0.002860687	ALS2CR4
211725_s_at	-1.118052707	-12.17958851	1.378132924	0.002860687	BID
212964_at	-1.630486196	-12.16847235	1.385738959	0.002860687	HIC2
223015_at	1.334366214	12.15245331	1.396785072	0.002860687	EIF2A
222988_s_at	-1.179751671	-12.14930283	1.398969459	0.002860687	TMEM9
229441_at	-1.251630784	-12.14468463	1.402178623	0.002860687	PRSS23
213234_at	-1.216104823	-12.14449317	1.402311851	0.002860687	KIAA1467
57540_at	-1.410175808	-12.13167333	1.411265902	0.002860687	RBKS
210119_at	-1.596073941	-12.12366512	1.416892738	0.002860687	KCNJ15
213457_at	-1.163693285	-12.12270726	1.417567494	0.002860687	MFHAS1
226237_at	2.626597173	12.12221115	1.417917119	0.002860687	226237_at
213541_s_at	1.258207761	12.10440453	1.430532217	0.002875527	ERG
204235_s_at	1.447923192	12.07839197	1.449194360	0.002892205	GULP1
201565_s_at	1.597669389	12.07431667	1.452143481	0.002892205	ID2
204128_s_at	1.423345159	12.06255754	1.460691967	0.002892205	RFC3
227064_at	1.157027432	12.06242274	1.460790300	0.002892205	ANKRD40
223843_at	1.180637600	12.05594320	1.465525886	0.002892205	SCARA3
219525_at	1.479296890	12.04907073	1.470568011	0.002892205	SLC47A1
218028_at	1.249496863	12.02668689	1.487129708	0.002914294	ELOVL1

1569020_at	-1.460834238	-12.01729098	1.494145758	0.002917586	NEDD9
201248_s_at	1.273156089	11.97244948	1.528160161	0.002965897	SREBF2
228964_at	-1.978960705	-11.97039986	1.529736120	0.002965897	PRDM1
226751_at	1.077690503	11.94534335	1.549154589	0.002980445	CNRIP1
205374_at	-1.745888753	-11.92886421	1.562080768	0.002980445	SLN
205088_at	1.379713505	11.92819793	1.562606005	0.002980445	MAMLD1
228063_s_at	1.291128935	11.92055998	1.568641707	0.002980445	NAP1L5
204288_s_at	1.276217562	11.92005870	1.569038775	0.002980445	SORBS2
227961_at	-1.149183247	-11.91891303	1.569946696	0.002980445	CTSB
231018_at	-1.216461412	-11.88851612	1.594258519	0.003016127	PALM3
209092_s_at	1.399197030	11.80766333	1.661069044	0.003123023	GLOD4
208250_s_at	-1.247542161	-11.80386904	1.664282850	0.003123023	DMBT1
226354_at	-1.859265373	-11.79559843	1.671313058	0.003123023	LACTB
203423_at	-1.629992170	-11.78637682	1.679192073	0.003123023	RBP1
224368_s_at	1.287397749	11.78622587	1.679321396	0.003123023	NDRG3
222073_at	1.223668405	11.77479041	1.689152410	0.003128195	COL4A3
230893_at	1.199924846	11.76970543	1.693545263	0.003128195	DNAJC21
235706_at	1.180511208	11.76165702	1.700525151	0.003130512	CPM
224302_s_at	1.224707040	11.75315092	1.707938064	0.003133607	MRPS36
229422_at	-1.061488969	-11.74316225	1.716690652	0.003139132	NRD1
227437_at	1.386743322	11.69698937	1.757828214	0.003182882	227437_at
1558233_s_a	2.037755538	11.69506220	1.759569789	0.003182882	ATF1
231130_at	1.933436504	11.68892166	1.765132254	0.003182882	FKBP7
205479_s_at	-1.500546733	-11.68317444	1.770356816	0.003182882	PLAU
225328_at	1.798811882	11.67990295	1.773338763	0.003182882	225328_at
206421_s_at	-1.225348587	-11.67748676	1.775544826	0.003182882	SERPINB7
238417_at	-1.676284587	-11.66072972	1.790931990	0.003191168	PGM2L1
233337_s_at	-1.368662517	-11.65974556	1.791840469	0.003191168	SEZ6L2
232353_s_at	-1.119129861	-11.64644337	1.804172019	0.003192888	STYXL1
226576_at	-1.380307733	-11.64610625	1.804485806	0.003192888	ARHGAP26
208963_x_at	1.248840671	11.63371641	1.816062038	0.003203006	FADS1
237400_at	1.179783614	11.62225153	1.826850424	0.003211673	ATP5S
201468_s_at	1.213274853	11.61110385	1.837411286	0.003219886	NQO1
202294_at	1.287804681	11.60000322	1.847997603	0.003228091	STAG1
225681_at	-2.299211640	-11.58536227	1.862068000	0.003242311	CTHRC1
222635_s_at	1.321093565	11.55040649	1.896164200	0.003291199	MED28
204531_s_at	1.097893543	11.52376426	1.922635334	0.003311750	BRCA1
219990_at	1.635979277	11.52169977	1.924704300	0.003311750	E2F8
226817_at	-1.801645409	-11.52023290	1.926175918	0.003311750	DSC2
228882_at	1.182824158	11.50820527	1.938291498	0.003322134	TUB
209094_at	-1.509500151	-11.49504172	1.951652168	0.003325356	DDAH1
242310_at	-1.114986082	-11.49437115	1.952335614	0.003325356	242310_at
238498_at	1.134843696	11.48748144	1.959373676	0.003326979	238498_at
1555852_at	1.158753834	11.42258816	2.027120123	0.003424971	PSMB9
201581_at	2.425827448	11.42024856	2.029612590	0.003424971	TMX4
201646_at	1.131473671	11.39072286	2.061373162	0.003455938	SCARB2
1554547_at	1.193130066	11.38750807	2.064865760	0.003455938	FAM13C
232615_at	-1.187937369	-11.37529320	2.078198578	0.003455938	232615_at
230047_at	1.225359625	11.37060404	2.083343263	0.003455938	FLJ32810
232898_at	1.300491925	11.37020619	2.083780437	0.003455938	DAB2
228851_s_at	1.533713405	11.36094999	2.093981462	0.003455938	ENSA
202504_at	-1.186385199	-11.36053573	2.094439348	0.003455938	TRIM29
227384_s_at	-1.135637819	-11.35214322	2.103740681	0.003455938	227384_s_at
212367_at	1.376020041	11.35114363	2.104851686	0.003455938	FEM1B
225064_at	1.522641030	11.33849852	2.118964844	0.003458763	RABEP1
207196_s_at	-1.056134544	-11.33826711	2.119224134	0.003458763	TNIP1

236655_at	1.0339502304	11.324361486	2.1348725068	0.0034724545	TPD52
238133_at	1.6302452214	11.319552734	2.1403149030	0.0034724545	238133_at
212062_at	1.3091186901	11.294919562	2.1684461196	0.0034991518	ATP9A
39966_at	-1.097292679	-11.29394297	2.1695701419	0.0034991518	CSPG5
213083_at	-1.035819589	-11.24398397	2.2279782525	0.003570697	SLC35D2
228256_s_at	1.5293834487	11.239583050	2.2332097985	0.003570697	EPB41L4A
203632_s_at	-1.956721773	-11.23932038	2.2335224840	0.003570697	GPRC5B
204702_s_at	-1.134097140	-11.21256903	2.2656344968	0.0035954735	NFE2L3
221060_s_at	-1.535379656	-11.21130819	2.2671610860	0.0035954735	TLR4
225930_at	-1.036838070	-11.20889459	2.2700867038	0.0035954735	NKIRAS1
225223_at	1.7562552744	11.202199054	2.2782254511	0.0035954735	SMAD5
223402_at	-1.916166877	-11.19894148	2.2821973517	0.0035954735	DUSP23
226677_at	1.7014673781	11.189815612	2.2933669428	0.0035954735	ZNF521
240509_s_at	2.2164652334	11.182200920	2.3027351935	0.0035954735	GREM2
202357_s_at	-1.195901789	-11.17883889	2.3068854791	0.0035954735	202357_s_at
227099_s_at	-1.441318684	-11.17458881	2.3121443913	0.0035954735	LOC387763
209839_at	-2.620697336	-11.17246173	2.314781566	0.0035954735	DNM3
205654_at	1.0181374085	11.162078720	2.3277043848	0.003605304	C4BPA
218538_s_at	1.2366679240	11.145498134	2.3485136617	0.0036200535	MRS2
227055_at	-1.383598386	-11.14156963	2.3534754598	0.0036200535	METTL7B
203373_at	-1.204574538	-11.13144732	2.3663160095	0.0036200535	SOCS2
208962_s_at	1.1489479358	11.122913834	2.3772038522	0.0036200535	FADS1
210026_s_at	-1.628179655	-11.11924864	2.3818979784	0.0036200535	CARD10
204044_at	-1.195326095	-11.11877973	2.3824992911	0.0036200535	QPRT
223217_s_at	-1.684362438	-11.11794161	2.3835745210	0.0036200535	NFKBIZ
220030_at	-1.401299500	-11.10850068	2.3957249709	0.0036238035	STYK1
232267_at	1.0031262941	11.105733775	2.3992995018	0.0036238035	GPR133
202260_s_at	1.1569914862	11.074772575	2.4397200738	0.0036609897	STXBP1
228336_at	1.0183082230	11.072730570	2.4424134413	0.0036609897	PWWP2A
1557257_at	-1.082668694	-11.06280220	2.4555577265	0.0036609897	BCL10
205263_at	-1.076853009	-11.05902777	2.4605761154	0.0036609897	BCL10
219105_x_at	1.4754097425	11.058408135	2.4614011038	0.0036609897	ORC6L
214657_s_at	1.3446478215	11.041153760	2.484502155	0.0036609897	NEAT1
225478_at	-1.030832208	-11.03990887	2.486178524	0.0036609897	MFHAS1
225643_at	1.0998640785	11.037854515	2.4889477650	0.0036609897	MAPK11P1L
200872_at	-1.220150083	-11.03734034	2.4896414248	0.0036609897	S100A10
228697_at	1.0618832575	11.036423297	2.4908791374	0.0036609897	HINT3
239968_at	1.0202424504	11.014016188	2.5213429844	0.003695829	C21orf84
227812_at	1.0240732807	11.004634010	2.534226057	0.0037047810	TNFRSF19
227112_at	-1.525496689	-10.98912155	2.5556937157	0.0037104470	TMCC1
232602_at	-1.329238447	-10.98268414	2.5646639325	0.0037104470	WFDC3
230721_at	-1.170064316	-10.98187332	2.5657963454	0.0037104470	C16orf52
210792_x_at	1.2280380059	10.978108957	2.5710613064	0.0037104470	SIVA1
220393_at	2.9875561265	10.977414673	2.5720337130	0.0037104470	LGSN
205932_s_at	1.0823099528	10.96110625	2.594997517	0.0037236305	MSX1
218464_s_at	-0.993073158	-10.95674170	2.6011832464	0.0037236305	C17orf63
204805_s_at	1.0721564287	10.943357870	2.6202579560	0.0037236305	H1FX
243606_at	1.2813402176	10.940313657	2.6246190628	0.0037236305	FAM55C
210691_s_at	2.2091332296	10.939058154	2.626420120	0.0037236305	CACYBP
232276_at	1.4034030979	10.93875516	2.6268549852	0.0037236305	HS6ST3
204589_at	-1.301597439	-10.93736864	2.6288460208	0.0037236305	NUAK1
204932_at	1.7652352046	10.91868367	2.6558480209	0.0037470555	TNFRSF11B
229498_at	2.0104022197	10.916454718	2.6590904198	0.0037470555	229498_at
205184_at	-1.216626245	-10.90345087	2.6780979520	0.0037641385	GNG4
217788_s_at	1.4481001822	10.891707495	2.695397776	0.0037787403	GALNT2
218532_s_at	1.1484047940	10.881273236	2.7108772168	0.0037907215	FAM134B

213351_s_at	-1.515924691	-10.85994950	2.7428312029	0.0038256197	TMCC1
225750_at	-1.256883135	-10.83782759	2.7764410376	0.0038626447	225750_at
204544_at	1.1307507610	10.826208639	2.7942837262	0.0038776006	HPS5
203974_at	-1.360741716	-10.81682377	2.8087921658	0.0038823368	HDHD1A
227458_at	-2.026728094	-10.81482190	2.8118981557	0.0038823368	227458_at
218321_x_at	-1.113442601	-10.80078697	2.8337855214	0.0039027006	STYXL1
200838_at	-1.092434187	-10.79495160	2.8429434850	0.0039054757	CTSB
209593_s_at	-1.001056281	-10.78354533	2.8609430351	0.0039203523	TOR1B
203489_at	1.2890658707	10.766489205	2.8881039129	0.0039446444	SIVA1
233982_x_at	-1.170791191	-10.76337194	2.8931000228	0.0039446444	STYXL1
243059_at	0.9744973356	10.746847956	2.9197503698	0.0039495894	243059_at
229073_at	-1.330050576	-10.74497608	2.9227871834	0.0039495894	PRTG
205082_s_at	1.4361510799	10.743677918	2.9248953820	0.0039495894	AOX1
227966_s_at	1.2720955403	10.74023701	2.9304918481	0.0039495894	227966_s_at
1555137_a_a	-1.290061043	-10.73879213	2.9328455408	0.0039495894	FGD6
225826_at	1.3939998927	10.723666742	2.9576159927	0.0039731610	MMAB
218608_at	-1.408981062	-10.70494991	2.9886025268	0.0039955752	ATP13A2
1557137_at	1.1325656659	10.698444027	2.9994608228	0.0039955752	TMEM17
214433_s_at	1.5309183389	10.698281657	2.9997323984	0.0039955752	SELENBP1
208964_s_at	1.1660132343	10.696011377	3.0035325759	0.0039955752	FADS1
235629_at	-1.252603527	-10.66412794	3.0574920558	0.0040410602	235629_at
1558116_x_a	-1.080708738	-10.66381211	3.0580321227	0.0040410602	RECK
225314_at	-1.038866174	-10.66272177	3.0598974494	0.0040410602	OCIAD2
207536_s_at	-1.710599588	-10.65573060	3.0718890048	0.0040471212	TNFRSF9
229285_at	-1.091349475	-10.64162047	3.0962566338	0.0040694190	RNASEL
221816_s_at	-1.132753739	-10.63114320	3.1144945934	0.0040749563	PHF11
209230_s_at	1.1860047763	10.622391418	3.1298239290	0.0040749563	NUPR1
209301_at	0.9912178309	10.621668258	3.1310944717	0.0040749563	CA2
212206_s_at	0.9979703176	10.618529310	3.1366162977	0.0040749563	H2AFV
222592_s_at	-1.403636407	-10.61789412	3.1377350398	0.0040749563	ACSL5
239598_s_at	-1.501730711	-10.58796172	3.1909795510	0.0041342845	LPCAT2
238909_at	-1.802346378	-10.58050477	3.2044056767	0.0041418647	S100A10
213416_at	-1.377148815	-10.52248311	3.3111257480	0.0042514498	ITGA4
235019_at	1.2620138700	10.522239714	3.3115819848	0.0042514498	CPM
201428_at	-1.632944765	-10.51786409	3.3197961222	0.0042514498	CLDN4
219714_s_at	1.3901027299	10.510376789	3.3339062114	0.0042514498	CACNA2D3
202338_at	0.9571287584	10.510204019	3.3342326188	0.0042514498	TK1
225496_s_at	-1.616788455	-10.50935206	3.3358427108	0.0042514498	SYTL2
202133_at	1.2590351393	10.491764178	3.3692827143	0.0042729633	WWTR1
229795_at	1.078739476	10.489540738	3.3735375927	0.0042729633	229795_at
224221_s_at	0.9962914609	10.485744310	3.3808169392	0.0042729633	VAV3
231175_at	1.1893365512	10.478444825	3.3948640230	0.0042729633	BEND6
208763_s_at	0.9720556680	10.476588112	3.3984477918	0.0042729633	TSC2D3
230174_at	-0.999904804	-10.47598431	3.3996141599	0.0042729633	LYPLAL1
212824_at	1.0054222144	10.462035688	3.4266878701	0.0042877979	FUBP3
213567_at	-1.167280900	-10.45809764	3.4343763523	0.0042877979	213567_at
205407_at	-1.191251964	-10.45780741	3.4349437800	0.0042877979	RECK
201131_s_at	-3.586491106	-10.43762480	3.4746683990	0.0043275055	CDH1
209355_s_at	-1.047884328	-10.43094526	3.4879318609	0.0043341518	PPAP2B
224593_at	1.0385448120	10.421500154	3.5067865378	0.0043428972	ZNF664
202218_s_at	0.9441086145	10.419469194	3.5108561389	0.0043428972	FADS2
201855_s_at	1.6942677599	10.404613398	3.5407899232	0.0043529038	ATMIN
242096_at	-0.954841841	-10.39490143	3.5605180523	0.0043529038	242096_at
202342_s_at	-1.100159895	-10.39429717	3.5617496669	0.0043529038	TRIM2
223703_at	-1.099891132	-10.39034958	3.5698078828	0.0043529038	C10orf11
235198_at	-0.968881278	-10.38844453	3.5737041651	0.0043529038	OSTM1

204310_s_at	-1.022176136	-10.38827364	3.574053922	0.004352903	NPR2
204484_at	1.085405560	10.38664021	3.577398959	0.004352903	PIK3C2B
210511_s_at	-1.232337258	-10.38120254	3.588560564	0.004352903	INHBA
1560527_at	-1.139317272	-10.38021189	3.590598344	0.004352903	NF-E4
239481_at	-1.074648072	-10.37133066	3.608926727	0.004365444	FAM133A
210692_s_at	1.214077469	10.35960146	3.633297918	0.004385222	SLC43A3
223218_s_at	-1.888486755	-10.34754004	3.658557363	0.004405982	NFKBIZ
225355_at	1.089886647	10.34217050	3.669867468	0.004406439	NEURL1B
243629_x_at	0.964679947	10.33971392	3.675055298	0.004406439	243629_x_at
209365_s_at	-1.340854519	-10.33287667	3.689538806	0.004414125	ECM1
225536_at	-1.064289511	-10.32728972	3.701422614	0.004418674	TMEM54
225205_at	1.071009607	10.31903252	3.719067025	0.004430065	KIF3B
230067_at	1.476255527	10.29763260	3.765248241	0.004459886	FAM124A
224800_at	1.252565857	10.29666751	3.767346435	0.004459886	WDFY1
38241_at	0.972993655	10.29418376	3.772752519	0.004459886	BTN3A3
1555973_at	0.998271808	10.28873341	3.784646978	0.004459886	1555973_at
222043_at	1.003621250	10.28678337	3.788913120	0.004459886	CLU
212230_at	-1.069707942	-10.28468079	3.793519154	0.004459886	PPAP2B
212288_at	-0.960296246	-10.28118048	3.801201463	0.004459886	FNBP1
225160_x_at	1.245072216	10.27688917	3.810644274	0.004461391	MDM2
1558501_at	-2.237809477	-10.26427634	3.838555011	0.004484465	DNM3
204662_at	1.042999458	10.25661402	3.855625781	0.004494804	CP110
224679_at	1.157650477	10.24867275	3.873410353	0.004505930	MESDC2
204237_at	1.381541483	10.23929655	3.894530260	0.004520879	GULP1
224888_at	1.149973807	10.21580720	3.948024944	0.004563945	SELI
212151_at	1.044013851	10.21379723	3.952641610	0.004563945	PBX1
229461_x_at	1.032114848	10.21204491	3.956671587	0.004563945	NEGR1
208600_s_at	-1.073404922	-10.19316259	4.000398472	0.004604669	GPR39
214866_at	-1.036254747	-10.18332963	4.023389478	0.004621403	PLAUR
212473_s_at	-2.118898665	-10.16973881	4.055417909	0.004628548	MICAL2
203555_at	0.971092867	10.16909528	4.056941741	0.004628548	PTPN18
240052_at	1.096933689	10.16810508	4.059287731	0.004628548	ITPR1
210223_s_at	-0.965740201	-10.16169211	4.074519306	0.004628548	MR1
213793_s_at	0.940748046	10.16087099	4.076474324	0.004628548	HOMER1
213131_at	1.121790206	10.15841707	4.082323326	0.004628548	OLFM1
238017_at	-1.467314755	-10.14725761	4.109044431	0.004628548	SDR16C5
225108_at	1.167603393	10.14385118	4.117241153	0.004628548	AGPS
210757_x_at	1.504408322	10.14166931	4.122501157	0.004628548	DAB2
200732_s_at	1.066032976	10.14035566	4.125672058	0.004628548	PTP4A1
213865_at	-1.374587014	-10.13882644	4.129366315	0.004628548	DCBLD2
1557174_a_a	0.916631655	10.13379533	4.141548088	0.004628548	1557174_a_at
234994_at	-1.736962958	-10.13109806	4.148095984	0.004628548	TMEM200A
232298_at	1.607791818	10.13108515	4.148127365	0.004628548	hCG_1806964
209598_at	-1.832103509	-10.12678121	4.158600418	0.004630783	PNMA2
222693_at	-0.987174355	-10.11339292	4.191374228	0.004645960	FNDC3B
210519_s_at	0.914853168	10.11332778	4.191534420	0.004645960	NQO1
213033_s_at	1.623946091	10.11081363	4.197722316	0.004645960	NFIB
225432_s_at	1.373976331	10.09943794	4.225852268	0.004657916	CSRP2BP
205259_at	1.084630560	10.09720199	4.231406867	0.004657916	NR3C2
209457_at	-2.441899556	-10.09208319	4.244154747	0.004657916	DUSP5
222436_s_at	0.933621297	10.08515219	4.261486292	0.004657916	222436_s_at
241343_at	1.103197742	10.08429557	4.263634011	0.004657916	RNASEH1
224983_at	1.217672028	10.08276242	4.267480995	0.004657916	SCARB2
211653_x_at	1.194755809	10.08249212	4.268159658	0.004657916	AKR1C2
210154_at	1.309320849	10.07679358	4.282496225	0.004664252	ME2
226992_at	-0.999339052	-10.05658159	4.333795170	0.004710740	NOSTRIN

226034_at	-1.806373951	-10.04925782	4.352557628	0.004718342	226034_at
240873_x_at	1.413041452	10.04462494	4.364474683	0.004718342	DAB2
226689_at	0.926837310	10.04376981	4.366678426	0.004718342	CISD2
204510_at	1.089262483	10.03541010	4.388289704	0.004732342	CDC7
225589_at	0.946390492	10.01574229	4.439621834	0.004775841	SH3RF1
219901_at	-0.973905519	-10.00928982	4.456612877	0.004775841	FGD6
242648_at	1.325821209	10.00920244	4.456843484	0.004775841	KLHL8
221193_s_at	0.963597977	10.00559767	4.466368938	0.004775841	ZCCHC10
201279_s_at	1.519611814	10.00046757	4.479965454	0.004775841	DAB2
226290_at	1.136950087	10.00006439	4.481036044	0.004775841	BDP1
202710_at	1.012582980	9.99505373	4.494365715	0.004780728	BET1
226962_at	1.516142509	9.98692565	4.516085724	0.004786520	ZBTB41
217540_at	1.577396190	9.98617049	4.518109808	0.004786520	FAM55C
208764_s_at	1.037911015	9.98320291	4.526074059	0.004786520	ATP5G2
206626_x_at	-1.035037369	-9.97799785	4.540082194	0.004792065	SSX1
209396_s_at	0.980030619	9.97167535	4.557164819	0.004795252	CHI3L1
236312_at	1.542153945	9.97039155	4.560642536	0.004795252	236312_at
222636_at	1.334526991	9.94989482	4.616582412	0.004823349	MED28
235587_at	1.315794475	9.94967925	4.617174936	0.004823349	LOC202781
223044_at	-2.166412609	-9.94728479	4.623762273	0.004823349	SLC40A1
1553995_a_a	-1.509760733	-9.94535167	4.629088315	0.004823349	NT5E
204014_at	-2.319771633	-9.94201493	4.638298205	0.004823349	DUSP4
227176_at	2.096318877	9.94129201	4.640296327	0.004823349	SLC2A13
228245_s_at	1.080486609	9.93381357	4.661024924	0.004826932	228245_s_at
221503_s_at	0.943536047	9.93141044	4.667708459	0.004826932	KPNA3
219408_at	1.087577093	9.92823043	4.676569636	0.004826932	PRMT7
222549_at	-1.155674829	-9.92733934	4.679056169	0.004826932	CLDN1
205395_s_at	0.985281519	9.92335707	4.690186994	0.004829302	MRE11A
1552388_at	1.236971222	9.91909567	4.702131795	0.004831969	FLJ30901
201681_s_at	1.492834996	9.91613463	4.710452268	0.004831969	DLG5
1554997_a_a	-1.009108925	-9.90434267	4.743756110	0.004841543	PTGS2
218392_x_at	1.157588579	9.90371531	4.745535543	0.004841543	SFXN1
225356_at	1.076247555	9.90342781	4.746351252	0.004841543	225356_at
230076_at	1.558875277	9.89726787	4.763867435	0.004847021	PITPNM3
204617_s_at	0.958156257	9.89530978	4.769450959	0.004847021	ACD
203445_s_at	1.350336275	9.87614958	4.824486078	0.004879310	CTDSP2
1555929_s_a	1.154552304	9.87510456	4.827508712	0.004879310	1555929_s_at
225922_at	-1.266947918	-9.87372203	4.831510909	0.004879310	FNIP2
225195_at	-0.906653188	-9.86978230	4.842936797	0.004879310	DPH3
203921_at	-0.921083948	-9.86366960	4.860726282	0.004879310	CHST2
1554408_a_a	0.988501365	9.86278096	4.863318710	0.004879310	TK1
225350_s_at	0.907270871	9.86186111	4.866003849	0.004879310	ZYG11B
203884_s_at	1.146343087	9.85959811	4.872617090	0.004879310	RAB11FIP2
219973_at	-0.977347335	-9.84534356	4.914512140	0.004890313	ARSJ
208866_at	-0.979034921	-9.84118783	4.926804065	0.004890313	CSNK1A1
202533_s_at	0.958712779	9.83912380	4.932922268	0.004890313	DHFR
240798_at	1.003684285	9.83690804	4.939499936	0.004890313	240798_at
228131_at	0.886506071	9.83354833	4.949492816	0.004890313	ERCC1
209629_s_at	0.920229198	9.83311538	4.950782252	0.004890313	NXT2
214787_at	1.033954772	9.83307412	4.950905148	0.004890313	DENND4A
231192_at	-1.255536552	-9.83164663	4.955159406	0.004890313	LPAR3
220748_s_at	0.886482729	9.82557953	4.973287832	0.004899360	ZNF580
214164_x_at	-0.926898837	-9.82229282	4.983140334	0.004900237	CA12
1555074_a_a	1.183088634	9.81442338	5.006821874	0.004908939	KCNH5
210383_at	1.766073516	9.81338833	5.009946284	0.004908939	SCN1A
228992_at	1.639399530	9.80858401	5.024478069	0.004914370	MED28

218806_s_at	1.035974496	9.8006075117	5.048712115	0.004917662	VAV3
212942_s_at	-2.139710353	-9.797813901	5.057231393	0.004917662	KIAA1199
230370_x_at	-1.156294615	-9.795895222	5.063092104	0.004917662	STYXL1
224672_x_at	1.010141832	9.795656953	5.063820458	0.004917662	MESDC2
223194_s_at	-1.337101066	-9.791828924	5.075538696	0.004920302	SLC22A23
202842_s_at	-0.981155473	-9.788587881	5.085484476	0.004921218	DNAJB9
211728_s_at	-0.919810109	-9.784817098	5.097084110	0.004923729	HYAL3
202916_s_at	1.671484732	9.774650849	5.128509433	0.004945348	FAM20B
202826_at	-0.959594987	-9.766644907	5.156534474	0.004963618	SPINT1
207661_s_at	0.952246099	9.756409139	5.185457923	0.004978417	SH3PXD2A
202054_s_at	1.285378428	9.754926040	5.190119892	0.004978417	ALDH3A2
223093_at	1.176542305	9.751510831	5.200873600	0.004979995	ANKH