



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse
présentée pour l'obtention du
Doctorat de l'Université Henri Poincaré
Mention Biologie Cellulaire et Nutrition

par Stéphane Poulain

Validation d'outils moléculaires pour la cancérologie clinique
Étude de l'expression des récepteurs aux rétinoïdes dans les
cancers bronchiques

Soutenue publiquement le 12 Juin 2009

Membres du jury :

Rapporteurs :

Dr. Caroline Leroux, Directrice de Recherches INRA (HDR), Lyon

Dr. Christian Bronner, Chargé de Recherches INSERM (HDR), Strasbourg

Examineurs :

Dr. Nadine Martinet, Directrice de Recherches INSERM, Paris - Nancy (Directrice de thèse)

Dr. Marie-Christiane Carré, Chargée de Recherches INSERM, Nancy

Dr. Stanislas du Manoir, Chargé de Recherches INSERM, Strasbourg

Pr. Jean-Michel Vignaud, Responsable du Centre de Ressources Biologiques, CHU de Nancy
et Représentant de l'Unité 724 INSERM, Faculté de Médecine de Nancy (Président du jury)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier la Région Lorraine et l'INSERM qui m'ont soutenu financièrement ainsi que le CHU de Nancy et la Faculté de Médecine de Nancy qui m'ont employé durant mes études doctorales, ils ont ainsi rendu ce travail possible.

Mes remerciements vont tout particulièrement au Dr. Nadine Martinet, qui m'a donné la chance de procéder à ce travail de thèse, pour tout ce qu'elle m'a appris d'un point de vue professionnel et d'un point de vue personnel, pour m'avoir toujours soutenu, aidé, et surtout pour m'avoir toujours poussé vers l'avant afin de progresser. Son travail de Recherches ainsi que la vision du Métier qu'elle m'a inculqué sont et seront toujours pour moi un exemple à suivre.

Je remercie également le Pr. Jean-Louis Guéant, directeur de l'Unité 724 INSERM et le Pr. Jean-Michel Vignaud, responsable du Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nancy, ainsi que tous les membres de leurs équipes qui m'ont accueilli dans leurs laboratoires et avec qui j'ai beaucoup apprécié travailler.

Je remercie les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail et pour leur patience : le Dr. Caroline Leroux, le Dr. Christian Bronner ainsi que le Dr. Stanislas du Manoir.

Je remercie le Dr. Marie-Christiane Carré et les équipes du DCPR de l'ENSIC de Nancy qui m'ont accueilli en stage dans leur laboratoire, ainsi que le Dr. Catherine Gouyette qui nous a reçu à la plate-forme de synthèse d'oligonucléotides de l'Institut Pasteur de Paris.

Je remercie le Dr. Bon-Chu Chung de l'Institut de Biologie Moléculaire de l'Academia Sinica de Taipei ainsi que le Dr. Pan-Chyr Yang du Centre de Médecine Génomique de l'Université Nationale de Taiwan et le Dr. Tsu-Chung Chang du Laboratoire de Biochimie du National Defence Medical Center de Taipei, ainsi que tous les membres de leurs équipes de recherches pour m'avoir accueilli chaleureusement.

Je remercie également les stagiaires que j'ai encadré : Ahmed, Charlotte, Nicolas, Imad et Maoussi, ainsi que les personnels d'Eurogentec, Labgene, Stratagene, Qiagen et Applied Biosystems pour m'avoir aidé dans mon travail.

Je remercie mes amis : Mick&Patricia, Vincent, Raymond, Cyril, Darya et tous les autres, ainsi que tous mes collègues de fac avec qui j'ai partagé beaucoup d'instant mémorables au cours de mes années d'études.

Je remercie enfin mes parents, mes grands-parents ainsi que toute ma famille, pour avoir toujours cru en moi et pour avoir toujours été là pour moi quand j'avais besoin d'eux. Ce travail est également pour vous.

Sommaire

INTRODUCTION.....	p.17
A. PRÉAMBULE.....	p.18
B. LE CANCER DU POUMON.....	p.22
1. ANATOMIE, HISTOLOGIE ET FONCTIONS PRINCIPALES DU POUMON NORMAL.....	p.22
2. ÉPIDÉMIOLOGIE DU CANCER BRONCHIQUE NON-À PETITES CELLULES.....	p.24
2.1. Incidence et mortalité du cancer du poumon.....	p.24
2.2. Les facteurs de risques.....	p.26
2.2.1. Le tabagisme.....	p.27
2.2.1.1. Tabagisme actif.....	p.27
2.2.1.2. Tabagisme passif.....	p.32
2.2.2. L'amiante.....	p.33
2.2.3. Le radon.....	p.33
2.2.4. Les facteurs de risque professionnels.....	p.34
2.2.5. Le régime alimentaire.....	p.34
2.2.6. Les susceptibilités génétiques.....	p.36
2.2.7. Autres facteurs de risque.....	p.37
3. TYPES HISTOLOGIQUES.....	p.37
3.1. Les cancers bronchiques non-à petites cellules.....	p.38
3.1.1. Adénocarcinomes.....	p.38
3.1.2. Carcinomes épidermoïdes.....	p.40
3.1.3. Carcinomes à grandes cellules.....	p.41
3.2. Les cancers bronchiques à petites cellules.....	p.42
4. PROCESSUS DE CARCINOGENÈSE BRONCHIQUE.....	p.43
4.1. Les différentes étapes de l'oncogénèse.....	p.44
4.2 Altérations génétiques.....	p.46
4.2.1. Oncogènes.....	p.48
4.2.1.1. Gènes de la famille myc.....	p.48
4.2.1.2. Gènes de la famille ras.....	p.48
4.2.1.3. ErbB.....	p.49

4.2.1.4. Cyclooxygénases 1 et 2 (COX-1 et COX-2).....	p.49
4.2.1.5. Bombésine/gastrin releasing peptide (GRP).....	p.50
4.2.1.6. Bcl-2.....	p.50
4.2.2. Gènes suppresseurs de tumeurs.....	p.50
4.2.2.1. p53.....	p.51
4.2.2.2. Voie p16-Cycline D1-Rétinoblastome (Rb).....	p.51
4.3. Cascade métastatique.....	p.52
5. DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT.....	p.56
5.1. Stades de cancérisation selon la classification TNM.....	p.57
5.2. Traitements.....	p.59
5.2.1. Chirurgie.....	p.59
5.2.2. Chimiothérapie.....	p.60
5.2.3. Radiothérapie.....	p.63
5.2.4. Autres traitements.....	p.64
C. LA VITAMINE A ET LES RÉTINOÏDES.....	p.66
1. GÉNÉRALITÉS.....	p.66
1.1. Historique.....	p.66
1.2. Définitions et descriptions.....	p.67
1.3. Sources de Vit.A.....	p.68
1.4. Rôles de la Vit.A/Rétinoïdes.....	p.73
2. MÉTABOLISME DE LA VIT.A/RÉTINOÏDES.....	p.75
D. LES RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES.....	p.81
E. RÉTINOÏDES ET DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME RESPIRATOIRE.....	p.88
F. MODÈLES DE SOURIS KNOCK-OUT POUR LES RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES	p.92
G. RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES ET CANCER DU POUMON.....	p.94
H. RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES ET LÉSIONS PRÉCURSEURS DE L'ÉPITHÉLIUM BRONCHIQUE.....	p.96

I. RÉTINOÏDES ET CHIMIOPRÉVENTION DES CANCERS BRONCHIQUES.....	p.98
J. OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	p.101
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	p.103
A. ORIGINE DES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES ET CULTURE CELLULAIRE.....	p.104
1. ÉCHANTILLONS DE TUMEURS BRONCHIQUES.....	p.104
2. ÉCHANTILLONS DE TRACHÉES HUMAINES NORMALES.....	p.105
3. CELLULES ÉPITHÉLIALES BRONCHIQUES HUMAINES DIFFÉRENCIÉES.....	p.106
4. CELLULES ÉPITHÉLIALES BRONCHIQUES HUMAINES NON DIFFÉRENCIÉES.....	p.107
5. CELLULES MUSCULAIRES LISSES.....	p.108
6. CELLULES DE L'ÉPIDERME.....	p.108
7. LIGNÉES CELLULAIRES.....	p.108
B. ANALYSE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DES RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES.....	p.110
1. EXTRACTION D'ARN TOTAL.....	p.110
1.1. Principes.....	p.110
1.2. Méthode.....	p.110
2. TRANSCRIPTION INVERSE DE L'ARN.....	p.113
2.1. Principes.....	p.113
2.2. Méthode.....	p.113
3. AMPLIFICATION EN CHAÎNE DES ADNc.....	p.114
3.1. Principes.....	p.114
3.1.1. La Réaction de Polymérisation en Chaîne conventionnelle.....	p.114
3.1.2. La PCR quantitative en temps réel.....	p.118
3.1.3. Les systèmes de détection utilisés en qRT-PCR.....	p.119
3.1.3.1. Les agents intercalants.....	p.119
3.1.3.2. Les sondes fluorogéniques.....	p.121
3.1.3.2.1. Un principe de base : le quenching par effet FRET.....	p.121
3.1.3.2.2. Les sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman.....	p.122

C. ÉTUDE DE LA RÉGION GÉNOMIQUE RARβ.....	p.153
1. TRANSCRITS NON VALIDÉS SITUÉS DANS LA RÉGION GÉNOMIQUE RARβ.....	p.153
1.1. Dessin des amorces de PCR.....	p.153
1.2. Amplification par RT-PCR des transcrits RAR β non validés.....	p.153
2. ANALYSE <i>in silico</i> DES RÉGIONS PROMOTRICES POTENTIELLES SITUÉES EN AMONT DES TRANSCRITS NON VALIDÉS.....	p.155
3. CLONAGE DE LA RÉGION CONSERVÉE P1'-RARβ.....	p.156
3.1. Extraction de l'ADNg des CEBHD.....	p.156
3.2. Dessin des amorces de PCR.....	p.157
3.3. Amplification par PCR de la région P1'-RAR β	p.158
3.4. Purification des amplicons P1'-RAR β sens et inverse.....	p.158
3.5. Digestion enzymatique des amplicons P1'-RAR β sens et inverse.....	p.160
3.6. Purification des inserts de clonage P1'-RAR β sens et inverse.....	p.161
3.7. Description du vecteur de clonage.....	p.161
3.8. Digestion enzymatique du vecteur de clonage.....	p.163
3.9. Ligation des inserts P1'-RAR β sens et inverse au vecteur de clonage.....	p.164
3.10. Transformation des bactéries.....	p.165
3.11. Sélection des bactéries transformées.....	p.166
3.12. Repiquage des bactéries transformées.....	p.166
3.13. Analyse des bactéries repiquées.....	p.168
3.14. Purification des plasmides P1'-RAR β sens et inverse (Miniprep).....	p.168
3.15. Séquençage des plasmides P1'-RAR β sens et inverse.....	p.170
4. ANALYSE <i>in vitro</i> DE L'ACTIVITÉ DE LA RÉGION PROMOTRICE POTENTIELLE P1'-RARβ.....	p.172
4.1. Culture cellulaire.....	p.172
4.2. Transfection cellulaire.....	p.173
4.3. Analyse de l'activité de la région promotrice potentielle P1'-RAR β	p.179
D. ÉTUDE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE NUCLÉAIRE DE RARβ.....	p.181
1. DESSIN DE L'ANTICORPS RARβ.....	p.181
2. EXTRACTION DES PROTÉINES NUCLÉAIRES.....	p.182
2.1. Principe.....	p.182

2.2. Méthode.....	p.182
3. WESTERN-BLOT.....	p.184
3.1. Principes.....	p.184
3.1.1. Préparation des échantillons.....	p.185
3.1.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	p.186
3.1.3. Transfert sur membrane (immunobuvardage ou immunoblot).....	p.186
3.1.4. Blocage des sites non spécifiques.....	p.186
3.1.5. Détection.....	p.187
3.1.5.1. Anticorps primaire.....	p.187
3.1.5.2. Anticorps secondaire.....	p.188
3.1.5.3. Analyse.....	p.188
3.2. Méthode.....	p.190
4. IMMUNOPRECIPITATION.....	p.191
4.1. Principes.....	p.191
4.2. Méthode.....	p.192
4.2.1. Conjugaison de l'anticorps RAR β à la protéine A immobilisée.....	p.192
4.2.2. Liaison covalente de l'anticorps RAR β au gel d'agarose.....	p.193
4.2.3. Immunoprécipitation des protéines RAR β	p.194
4.2.4. Éluion des protéines RAR β immunoprécipitées.....	p.194
4.2.5 Analyse de l'échantillon.....	p.194
RÉSULTATS.....	p.195
A. QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DES RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES.....	p.197
B. ÉTUDE DE LA RÉGION GÉNOMIQUE RARβ.....	p.210
1. TRANSCRITS NON VALIDÉS SITUÉS DANS LA RÉGION GÉNOMIQUE RARβ.....	p.210
2. ANALYSE <i>in silico</i> DES RÉGIONS PROMOTRICES POTENTIELLES SITUÉES EN AMONT DES TRANSCRITS NON VALIDÉS.....	p.213
3. CLONAGE DE LA RÉGION CONSERVÉE P1'-RARβ.....	p.213
4. ANALYSE <i>in vitro</i> DE L'ACTIVITÉ DE LA RÉGION PROMOTRICE POTENTIELLE P1'-RARβ.....	p.217
C. ÉTUDE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE NUCLÉAIRE DE RARβ.....	p.219

DISCUSSION.....	p.221
CONCLUSIONS-PERSPECTIVES.....	p.232
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	p.236
COMMUNICATION SCIENTIFIQUE.....	p.252

Liste des Abréviations

- **9-cis AR** : Acide Rétinoïque 9-cis
- **13-cis AR** : Acide Rétinoïque 13-cis
- **AAH** : Hyperplasie Adénomateuse Atypique
- **ADC** : ADénoCarcinome
- **ADH** : Alcohol DeHydrogenase
- **ADNc** : ADN complémentaire
- **ADNg** : ADN génomique
- **AE** : Efficacité d'Amplification
- **AF-1** : Fonction de transActivation ligand-indépendante
- **AF-2** : Fonction de transActivation ligand-dépendante
- **AINS** : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
- **AKR** : Aldo-Keto Reductase
- **AR** : Acide Rétinoïque
- **ARAT** : Retinol Acyl Transferase
- **ARNc** : ARN complémentaire
- **ARNm** : ARN messenger
- **ARNr** : ARN ribosomal
- **ARNt** : ARN total
- **at-AR** : Acide Rétinoïque tout trans
- **at-rétinol** : rétinol tout trans
- **Av.mAE** : moyenne globale de toutes les mAE
- **BAC** : Carcinome Broncho-Alvéolaire
- **BET** : Bromure d'Éthidium
- **BSA** : SérumAlbumine Bovine
- **CBCSq** : Cancer Bronchique à Cellules Squameuses
- **CBNPC** : Cancer Bronchique Non-à Petites Cellules
- **CBPC** : Cancer Bronchique à Petites Cellules
- **CCD** : Charge-Coupled Device
- **CDK** : Cycline-Dépendant Kinase
- **CEBHD** : Cellules Épithéliales Bronchiques Humaines Différenciées
- **CEBHND** : Cellules Épithéliales Bronchiques Humaines Non Différenciées
- **cfu** : colony forming unit
- **CGC** : Carcinome à Grandes Cellules
- **CIAP** : Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
- **CIS** : Carcinome In Situ
- **CML** : Cellules Musculaires Lisses
- **COX** : CycloOXygenase
- **Cp** : Crossing Point
- **CRABP** : Cellular Retinoic Acid Binding Protein
- **CRB** : Centre de Ressources Biologiques
- **CRBP** : Cellular Retinol Binding Protein
- **Ct** : Treshold Cycle
- **CYP** : Cytochrome P
- **Da** : Dalton
- **DBD** : DNA Binding Domain
- **DEPC** : DiÉthylène PyroCarbonate
- **DR** : Répétition Directe

- **dNTP** : désoxyriboNucléotide Tri-Phosphate
- **DO** : Densité Optique
- **DSS** : DiSuccinimidyl Suberate
- **DTT** : DiThio-Thréitol
- **EDFA** : Eau Déminéralisée, Filtrée, Autoclavée
- **EDTA** : Éthylène Diamine TétraAcétique
- **EGF** : Epidermal Growth Factor
- **EST** : Expressed Sequence Tag
- **ER** : Équivalent Rétinol
- **FRET** : Fluorescence Resonance Energy Transfer
- **GAPDH** : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
- **GRP** : Gastrin Releasing Peptide
- **GSM** : Gène Suppresseur de Métastase
- **HAP** : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
- **HAT** : Histone Acetyl Transferase
- **HDAC** : Histone DeAcetylase-Containing
- **HIS** : Hybridation In Situ
- **HRE** : Elément de Réponse aux Hormones stéroïdiennes
- **HPRT** : Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransférase
- **IHC** : Immuno Histo Chemistry
- **IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique
- **IUPAC** : Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
- **IUBMB** : Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire
- **LB** : Lysogeny Broth
- **LBA** : Lavage Broncho-Alvéolaire
- **LBD** : Ligand Binding Domain
- **LDL** : Low Density Lipoprotein
- **LED** : Light-Emitting Diode
- **LOH** : Loss of Heterozygosity
- **LRAT** : Lecithine Retinol Acyl Transférase
- **mAE** : Efficacité d'Amplification moyenne
- **MEC** : Matrice Extra-Cellulaire
- **MGB** : Minor Groove Binder
- **miARN**: micro-ARN
- **MMP** : Matrix MetalloProteinase
- **mTOP** : Take-Off Point moyen
- **MW** : Molecular Weight
- **NCBI** : National Center for Biological Information
- **N-CoR** : CoRépresseur Nucléaire
- **NSCLC** : Non-Small Cells Lung Cancer
- **pb** : paire de bases
- **PBS** : Phosphate Buffer Saline
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PML** : ProMyelocytik Leukemia
- **PMT** : Tube PhotoMultiplificateur
- **PNA** : Peptide Nucleic Acids
- **PPAR** : Peroxysomal Proliferator-Activated Receptor
- **PSM** : Poste de Sécurité Microbiologique
- **pu** : purine
- **p/v** : poids sur volume

- **PVDF** : PolyFluorure de VinyliDène
- **qPCR** : PCR quantitative
- **qRT-PCR** : PCR quantitative en temps réel
- **qsp** : quantité suffisante pour
- **RAL** : RetinALdehyde
- **RALDH** : RetinALdehyde Dehydrogenase
- **RAR** : Récepteurs aux Acides Rétinoïques
- **RARE** : Elément de Réponse aux Acides Rétinoïques
- **Rb** : Rétinoblastome
- **RBP** : Retinol Binding Protein
- **RDH** : Retinol DeHydrogenase
- **Refseq** : Séquence de Référence
- **REH** : Retinol Ester Hydrolase
- **RFU** : Relative Fluorescence Units
- **RODH** : RetinOl DeHydrogénase
- **ROL** : RetinOL
- **rpm** : rotation par minute
- **RR** : Récepteur au Rétinoïdes
- **RT** : Reverse Transcription
- **RXR** : Récepteurs aux Rétinoïdes X
- **RXRE** : Elément de Réponse aux Rétinoïdes X
- **SD** : Déviation Standard
- **SDS** : DodécylSulfate de Sodium
- **SE** : Erreur Standard
- **SNP** : Single Nucleotide Polymorphism
- **SOC** : Super Optimal broth with Catabolic repression
- **SCLC** : Small Cells Lung Cancer
- **SDR** : Short-chain Dehydrogenase/Reductase
- **SHR** : Steroid Hormones Receptor
- **SMCC** : Srb and Mediator protein Containing Complex
- **SMRT** : Médiateur Silencieux des Récepteurs nucléaires
- **SQCLC** : Squamous Cell Lung Carcinoma
- **SVF** : Sérum de Veau Fœtal
- **Ta** : Température d'appariement
- **TEP** : Tomographie par Émission de Positrons
- **TFIIH** : Facteur de Transcription général
- **TIF** : Facteurs de Transcription Intermédiaire
- **TOP** : Take-Off Point
- **Tm** : melting temperature (température de fusion)
- **TR** : Thyroid Receptor
- **TTR** : TransThyRetine
- **UCSC** : Université de Californie Santa-Cruz
- **UI** : Unité Internationale
- **UV** : Ultra-Violets
- **Vit.A** : Vitamine A
- **v/v** : volume pour volume
- **XP** : Xeroderma Pigmentosum

Liste de Figures

Figure 1. Anatomie des poumons humains.	p.22
Figure 2. Courbes d'espérance de vie présentant l'intérêt de l'arrêt du tabagisme dans une population de 34 000 médecins anglais avec un suivi de 50 ans (1951-2001).	p.30
Figure 3. Adénocarcinome pulmonaire.	p.39
Figure 4. Carcinome épidermoïde bronchique.	p.41
Figure 5. Carcinome neuroendocrine à grande cellules.	p.41
Figure 6. Carcinome bronchique à petites cellules.	p.42
Figure 7. Présentation des différents modèles génétiques de la progression tumorale.	p.45
Figure 8. Régulation des différentes phases du cycle cellulaire par les cyclines et autres régulateurs.	p.52
Figure 9. Présentation des différentes étapes de la cascade métastatique.	p.53
Figure 10. Présentation des différents médicaments utilisés en chimiothérapie ainsi que les phases du cycle cellulaire sur lesquelles ils agissent.	p.62
Figure 11. Formules des principaux composés chimiques naturels appartenant à la famille de la Vit.A.	p.68
Figure 12. Principales sources alimentaires en Vit.A/rétinoïdes.	p.71
Figure 13. Interconversion des différentes formes de Vit.A.	p.73
Figure 14. Métabolisme physiologique de la Vit.A/Rétinoïdes.	p.76
Figure 15. Métabolisme cellulaire de la Vit.A/Rétinoïdes.	p.76
Figure 16. Représentation schématique d'un récepteur nucléaire de type RR.	p.83
Figure 17. Présentation des modalités de liaison des dimères de RRs à leurs éléments de réponse.	p.85
Figure 18. Représentation schématique du mécanisme d'action en 3 étapes permettant aux dimères de RRs d'activer la transcription de leurs gènes cibles.	p.87
Figure 19. Présentation du développement prénatal du système respiratoire humain.	p.89
Figure 20. Représentation schématique des structures histologiques et cytologiques composant les différentes structures du système respiratoire.	p.90
Figure 21. Histopathologie des cancers bronchiques.	p.97
Figure 22. Pathogénèse moléculaire des cancers bronchiques.	p.98
Figure 23. Présentation des différentes étapes thermiques d'une réaction de PCR.	p.115

Figure 24. Amplification exponentielle de la séquence cible au cours d'une réaction de PCR.	p.115
Figure 25. Présentation des différentes phases cinétiques d'une réaction de PCR et comparaison entre PCR conventionnelle et PCR en temps réel.	p.117
Figure 26. Présentation des principales caractéristiques associées à une courbe d'amplification par PCR en temps réel.	p.117
Figure 27. Présentation des différentes étapes d'une réaction de PCR en temps réel utilisant le Syber Green comme système de détection des amplicons.	p.120
Figure 28. Présentation des différentes étapes d'une réaction de PCR en temps réel utilisant la sonde Taqman comme système de détection des amplicons.	p.123
Figure 29. Photographies des principaux appareils de PCR en temps réel.	p.125
Figure 30. Représentation schématique du RotorGene 6000 (Corbett Research).	p.128
Figure 31. Représentation schématique de l'i-Cycler iQ (BioRad).	p.130
Figure 32. Représentation schématique du Mx3005P (Stratagene).	p.131
Figure 33. Démarche utilisée en qRT-PCR pour quantifier le nombre de copies initiales (N_0) de matrice cible présentes dans un échantillon.	p.142
Figure 34. Exemples de courbes d'amplification (résultats bruts) obtenues lors de l'amplification de la β -actine en utilisant les dilutions d'ADNc $1/10^{\text{ème}}$, $1/50^{\text{ème}}$ et $1/100^{\text{ème}}$ en triplicats (RotorGene 6000 Series version 1.7.87).	p.148
Figure 35. Exemples de dérivées secondes et de résultats obtenus lors de l'utilisation du module de quantification comparative inclus dans le logiciel du RotorGene.	p.150
Figure 36. Description du vecteur de clonage : le plasmide pGL3 Basic.	p.162
Figure 37. Description du plasmide contrôle : le plasmide pRL-TK.	p.174
Figure 38. Représentation schématique du mode d'action du réactif de transfection jetPEI.	p.175
Figure 39. Représentation schématique du protocole expérimental utilisé pour la transfection cellulaire.	p.176
Figure 40. Représentation schématique du protocole expérimental utilisé pour la révélation des fluorescences firefly et <i>Renilla</i> luciférase.	p.179
Figure 41. Représentation schématique des différentes étapes d'une expérience de Western-Blot.	p.185
Figure 42. Représentation schématique des différentes étapes d'une expérience d'immunoprécipitation.	p.191

Figure 43. Analyse des différents échantillons d'ARNt extraits sur gel d'agarose à 0,8% p/v.	p.196
Figure 44. Représentation graphique des ratios relatifs d'expression génique obtenus pour RAR β dans les différents échantillons.	p.205
Figure 45. Représentation graphique des ratios relatifs d'expression génique obtenus pour RAR α , RAR γ et RXR α dans les différents échantillons.	p.206
Figure 46. Représentation schématique de la région génomique humaine RAR β	p.211
Figure 47. Visualisation des amplicons P1'-RAR β sens et inverse sur gel d'agarose à 1%.	p.214
Figure 48. Visualisation sur gel d'agarose à 1% des amplicons P1'-RAR β sens et inverse avant et après purification sur colonne.	p.214
Figure 49. Visualisation sur gel d'agarose à 1% du plasmide pGL3 avant et après coupure enzymatique et purification.	p.215
Figure 50. Visualisation sur gel d'agarose à 1% des amplicons P1'-RAR β sens et inverse obtenus à partir de l'ADN extrait des bactéries transformées.	p.216
Figure 51. Visualisation sur gel d'agarose à 1% des plasmides extraits des bactéries par miniprep.	p.216
Figure 52. Visualisation sur gel d'agarose à 1% des fragments de restriction obtenus suite à la coupure des plasmides pGL3+P1'-RAR β sens et inverse par les enzymes de restriction Mlu I et Xho I.	p.217
Figure 53. Résultats de l'analyse des extraits protéiques nucléaires BEAS-2B et CEBHD par western-blot et immunoprécipitation en utilisant le nouvel anticorps RAR β	p.220

Liste de Tableaux

Tableau 1. Altérations de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes dans différentes lignées cellulaires cancéreuses bronchiques.	p.47
Tableau 2. Présentation des différents stades de la classification TNM.	p.58
Tableau 3. Présentation du pourcentage des besoins quotidiens en Vit.A d'un adulte fournis par 100 g de chaque aliment.	p.70
Tableau 4. Apports conseillés en Vit.A, en ER et par jour.	p.71
Tableau 5. Clonage et localisation chromosomique des gènes RRs chez l'homme et la souris.	p.82
Tableau 6. Caractéristiques techniques des principaux appareils de qRT-PCR.	p.126
Tableau 7. Séquences des différentes amorces et sondes Taqman dessinées pour les RRs.	p.196
Tableau 8. Présentation des données brutes recueillies lors des expériences de qRT-PCR.	p.198
Tableau 9. Présentation des résultats de l'analyse des données brutes de qRT-PCR par le logiciel Bestkeeper.	p.200
Tableau 10. Résultats de la transformation des données brutes de qRT-PCR en ratios d'expression relative par le logiciel REST-RG.	p.204
Tableau 11. Présentation des données brutes recueillies lors des expériences de qRT-PCR utilisant les échantillons de tumeurs CBCSq.	p.209
Tableau 12. Présentation des résultats de l'analyse par Bestkeeper des données brutes de qRT-PCR obtenues pour les échantillons de tumeurs CBCSq.	p.209
Tableau 13. Séquences des différentes amorces de PCR utilisées pour amplifier les transcrits situés en amont de P2-RAR β	p.212
Tableau 14. Résultats des ratios de fluorescence firefly luciferase / <i>Renilla</i> luciferase obtenus suite à la transfection des cellules BEAS-2B et MDA-MB-231 par les plasmides pGL3+P1'RAR β sens et inverse.	p.218

INTRODUCTION

A. PRÉAMBULE

En dépit des campagnes de prévention anti-tabac, le cancer du poumon demeure le premier type de cancer mortel dans les pays développés ([Peto et al., 1992](#)). En l'absence d'outils diagnostiques précoces, le pronostic associé à cette maladie reste faible. Cependant, les observations épidémiologiques ainsi que des découvertes positives obtenues en laboratoires ont généré l'espoir d'utiliser la vitamine A (Vit.A) et les rétinoïdes pour la chimioprévention des cancers bronchiques chez les individus à risques.

En effet, (A) il existe une corrélation inverse entre l'apport en fruits et légumes contenant de la pro-vitamine A (caroténoïdes) et le risque de développer un cancer du poumon ([Cooper et al., 1999](#)). (B) Il existe également une similarité entre les lésions bronchiques observées chez les animaux traités par des carcinogènes (métaplasies squameuses) et les changements histologiques affectant l'épithélium bronchique des hommes ou des animaux carencés en Vit.A. La restauration d'un aspect histologique normal apparaît après réplétion des sujets en Vit.A et, dans certains modèles expérimentaux, ceci confère également une protection contre les pro-carcinogènes comme le benzo[a]pyrène ([Saffiotti et al., 1967](#)). (C) De plus, les fumeurs présentent en général plus de métaplasies squameuses que les non-fumeurs ([Misset et al., 1986](#)) et, par ailleurs, le processus multi-étapes conduisant à un cancer bronchique à cellules squameuses (CBCSq) débute également par une métaplasie squameuse ([Hecht, 2002](#)). (D) Des études antérieures ont montré que les rétinoïdes diminuent globalement l'incidence d'un second cancer primaire chez les patients atteints de tumeurs de la tête et du cou ([Hong et al., 1990](#)). L'acide rétinoïque all-trans (at-AR) s'est montré efficace pour annuler les lésions orales prénéoplasiques et renforcer la régression des néoplasies intra-épithéliales cervicales ([Toma et al., 1999](#)).

Dans ce context prometteur, au milieu des années 80, des essais de chimioprévention utilisant la Vit.A/rétinoïdes ont débuté. Dans de petites études non contrôlées, l'étrétinate a été démontré capable, d'annuler les métaplasies squameuses bronchiques chez des fumeurs chroniques ([Gouveia et al., 1982](#)). Cependant, des essais contrôlés réalisés dans les années 90 n'ont pas confirmé ces premiers résultats. Dans la même période, ont débuté d'importantes études pour la prévention primaire des tumeurs liées au tabagisme. Quatre d'entre elles se sont terminées en rapportant de fortes augmentations de l'incidence du cancer du poumon, décrivant même le β -carotène comme un carcinogène humain potentiel, comme par exemple dans les essais α -tocophérol/ β -carotène, utilisant ou non le β -carotène, et inclus dans les études sur l'efficacité du rétinol, ou encore dans les études Physician's Health avec ou sans β -carotène et, plus récemment, dans les résultats de l'étude EUROSCAN suite à la supplémentation des individus à risques par du palmitate de rétinyl et/ou de la N-acétyl cystéine ([Lee et al., 1954](#); [Omenn et al., 1996](#); [Hennekens et al., 1996](#) et [van Zandwijk et al., 2000](#)).

La structure chimique relativement simple de la Vitamine A (Vit.A)/rétinoïdes a permis de développer de nombreux rétinoïdes de synthèse et, dès 1976, [Sporn et al.](#) ont utilisé en culture des anneaux trachéaux de hamsters carencés en Vit.A, comme modèle d'étude simple de métaplasie bronchique squameuse, afin de tester la capacité de la Vit.A et de ses dérivés synthétiques à restaurer un épithélium bronchique normal.

Un ensemble d'autres études a montré que la Vit.A/rétinoïdes jouent un rôle majeur dans la croissance, la mort et la différenciation des tissus adultes et embryonnaires normaux ou anormaux. L'effet anti-tumoral le plus spectaculaire a été démontré pour l'Acide Rétinoïque tout-trans (at-AR) dans le cas des leucémies aiguës promyélocytiques (PML) ([Warrel et al., 1991](#)).

Partant de ces résultats, certains dérivés ont été testés *in vivo* pour traiter des tumeurs pulmonaires à des stades avancés, dans le cadre d'approches moins cytotoxiques alternatives à

la chimiothérapie. Cependant, peu de réponses objectives ont été apportées suite à l'utilisation d'une combinaison α -interféron/ α -AR dans le cadre de cancers bronchiques non-à petites cellules (CBNPC) pré-traités par des séances de chimio et/ou de radiothérapie ([Roth et al., 1994](#)).

La découverte de récepteurs nucléaires pour les rétinoïdes : les Récepteurs à l'Acide Rétinoïque (RARs) et les Récepteurs aux Rétinoïdes X (RXRs), a considérablement amélioré la compréhension du signal rétinoïde ([Chambon, 1996](#)). Des modèles spécifiques de souris knock-out ont été créés afin de disséquer le rôle de chaque gène de Récepteur aux Rétinoïdes (RR) au cours de l'embryogénèse ([Gronemeyer et al., 2004](#)). Des rétinoïdes synthétiques spécifiques d'un RAR ou d'un RXR, ainsi que de nouveaux rétinoïdes capables de surmonter la résistance à l'acide rétinoïque (AR) observée dans certaines lignées cellulaires de CBNPC, ont été synthétisés ([Sun et al., 2000](#)). Les rétinoïdes spécifiques des RARs sont en général plus actifs pour ralentir la croissance cellulaire que ceux spécifiques des RXRs. Néanmoins, à des concentrations suboptimales, les agonistes des RARs agissent en synergie avec les agonistes des RXRs et potentialisent leur action afin d'inhiber la prolifération des cellules malignes. Dans des cultures primaires de cellules épithéliales de trachées de lapins, des agonistes RAR α + β ou des pan-agonistes RARs se sont révélés nécessaires pour inhiber les métaplasies squameuses, mais des agonistes spécifiques de RAR γ se sont révélés capables, à eux seuls, d'induire l'arrêt de croissance et l'apoptose des cellules prolifératives basales ([Boisvieux-Ulrich et al., 2000](#)). Dans les cellules épithéliales bronchiques humaines, l'utilisation combinée d'AR et de rétinoïdes spécifiques des RARs (mais pas ceux spécifiques des RXRs) a permis d'inhiber la différenciation squameuse et d'induire l'expression ARNm du gène CYP26, dont le défaut de régulation pourrait expliquer un catabolisme insuffisant de l'AR ([Kim et al., 2000](#)).

Des preuves se sont accumulées sur l'implication majeure du gène RAR β dans le cancer du poumon. De futurs essais de chimioprévention des cancers bronchiques pourraient utiliser de nouveaux rétinoïdes mais, sans une compréhension scientifique accrue des mécanismes moléculaires de base participant à la signalisation de la Vit.A/rétinoïdes dans les cellules bronchiques, ces essais apparaîtraient contraires à l'éthique. C'est avec l'objectif d'accroître ces connaissances que cette étude a été réalisée.

B. LE CANCER DU POUMON

1. ANATOMIE, HISTOLOGIE ET FONCTIONS PRINCIPALES DU POUMON NORMAL

Le poumon droit est constitué de trois lobes, tandis que le gauche est constitué de deux lobes en raison de l'espace occupé par le cœur. Les poumons d'un adulte peuvent contenir environ trois litres d'air. Puisque les poumons n'ont pas de muscles, ce sont les muscles thoraciques, et essentiellement le diaphragme, qui sont chargés du travail de la respiration. L'air inspiré descend dans la trachée, et se répand jusqu'aux bronches, qui pénètrent dans les poumons droit et gauche au niveau du hile. Les bronches elles-mêmes se ramifient en plusieurs bronchioles qui se divisent à leur tour en une demi-douzaine de canaux alvéolaires, étroits conduits s'ouvrant dans les sacs alvéolaires ([Figure 1](#)) ([Wheater et al., 1987](#)).

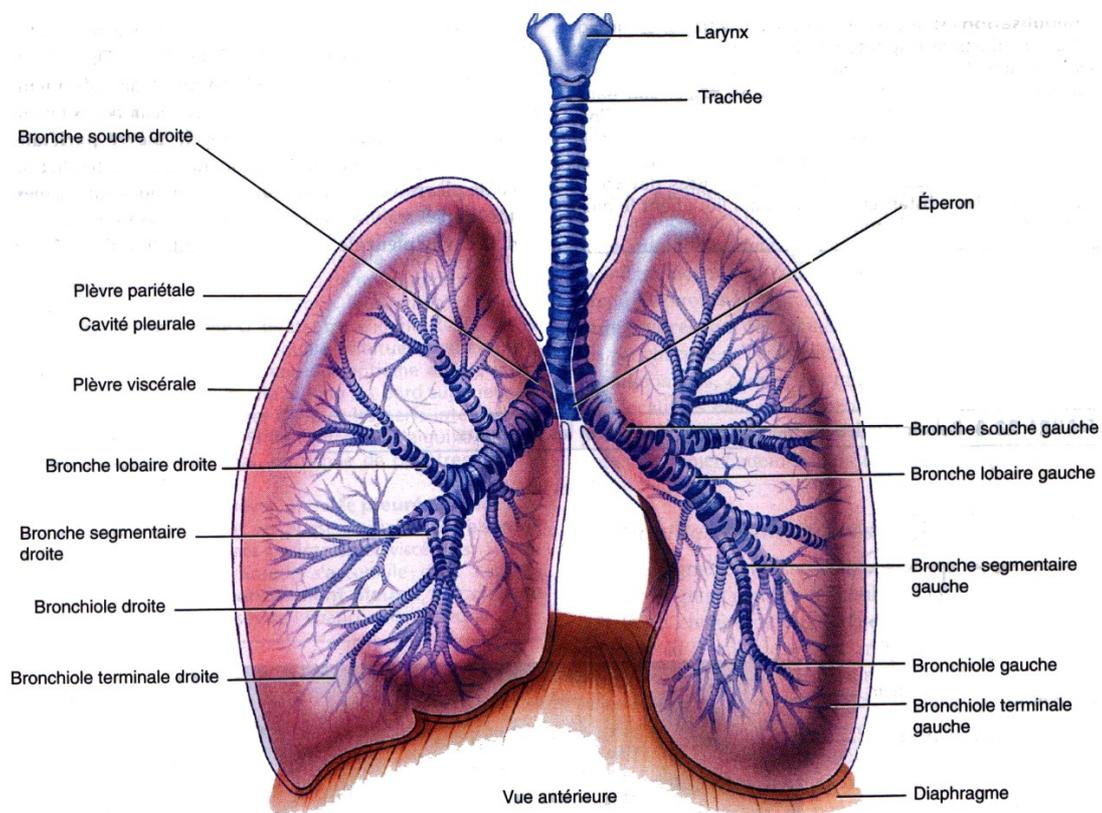


Figure 1. Anatomie des poumons humains.

(Source : Présentation powerpoint M. Bronner, Cancérogénèse Bronchique et Rétinoïdes, Novembre 2006)

Les bronches sont constituées d'un épithélium en surface et de glandes dans le chorion sous muqueux. L'épithélium est cylindrique cilié mucipare et pseudostratifié : il repose sur une lame basale régulière et comprend plusieurs types cellulaires :

- les cellules ciliées à mucus qui se situent en surface et au contact de l'air,
- les cellules basales qui ancrent l'épithélium dans la lame basale et séparent l'épithélium bronchique du chorion sous muqueux. Ce sont des cellules suprabasales, à petits grains de mucus qui seraient totipotentes et susceptibles de se différencier sous l'action d'une irritation prolongée.
- les cellules neuroendocrines (cellules de Kulchitsky) sont dispersées tout le long de l'appareil respiratoire. Elles sécrètent des hormones peptidiques, telles que la calcitonine, la bombésine et la sérotonine.

Le tissu conjonctif sous muqueux contient les glandes bronchiques. Leurs acini sont formés de cellules séreuses et muqueuses qui deviennent moins nombreuses dans les voies aériennes de plus petit calibre. Elles sont remplacées par les cellules de Clara qui sécrètent des molécules de surfactant et ont un rôle dans la détoxification grâce à leur production de cytochrome p450. Ce sont des cellules de réparation au même titre que les cellules basales.

Les alvéoles ont un diamètre de 150 à 500 μm et sont au nombre de 300 millions chez un homme de 70 kg. L'épithélium alvéolaire est constitué de deux types de cellules formant un revêtement continu. La majeure partie de la surface alvéolaire est revêtue par de grandes cellules très aplaties appelées pneumocytes de type I. Un deuxième type de cellules, représentant 60% des cellules de l'épithélium mais seulement 5% de la surface, sont les pneumocytes de type II. Ils sécrètent le surfactant, un agent tensioactif qui, en réduisant la tension superficielle, empêche les alvéoles de se collaber pendant l'expiration. Le réseau capillaire couvre 85% des 140 m^2 de la surface alvéolaire, ce qui représente une interface air-sang de 126 m^2 .

Le poumon remplit plusieurs fonctions. Il permet les échanges gazeux entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Il procure l'oxygène nécessaire à l'organisme et élimine le CO₂ produit par le métabolisme. Il participe également à la protection immunitaire de l'organisme car il comporte du tissu lymphoïde associé aux muqueuses, ainsi qu'au métabolisme de certains xénobiotiques.

L'air inspiré est conduit par les bronches puis les bronchioles jusqu'aux alvéoles pulmonaires où l'oxygène traverse alors la membrane de la paroi alvéolaire pour être transféré vers les globules rouges contenus dans les capillaires. Inversement, les déchets gazeux passent des globules rouges aux alvéoles afin d'être éliminés lors de l'expiration ([Wheater et al., 1987](#)).

2. ÉPIDÉMIOLOGIE DU CANCER BRONCHIQUE NON-À PETITES CELLULES

2.1. Incidence et mortalité du cancer du poumon

Le cancer du poumon représente un problème de santé publique majeur. Avec 1,2 millions de nouveaux cas diagnostiqués chaque année dans le monde (900 000 chez les hommes et 300 000 chez les femmes), c'est l'un des types de cancers les plus fréquents chez l'homme comme chez la femme. C'est aussi la cause principale de mort par cancer dans le monde et le cancer du poumon représente à lui seul plus d'un sixième des décès imputables aux cancers. L'incidence et la mortalité par cancer du poumon sont les plus fortes dans les pays industrialisés, en particulier en Europe et aux États-Unis, et les plus faibles en Afrique sud-saharienne. Cependant, l'incidence du cancer du poumon tend à augmenter très rapidement dans les pays en voie de développement ([Bilello et al., 2002](#)).

Plus de 90% des patients affectés par un cancer du poumon en meurent. Près de 25 000 nouveaux cas de cancers du poumon et autant de décès causés par cette maladie sont déclarés chaque année en France. Le tabagisme est la première cause de cancer du poumon et

son incidence, dans une population donnée, reflète de façon précise les habitudes de tabagisme de cette population.

Le cancer du poumon est une maladie très virulente qui, en l'absence de symptômes réellement spécifiques, est souvent diagnostiquée tardivement. En effet, dans la majorité des cas, la tumeur est déjà étendue au moment du diagnostic. De ce fait, le taux de survie moyen à 5 ans est faible : il est de l'ordre de 14% pour les CBNPCs et il chute drastiquement à près de 5% dans le cas des cancers bronchiques à petites cellules (CBPCs). Ceci explique également que l'incidence et la mortalité de cette maladie soient similaires. De plus, le taux de survie à 5 ans des CBNPCs n'a pas augmenté depuis 25 ans malgré les progrès thérapeutiques. Il en résulte que la prévention du cancer du poumon et le recours à des moyens diagnostiques précoces sont les éléments majeurs à développer pour lutter contre le cancer du poumon ([Martinet *et al.*, 1997](#); [Williams *et al.*, 2001](#)).

Le cancer du poumon affecte principalement les seniors. En effet, il apparaît rarement avant 40 ans et l'âge moyen du diagnostic dans le monde est de 65-70 ans, avec la moitié des nouveaux cas diagnostiqués chez des personnes âgées entre 65 et 79 ans ([Bilello *et al.*, 2002](#)). En France, l'âge moyen des malades est de 64 ans. Cependant, l'incidence du cancer du poumon tend à augmenter à la fois chez les sujets les plus âgés et chez les plus jeunes ([Bilello *et al.*, 2002](#)).

Depuis les années 1950, la mortalité par cancer du poumon chez les femmes a augmenté de 600%. Ceci est dû, comme préalablement chez les hommes, à l'augmentation importante de leur consommation tabagique. En effet, les femmes n'ont commencé à fumer en grand nombre qu'à partir de la seconde Guerre Mondiale. Certaines études suggèrent de plus que les femmes pourraient être plus sensibles que les hommes au cancer du poumon ([Tanoue, 2000](#); [Pauk *et al.*, 2005](#)).

Cette différence de sensibilité pourrait être due aux œstrogènes ([Stabile et al., 2002](#)). Si les femmes ont une susceptibilité biologique accrue au cancer du poumon, elle peut aussi être liée à des facteurs dits de sexe et genre. Les facteurs liés au sexe sont ceux responsables des différences biologiques entre hommes et femmes (hormones, système de reproduction). Les facteurs liés au genre résultent de différences sociétales existant entre hommes et femmes (exposition différentes en raison d'habitudes de consommation tabagique, ou de métiers non effectués par les femmes) ([Pauk et al., 2005](#)). Ces facteurs liés au sexe et au genre seraient associés à des différences d'activation et de détoxification des carcinogènes entre hommes et femmes. De plus, les femmes développent majoritairement des adénocarcinomes (ADC) alors que la prévalence des carcinomes épidermoïdes est la plus forte chez les hommes ([Bilello et al., 2002](#)).

En France, le cancer du poumon est à l'origine de 7,6% des décès masculins et 1,6% des décès féminins toutes causes confondues. La mortalité féminine a augmenté de 3% par an pendant ces 20 dernières années alors que la mortalité masculine a augmenté de 0,8% par an pendant la même période. De plus, les prévisions pour la période 2010-2014 annoncent une diminution de 3% chez l'homme, alors que chez la femme l'incidence du cancer du poumon pourrait augmenter de 60%. En France, des différences d'un sexe à l'autre sont également observées en fonction du degré d'urbanisation et des disparités socio-économiques.

2.2. Les facteurs de risques

La consommation de tabac, et en particulier celle de cigarettes, est responsable de plus de 90% de la mortalité par cancer du poumon dans le monde. Cependant, moins de 20% des fumeurs de cigarettes développent un cancer du poumon, ce qui suggère que d'autres facteurs jouent également un rôle dans le développement de cette maladie ([Bilello et al., 2002](#)).

Une étude originale de [Merill et Lyon \(2005\)](#) a comparé le risque de cancer du poumon dans l'Utah chez les Mormons et les non Mormons. En effet, du fait de leurs

convictions religieuses, les Mormons ont la consommation de tabac et d'alcool la plus faible des États-Unis, ainsi que le plus fort taux d'adultes mariés avec des enfants vivant dans le milieu familial. Cette étude montre un risque significativement inférieur chez les Mormons de développer un cancer, et en particulier un cancer du poumon.

Une étude de l'épidémiologie du cancer du poumon chez les non fumeurs montre que chez ces patients, certains facteurs professionnels tels que l'exposition à l'amiante et au radon jouent également un rôle dans l'apparition de la maladie ([Kreuser et al., 2001](#)).

2.2.1. Le tabagisme

2.2.1.1. Tabagisme actif

Dans les pays développés, plus de 90% des cas de cancer du poumon chez l'homme et 80% des cas chez la femme sont imputables au tabagisme ([Hoffman et al., 2000](#)).

Historiquement, les hommes ont commencé à fumer en grand nombre lors de la première Guerre Mondiale. Les femmes ont, quant-à elles, commencé à fumer en grand nombre 20 à 25 ans plus tard, lors de la deuxième Guerre Mondiale. Cette différence est reflétée dans les courbes de mortalité du cancer du poumon, la hausse de mortalité chez les femmes étant observée environ 20 ans après celle notée chez les hommes. L'incidence du cancer du poumon aujourd'hui reflète donc le degré de consommation de tabac qui avait cours il y a 20 ans ([Rioux, 2000](#)).

Au niveau mondial, on dénombre 1,3 milliards de fumeurs : 1,1 milliards d'hommes et 230 millions de femmes, soit près d'un tiers de la population de plus de 15 ans, qui consomment annuellement quelque 6000 milliards de cigarettes ([WHO, 2004](#)). C'est en Corée que l'on observe la plus forte prévalence du tabagisme au monde, qui est de 68% chez les hommes. L'ex-URSS, la République Dominicaine, le Tonga, la Turquie et la Chine suivent de près avec des taux de tabagisme de 67 à 61% chez les hommes, ce qui est plus du double des taux observés au Canada et aux USA ([WHO, 1996](#)). Si l'incidence du tabagisme commence à

diminuer un peu dans les pays industrialisés, elle augmente dramatiquement d'année en année dans les pays en voie de développement ([WHO, 2004](#)).

Les premières études montrant une association forte entre la consommation de cigarettes et le cancer du poumon datent de 1950 ([Doll et Hill](#)). Le risque de mourir d'un cancer du poumon chez les fumeurs est ainsi 10 fois plus élevé que chez les non-fumeurs. Il existe une relation dose-réponse très forte entre la consommation cumulée de cigarettes et le risque de mourir d'un cancer du poumon ([Billelo et al., 2002](#)). En effet, plus un individu commence jeune à fumer, plus le nombre de cigarettes consommées par jour est élevé et plus longtemps il fumera, accroissant ainsi son risque de développer un cancer du poumon ([Rioux, 2000](#)). Un homme fumant 20 cigarettes par jour a 22 fois plus de risque de développer un cancer du poumon qu'un homme n'ayant jamais fumé de sa vie ([Billelo et al., 2002](#)).

La fumée de cigarettes contient plus de 50 carcinogènes connus. Parmi eux se trouvent les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les N-nitrosamines qui nécessitent une activation métabolique avant d'exercer leur effet carcinogène. Les métabolites de ces composants sont très réactifs, ils sont capables de se fixer à l'ADN et de causer des mutations, notamment dans le gène suppresseur de tumeurs p53 et dans l'oncogène K-ras, tous deux impliqués dans la cancérogénèse de nombreux cancers, dont celui du poumon ([Billelo et al., 2002](#)). D'autres facteurs associés à la consommation tabagique contribuent à augmenter le risque de développer un cancer du poumon. Ce sont l'âge de début de la consommation tabagique, la durée de la consommation tabagique, une inhalation plus profonde de la fumée, les cigarettes contenant de fortes concentrations en nicotine et goudrons, et la consommation de cigarettes sans filtres ([Billelo et al., 2002](#)). Le pourcentage de jeunes fumeurs augmente et l'âge d'initiation au tabagisme diminue. Actuellement, 80% des fumeurs adultes ont commencé à fumer avant l'âge de 18 ans ([Rioux, 2000](#)). Une étude réalisée en 2001 par [Hirao et al.](#) montre, chez des patients présentant un carcinome

épidermoïde, une augmentation de la perte d'hétérozygotie 3p21 chez les patients ayant commencé le plus tôt à fumer. De plus, des changements dans la composition des cigarettes semblent avoir provoqué une modification de la prévalence des types histologiques, l'ADC devenant le type le plus répandu (Cf. [B.3.1.](#)) ([Bilello et al., 2002](#)). Ce changement de prévalence implique également un développement de métastases précoces plus fréquent ([Hoffman et al., 2000](#)).

La consommation tabagique crée une addiction chez le fumeur, due à la nicotine et à ses dérivés, en particulier les nitrosamines qui agissent sur les récepteurs nicotiques neuronaux à l'acétylcholine, dans les régions du cerveau contrôlant la volonté ([Minna, 2003](#)). La nicotine crée une dépendance dont seulement environ la moitié des fumeurs parviendra à se défaire. La cessation du tabagisme entraîne des effets de sevrage tels l'anxiété, l'irritabilité, la frustration, la rage, des céphalées, des difficultés de concentration, une augmentation de l'appétit et surtout une forte envie de fumer. Généralement, un fumeur ne cesse de fumer qu'après plusieurs tentatives d'arrêt. À peine 18% des fumeurs ayant commencé à fumer à 13 ans ou moins ont arrêté dans les 10 années suivantes, comparativement à 42% de ceux ayant commencé à 20 ans ou plus ([Rioux, 2000](#)).

L'arrêt du tabagisme, s'il n'annule pas en soi les risques de développer un cancer du poumon, permet de diminuer ce risque. Le risque relatif de développer un cancer du poumon chez les anciens fumeurs commence à diminuer après 5 ans de sevrage tabagique. Ce risque continue de diminuer ensuite sans toutefois jamais atteindre le risque relatif d'une personne n'ayant jamais fumé. De plus, l'arrêt de la consommation de tabac avant 40 ans réduit de plus de 90% le risque, attribué au tabac, de développer un cancer du poumon ([Bilello et al., 2002](#)).

Une étude, réalisée par [Doll et Hill](#) parue en 2004, retraçant la mortalité dans une population de 34 000 médecins anglais avec un suivi de plus de 50 ans (1951-2001), montre que les fumeurs meurent en moyenne 10 ans avant les non-fumeurs. Cette étude montre

également que l'arrêt du tabac vaut vraiment la peine et que plus un fumeur arrête de fumer tôt, plus le bénéfice au niveau de son espérance de vie est important (Figure 2). En effet, en arrêtant de fumer vers 30 ans, un gain en espérance de vie de 10 ans est observé. Un gain en espérance de vie de 7 ans est observé en arrêtant de fumer vers 40 ans, un gain de 4 ans en arrêtant vers 50 ans, et un gain d'1 an en arrêtant vers 60 ans.

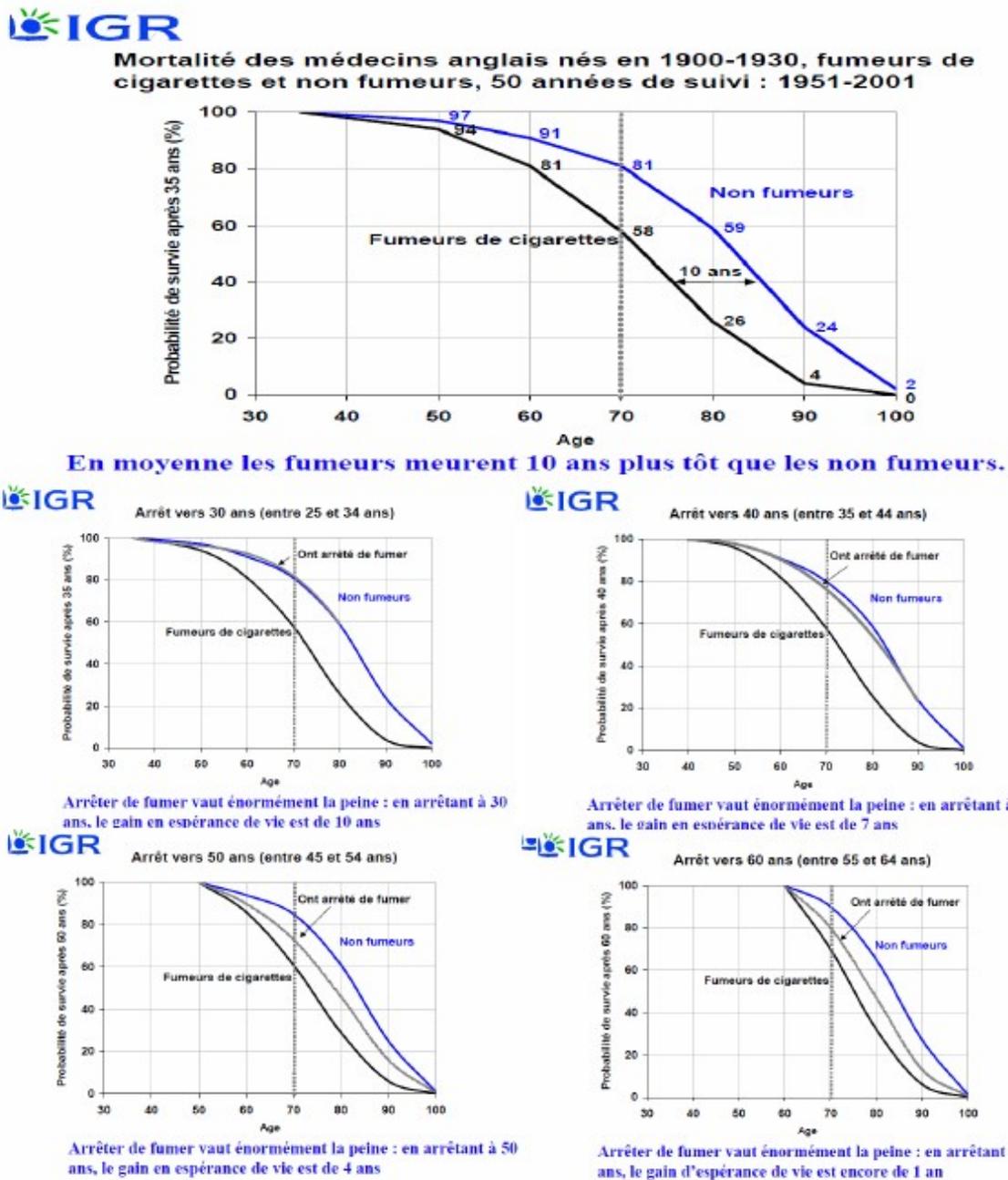


Figure 2. Courbes d'espérance de vie présentant l'intérêt de l'arrêt du tabagisme dans une population de 34 000 médecins anglais avec un suivi de 50 ans (1951-2001). [Doll R, Hill AB. The mortality of doctors in relation to their smoking habits: a preliminary report. 1954. BMJ 2004;328\(7455\):1529-33.](#) (Source : Hill C, Epidémiologie des cancers, Institut Gustave Roussy, 2006, <http://www.igr.fr/doc/cancer/pdf/prevention/dutab20061.pdf>)

Les effets de la fumée de cigare sur le risque d'apparition d'un cancer du poumon sont beaucoup moins étudiés. Toutefois, ce risque est réel et ne doit pas être négligé. En effet, la consommation de cigares multiplie le risque de développer un cancer du poumon par rapport aux non fumeurs ([Bilello et al., 2002](#)). De plus, le risque de survenue d'un cancer du poumon chez les fumeurs de pipe, bien que largement inférieur à celui des fumeurs de cigarettes, est non-négligeable et supérieur à celui des fumeurs de cigares. Ces différences sont liées, au moins en partie, à l'inhalation ou non de la fumée et au degré d'intensité de l'inhalation ([Milleron, 1995](#)). Les tabacs dits « sans fumée » (tabac à chiquer et tabac « à priser » ne constituent pas un réel facteur de risque pour le cancer du poumon. En revanche, ces tabacs sans fumée constituent un réel facteur de risque pour les cancers de la bouche, du larynx, de la gorge et de l'estomac ([WHO, 2006](#)).

La meilleure stratégie de prévention du cancer du poumon est donc l'arrêt de la consommation tabagique, ce qui implique, en termes de santé publique, la mise en place de mesures pour promouvoir la cessation du tabagisme mais aussi également pour prévenir l'initiation au tabagisme. Ces mesures consistent en France, comme dans la majorité des pays industrialisés, en une augmentation des coûts des produits dérivés du tabac (dont les cigarettes), en la diffusion de messages visant à informer de façon « coup de poing » les consommateurs des dangers du tabagisme sur les paquets de cigarettes comme par exemple « fumer tue » ou « fumer peut provoquer le cancer », en la limitation voire l'interdiction des publicités pour des produits dérivés du tabac, en des mesures de protection des non fumeurs dans les lieux publics ([Bilello et al., 2002](#)). L'augmentation de la taxation des cigarettes est, à ce jour, l'une des interventions les plus efficaces, surtout chez les jeunes. En effet, aucune autre maladie n'a montré une aussi forte relation entre une conduite, une habitude, qui sont évitables et l'incidence de la maladie ([Bilello et al., 2002](#)). Cependant, les interventions

actuelles au niveau de la prévention primaire du tabagisme sont insuffisantes pour faire fortement décliner le nombre de fumeurs, surtout de jeunes fumeurs ([Rioux, 2000](#)).

Le tabagisme ne se limite pas à l'induction du cancer du poumon, il limite également l'efficacité des traitements. En effet, la nicotine, qui n'est pas par elle-même un carcinogène, peut favoriser la prolifération cellulaire ainsi que l'angiogenèse et inhiber l'apoptose induite par certains agents. Ainsi, une étude de [Dasgupta et al.](#) (2006) montre que l'exposition à la nicotine réduit le potentiel apoptotique des agents de chimiothérapie. De ce fait, les malades traités pour un cancer du poumon qui continuent à fumer, ou les patients en sevrage qui prennent des substituts nicotiniques, sont faiblement répondeurs aux traitements.

2.2.1.2. Tabagisme passif

La composition chimique de la fumée inhalée directement de la cigarette et celle de la fumée d'une cigarette se consumant sont similaires ([Bilello et al., 2002](#)). En effet, plusieurs carcinogènes présents dans la fumée de cigarette inhalée, dont les nitrosamines, se dégagent directement du bout incandescent ou du filtre après une bouffée, ce qui constitue la fumée secondaire ([Rioux, 2000](#)). Ainsi, des carcinogènes spécifiques de l'absorption tabagique sont présents dans les urines de non-fumeurs exposés à la fumée de cigarettes ([Bilello et al., 2002](#)).

Il a été estimé que le risque de développer un cancer du poumon est augmenté de 30% pour une personne non fumeuse vivant avec un fumeur. De plus, il existe une relation dose-réponse aussi chez les fumeurs passifs. Les non fumeurs présentant le risque le plus important de développer un cancer bronchique sont ceux qui sont exposés au tabagisme dans leur environnement familial pendant l'enfance et l'adolescence ([Bilello et al., 2002](#)). Le risque de cancer du poumon chez les non fumeurs victimes de tabagisme passif semble être, comme chez les fumeurs, influencé par un certains nombre de facteurs génétiques ([Bilello et al., 2002](#)).

2.2.2. L'amiante

L'amiante a été utilisée de façon extensive pour ses propriétés isolantes et résistantes, dans la construction des maisons, des écoles et des bâtiments commerciaux, touchant ainsi une grande majorité de la population, à des taux néanmoins inférieurs à ceux des métiers à risques ([Bilello et al., 2002](#)).

La première étude montrant un risque accru de développer un cancer du poumon chez les personnes exposées à l'amiante date de 1955 ([Doll](#)). Le risque de cancer du poumon associé à une exposition à l'amiante varie en fonction du degré d'exposition, du type de fibre et de la consommation tabagique concomitante. En effet, si le risque de cancer du poumon est 6 fois supérieur chez les non fumeurs exposés à l'amiante, il est en revanche 59 fois supérieur chez les fumeurs exposés à l'amiante ([Bilello et al., 2002](#)).

2.2.3. Le radon

Le radon est un gaz inerte produit par la désintégration de l'uranium. Il est présent dans les sols et les roches, il est capable de diffuser à travers la terre et de ce fait peut être présent à plus ou moins fortes concentrations dans les habitations. Le radon produit des dérivés radioactifs à durée de vie courte qui émettent des particules α capables de détruire les épithéliums respiratoires ([Bilello et al., 2002](#)). Il existe une relation dose-réponse entre le degré d'exposition au radon et le risque de développer un cancer du poumon. De plus, il existe une synergie entre l'exposition au radon et la consommation tabagique ([Bilello et al., 2002](#)).

Bien que l'exposition domestique au radon ne confère pas les mêmes risques de développer un cancer que la consommation tabagique, le grand nombre de personnes exposées au radon « résidentiel » en fait une cause de survenue de cancer du poumon à ne pas négliger ([Bilello et al., 2002](#)).

2.2.4. Les facteurs de risque professionnels

Les carcinogènes connus d'origine professionnelle incluent l'amiante, les métaux lourds comme l'arsenic, le chrome et le nickel, les produits de la combustion du charbon, les radiations incluant le radon, les éthers de chlorométhyl, le chlorure de vinyle ainsi que les composés aromatiques polycycliques ([Bilello *et al.*, 2002](#); [Matakidou *et al.*, 2006](#)).

Aux États-Unis, 15% des cancers du poumon chez les hommes et 5% chez les femmes sont dus à une exposition répétée à des carcinogènes dans un cadre professionnel. 11,5% des cancers bronchiques sont provoqués par une exposition professionnelle à l'amiante. Il est, de plus, observé un risque supérieur de développer un cancer du poumon chez les mineurs d'uranium, qui sont exposés au radon, avec une relation dose-réponse ([Bilello *et al.*, 2002](#)). Le risque relatif aux facteurs professionnels augmente de façon significative et linéaire avec le nombre d'années passées dans un métier à risques ([Ruano-Ravina *et al.*, 2003](#)). La plupart des facteurs de risque professionnels agissent de façon synergique avec la consommation tabagique. Cette relation est particulièrement vraie pour l'amiante et le radon ([Bilello *et al.*, 2002](#)). L'amiante reste toutefois le facteur de risque professionnel le plus commun.

2.2.5. Le régime alimentaire

Diverses études épidémiologiques ont démontré que le contenu en matières grasses de l'alimentation joue un rôle important dans la carcinogénèse bronchique. Il a été observé une association dose-dépendante entre la consommation en grandes quantités de produits riches en matières grasses tels que les produits carnés « gras » (charcuterie, saucisses), les produits laitiers (lait entier, crèmes glacées), les œufs, et particulièrement les desserts (gâteaux, tartes aux fruits ou à la crème), et le risque de cancer du poumon. L'effet dose-réponse est particulièrement important chez les fumeurs, démontrant une synergie possible entre le tabagisme et un régime riche en matière grasse. De plus, un apport élevé en calories provenant

des matières grasses est statistiquement significativement associé à la mortalité du cancer du poumon ($p=0,001$), et ce après exclusion du tabagisme comme facteur de risque ([Rioux, 2000](#)). Un régime alimentaire riche en graisse ainsi que l'obésité, même chez les non fumeurs, sont associés avec un risque accru de développer un cancer du poumon ([Bilello *et al.*, 2002](#)).

De nombreuses études épidémiologiques ont montré une association entre un régime alimentaire riche en fruits et légumes et un risque moindre de développer un cancer du poumon. Le β -carotène, présent dans les fruits et légumes, est vraisemblablement l'agent protecteur principal responsable de cet effet bénéfique. En effet, les personnes consommant le moins d'aliments riches en β -carotène sont les plus à risque de développer un cancer du poumon. De plus, l'effet protecteur du β -carotène est supérieur chez les fumeurs ayant fumé plus longtemps. Une prévention du cancer du poumon par l'arrêt du tabagisme accompagnée d'un régime alimentaire équilibré représente un moyen efficace, simple à mettre en œuvre. Le β -carotène n'est toutefois pas la seule molécule impliquée. En effet, les personnes ayant un régime alimentaire riche en α -carotène et en lycopènes voient leur risque de cancer du poumon diminuer de 20 à 25% ([Bilello *et al.*, 2002](#)).

La consommation de carottes, de sauce tomate, d'huile de foie de morue, ainsi que d'aliments riches en vitamines (ou de compléments vitaminés) est associée à une diminution significative du risque de cancer du poumon. De même, d'autres micronutriments sont importants pour diminuer le risque de cancer du poumon, comme les flavonoïdes contenus dans les pommes et le thé ou les isocyanates présents entre autres dans les différentes sortes de choux. Les vitamines A, C et E, contenues dans les différents types d'aliments, sont proposées comme étant des molécules à effets bénéfiques protecteurs ([Williams *et al.*, 2001](#)).

En France, le Programme National Nutrition-Santé (PNNS) a, depuis 2001, déterminé 9 objectifs nutritionnels prioritaires en terme de santé publique. Le premier objectif consiste en l'augmentation de la consommation de fruits et légumes avec un apport quotidien

recommandé de 5 fruits et légumes différents. Les autres objectifs principaux comportent une augmentation de la consommation de calcium, une réduction des apports lipidiques totaux avec une diminution en particulier des acides gras saturés et monoinsaturés au profit des acides gras polyinsaturés, une augmentation de la consommation glucidique en favorisant en particulier la consommation d'aliments riches en amidon comme source d'énergie au détriment des sucres simples, une réduction de la consommation d'alcool et une augmentation de l'activité physique ([PNNS, 2001-2005](#)).

2.2.6. Les susceptibilités génétiques

Une étude de famille a montré que les fumeurs possédant dans leur famille une ou plusieurs personnes ayant développé un cancer du poumon, ont un risque de cancer bronchique 2 fois supérieur aux personnes n'ayant pas d'antécédant familial. Le risque de cancer du poumon est ainsi multiplié par 4 chez les non fumeurs ayant des antécédents familiaux de cancer du poumon. De même, les patients atteints de cancer du poumon sont statistiquement plus susceptibles d'avoir un ou plusieurs cas de cancer du poumon dans leur famille ([Bilello *et al.*, 2002](#)).

Des études sur les différences d'expression de produits de gènes de métabolisation des carcinogènes du tabac et sur les mutations de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes ont procuré des preuves plus directes de l'implication des susceptibilités génétiques dans le risque de développer un cancer du poumon. Les carcinogènes de la fumée de cigarette sont oxydés par les enzymes du cytochrome P450 en intermédiaires réactifs qui sont finalement transformés en formes excrétables par des enzymes telles la glutathion S-transférase. En particulier, les enzymes CYP1A1 et GSTM1 sont inductibles par la fumée de cigarette et leur expression est incriminée dans le risque de cancer du poumon ([Bilello *et al.*, 2002](#)).

Le gène p53 est muté dans plus de 50% des cancers du poumon, les mutations du gène K-ras sont quant-à elles mises en évidence dans 25 à 50% des ADCs ([Bilello *et al.*, 2002](#);

[Matakidou et al., 2006](#)). Il a de plus été montré un lien intrafamilial entre le cancer du poumon, le cancer du larynx et celui du pharynx, et une région du chromosome 6q23-25 ([Schwartz et al., 2006](#)). Un risque accru de développer un cancer du poumon est également associé à une hétérozygotie de xeroderma pigmentosum (XP), une maladie autosomale récessive rare caractérisée par une prédisposition importante des cancers de la peau. La prédisposition du cancer du poumon associée à XP implique la voie de réparation de l'ADN par excision nucléotidique dans le processus de carcinogénèse lié au tabac ([Matakidou et al., 2006](#)). Certaines autres maladies à caractère héréditaire telles que le syndrome de Werner (sclérodémie atrophique récessive) ou le syndrome de Bloom (érythème congénital) sont associées à un risque augmenté de développer un cancer du poumon ([Matakidou et al., 2006](#)).

2.2.7. Autres facteurs de risque

Plusieurs maladies pulmonaires malignes préexistantes ont été associées avec un risque accru de cancer du poumon. Ces maladies incluent les bronchopneumopathies chroniques obstructives, la fibrose pulmonaire idiopathique, la pneumoconiose et la tuberculose. Les bronchopneumopathies chroniques obstructives présentent le plus fort risque de cancer bronchique associé ([Bilello et al., 2002](#)).

3. TYPES HISTOLOGIQUES

Les 2 types histologiques majeurs de cancer du poumon sont les cancers bronchiques non-à petites cellules (CBNPCs) et les cancers bronchiques à petites cellules (CBPCs). Ces 2 types de cancer bronchique présentent des caractéristiques cliniques différentes dans leur présentation, leur dissémination métastatique et leur réponse à la thérapie ([Travis, 2002](#)).

Le diagnostic du cancer bronchique peut être établi par histologie ou par cytologie. L'étude histologique dans le diagnostic du cancer du poumon est basée sur l'examen de divers types de prélèvements, incluant la bronchoscopie, la biopsie par aspiration, les lavages

broncho-alvéolaires (LBA) et les biopsies chirurgicales (thoracoscopie, biopsie d'excision, lobectomie ou pneumonectomie) ([Travis, 2002](#)).

3.1. Les cancers bronchiques non-à petites cellules

Les CBNPCs représentent 75% des cancers bronchiques ([Cersosimo, 2002](#)). Ils regroupent les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules car ces types histologiques présentent des caractéristiques cliniques et biologiques similaires ([Yokota et al., 2004](#)). Les CBNPCs sont relativement chimiorésistants et sont traités dans un premier temps par chirurgie si le diagnostic est assez précoce ([Yokota et al., 2004](#)).

3.1.1. Adénocarcinomes

Les adénocarcinomes (ADC) ([Figure 3](#)) représentent actuellement le type histologique de cancer du poumon le plus fréquent aux États-Unis et au Canada. Environ 30% des CBNPCs sont des ADCs. Ils sont souvent accompagnés d'une effusion pleurale maligne ([Travis, 2002](#)). Les ADCs sont caractérisés par le développement précoce de métastases alors que souvent les symptômes du développement de la tumeur primaire ne sont pas encore visibles ([Hoffman et al., 2000](#)).

Les ADCs sont divisés en plusieurs sous-groupes de cancers bronchiques qui comprennent les adénocarcinomes glandulaires, les adénocarcinomes papillaires, les adénocarcinomes bronchoalvéolaires et les adénocarcinomes muco-sécrétants. La plupart des ADCs sont histologiquement hétérogènes : ils consistent en au moins 2 types histologiques coexistants dans la même tumeur ([Travis, 2002](#)).

Les ADCs glandulaires sont caractérisés par le développement de cellules tumorales formant des glandes et des acini. Les ADCs papillaires sont caractérisés par le développement de structures papillaires à la surface de fins noyaux fibrovasculaires. Les ADCs bronchoalvéolaires sont peu communs, ils sont constitués de cellules uniformes cuboïdales

proliférant le long des septums alvéolaires. Les ADCs muco-sécrétants sont quant-à eux caractérisés par des cellules tumorales peu différenciées produisant de la mucine dans leur cytoplasme ([Travis, 2002](#)).

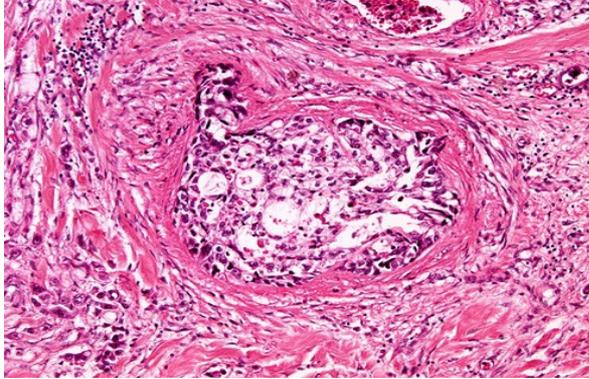


Figure 3. Adénocarcinome pulmonaire (coloration HES, Gx10).

(Source : <http://www.microscopyu.com/staticgallery/pathology/images/adenocarcinomaoflung10x01.jpg>)

Les ADCs sont rencontrés préférentiellement chez les femmes et les hommes jeunes. Les cancers du poumon se développant chez des non fumeurs sont typiquement des ADCs, de même que ceux se développant chez des ex-fumeurs ([Brambilla et al., 2001](#)). L'évolution de la fabrication des cigarettes avec d'abord l'utilisation d'un filtre puis la commercialisation de cigarettes « light » contenant des concentrations inférieures de nicotines et nitrosamines, semble être à l'origine de ce changement de type histologique prédominant ([Bilello et al., 2002](#)). En effet, initialement, le développement de cigarettes avec filtres et/ou à plus faible teneur en nicotine et en goudron a fait diminuer l'incidence des cancers du poumon.

Cependant, le risque chez les fumeurs de cigarettes avec filtre a ensuite graduellement augmenté pour atteindre le niveau de risque précédemment observé chez des fumeurs de cigarette sans filtre. De plus, les fumeurs de cigarettes à faible teneur en nicotine (moins de 1,2 mg de nicotine par cigarette) ont commencé à inhaler la fumée plus profondément afin de maintenir leur niveau d'absorption de nicotine. Une inhalation plus profonde augmente la biodisponibilité des nitrosamines au niveau des régions bronchoalvéolaires, favorisant ainsi le

développement d'ADCs ([Rioux, 2000](#); [Brooks et al., 2005](#)). Une autre hypothèse suggère que l'utilisation du filtre diminue la taille moyenne des particules de fumée inhalées favorisant leur dépôt dans des régions pulmonaires périphériques ([Brooks et al., 2005](#)).

3.1.2. Carcinomes épidermoïdes

Les carcinomes épidermoïdes ([Figure 4](#)) représentent environ 30% de l'ensemble des CBNPCs ([Travis, 2002](#)). Ils restent le type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué en Europe ([Hoffman et al., 2000](#); [Berg et al., 2005](#)). Deux tiers des carcinomes épidermoïdes sont formés par des tumeurs de localisation centrale, le tiers restant est constitué de tumeurs pulmonaires périphériques ([Travis, 2002](#)). Les carcinomes épidermoïdes sont constitués de cellules tumorales bien différenciées avec un cytoplasme abondant et kératinisé ([Travis, 2002](#)).

Il n'y a pas d'épithélium épidermoïde dans le poumon normal, et les carcinomes épidermoïdes proviennent de cellules épithéliales bronchiques par dysplasie épidermoïde ([Yokota et al., 2004](#)). La différenciation épidermoïde comprend la formation de ponts intercellulaires ainsi que la kératinisation sous 2 formes principales : la kératinisation unicellulaire et la kératinisation en couches concentriques de cellules squameuses anormales. Les carcinomes épidermoïdes se développent principalement dans les bronches segmentaires. La transformation des bronches lobaires et principales apparaît quant-à elle par extension.

Les carcinomes épidermoïdes sont divisés en plusieurs sous-groupes de cancers bronchiques qui comprennent les carcinomes épidermoïdes papillaires, les carcinomes épidermoïdes à cellules claires, les carcinomes épidermoïdes à petites cellules et les carcinomes épidermoïdes basaloïdes ([Travis, 2002](#)).

Parmi les CBNPCs, les carcinomes épidermoïdes sont les plus fréquemment rencontrés chez les fumeurs ([Le Calvez et al., 2005](#)).

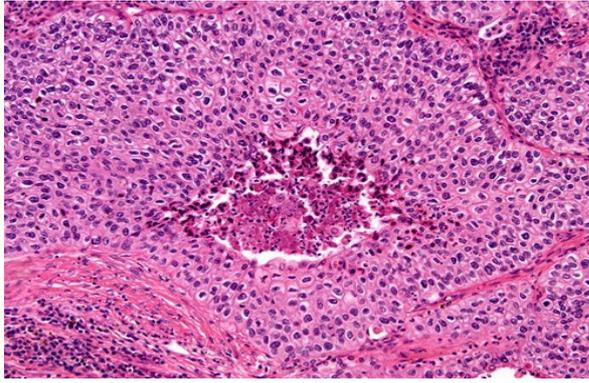


Figure 4. Carcinome épidermoïde bronchique (coloration HES, Gx10).
(Source : <http://www.microscopyu.com/staticgallery/pathology/images/epidermoidcarcinoma10x04.jpg>)

3.1.3. Carcinomes à grandes cellules

Les carcinomes à grandes cellules (CGC) ([Figure 5](#)) représentent 9% de l'ensemble des CBNPCs. La plupart du temps les CGCs se développent dans la périphérie pulmonaire. Ils peuvent cependant parfois avoir une localisation centrale ([Travis, 2002](#)).

Les CGCs sont caractérisés par l'apparition de grandes plages tumorales nécrotiques. Ils sont constitués de grandes cellules organisées en couches ou en nodules avec un cytoplasme abondant et des noyaux vésiculaires présentant un nucléole saillant. Les CGCs incluent les CGCs neuroendocrines, les CGCs basaloïdes et les CGCs à cellules claires ([Travis, 2002](#)).

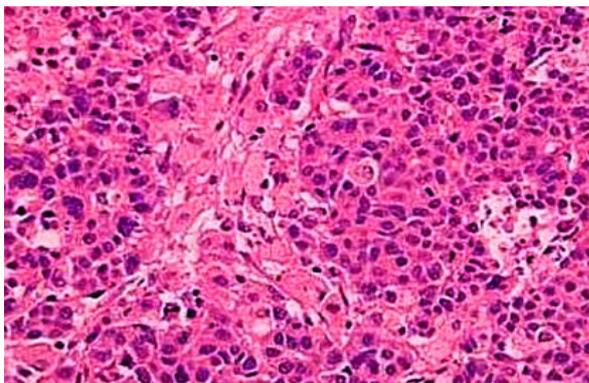


Figure 5. Carcinome neuroendocrine à grande cellules (coloration HES, Gx20).
(Source : <http://www.geocities.com/drroy200/LCNeu2.JPG>)

3.2. Les cancers bronchiques à petites cellules

Les CBPCs ([Figure 6](#)) proviennent de cellules épithéliales présentant des caractéristiques neuro-endocrines ([Yokota et al., 2004](#)). Ils représentent 20% de l'ensemble des cancers bronchiques. Deux tiers des CBPCs sont des masses tumorales péri-hilaires. Un CBPC typique est péri-bronchique avec infiltration de la sous-muqueuse bronchique et des tissus péri-bronchiques ([Travis, 2002](#)).

Les CBPCs sont caractérisés par le développement de petites cellules cancéreuses en amas denses avec un cytoplasme peu abondant, une chromatine nucléaire finement granulaire, un nucléole petit ou absent, et de multiples mitoses. Ce type de cancer bronchique provoque souvent l'apparition de métastases ganglionnaires nombreuses et d'une nécrose tissulaire importante ([Travis, 2002](#)).

Les CBPCs sont généralement agressifs avec une dissémination métastatique précoce. Ils présentent donc souvent des métastases au moment du diagnostic ([Travis, 2002](#)). Les lésions précancéreuses de ces cancers sont donc peu connus puisqu'ils sont déjà à des stades avancés au moment du diagnostic. Les CBPCs sont radio- et chimiosensibles, c'est pourquoi ils sont traités de façon quasi-systématique par ces 2 techniques ([Yokota et al., 2004](#)).

L'association avec la consommation tabagique est très forte pour Les CBPCs ([Hoffman et al., 2000](#); [Le Calvez et al., 2005](#)).

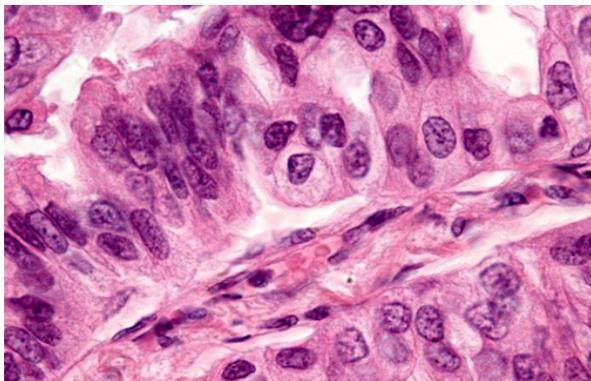


Figure 6. Carcinome bronchique à petites cellules (coloration HES, Gx40).
(Source : <http://www.microscopyu.com/staticgallery/pathology/alveolarcellcarcinoma40x01.html>)

4. PROCESSUS DE CARCINOGENÈSE BRONCHIQUE

Le but de l'étude moléculaire de la carcinogénèse bronchique est d'améliorer les techniques de diagnostic précoce et d'identifier les processus responsables de la prolifération cellulaire incontrôlée et de la dissémination métastatique, afin de transcrire la dysfonction de régulateurs « clés » du cycle cellulaire et de cascades de signalisation cellulaire en outils moléculaires pour la cancérologie clinique. L'épidémiologie moléculaire du cancer du poumon peut ainsi aider à l'élaboration de tests diagnostics précoces ou de nouvelles stratégies cliniques en complément de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie ([Fong et al., 2002](#)).

Le cancer bronchique est d'origine unicellulaire, provient d'un progéniteur commun, et se développe de façon hétérogène. Dans la majorité des cas, la cellule d'origine requiert jusqu'à 10 mutations pour se transformer en cellule maligne. Les agents mutagènes et carcinogènes créent des altérations génétiques qui, de concert avec un processus de réparation de l'ADN défaillant et une augmentation de la réplication, aboutissent finalement à l'émergence d'un phénotype malin. Plusieurs anomalies génétiques sont observées, avec une fréquence élevée dans la majorité des types de cancers du poumon. La population tumorale initiale, plutôt homogène, progresse vers une population plus hétérogène, et plus instable génétiquement. À ce stade, les cellules transformées sont plus susceptibles de présenter des cassures chromosomiques ainsi que des changements de ploïdie. Tous les clones pré-malins ou malins sont sujets à une sélection, les clones les mieux adaptés seront favorisés, notamment ceux qui échappent à la reconnaissance du système immunitaire, qui ont une expression accrue de facteurs de croissance et de leurs récepteurs, ou qui expriment des facteurs d'angiogénèse ([Rioux, 2000](#)).

Les carcinogènes majeurs contenus dans la fumée de cigarette sont les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) (comme le benzo[a]pyrène), les nitrosamines, et les

amines aromatiques. Les carcinogènes de la fumée de cigarette sont enzymatiquement activés en électrophiles chimiquement réactifs qui se fixent à l'ADN et produisent des lésions dans certains oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs, ainsi que dans les gènes codant pour des protéines de réparation de l'ADN.

La susceptibilité au cancer du poumon chez les fumeurs peut être reliée à la balance individuelle entre la capacité d'activation de procarcinogènes inhalés et la capacité de détoxification de ces carcinogènes. La susceptibilité individuelle au cancer du poumon peut être influencée par des polymorphismes génétiques et être modifiée par le tabac ([Fong et al., 2002](#)).

4.1. Les différentes étapes de l'oncogénèse

Les cancers résultent de la transformation progressive de lésions précurseurs. Les cellules pré-néoplasiques acquièrent des altérations génétiques somatiques qui évoluent par étapes vers une tumeur invasive par expansion clonale. Les stades de cancérisation passent de la cellule normale à l'hyperplasie (ou métaplasie), puis à la dysplasie, pour aboutir à la formation d'un carcinome *in situ* ([Fong et al., 2002](#)).

La première étape est souvent une perte allélique en 3p (FHIT), puis en 9p (p16), 13q (Rb), 8p et 17p, suivie par des mutations des gènes de la famille Ras. Viennent ensuite les mutations de p53 ([Fong et al., 2002](#); [Yokota et al., 2004](#)). La perte d'hétérozygotie sur les chromosomes 2q, 9p, 18q et 22q est significativement plus fréquente chez les patients présentant des métastases ([Yokota et al., 2004](#)).

Plusieurs modèles de la progression tumorale du cancer sont proposés. La formation de métastases peut provenir d'une cellule unique située dans la tumeur primaire. Dans ce cas, les gènes responsables du processus métastatique n'influencent pas la prolifération de la tumeur primaire, mais toutes les cellules métastatiques sont susceptibles de porter des gènes responsables du processus métastatique ([Figure 7A](#)). Cette formation métastatique peut avoir

lieu très tôt dans la carcinogénèse, la tumeur primaire et les métastases auront alors des croissances indépendantes ([Figure 7D](#)). Un autre modèle de développement tumoral du cancer du poumon peut être lié à l'apparition de plusieurs cellules à caractère métastatique dans la tumeur primaire produisant la formation de métastases et influençant les capacités de prolifération de la tumeur primaire ([Figure 7B](#)). Cette formation métastatique peut, là aussi, avoir lieu très tôt dans la carcinogénèse, la tumeur primaire et les métastases auront alors également des croissances indépendantes ([Figure 7C](#)) ([Yokota et al., 2004](#)).

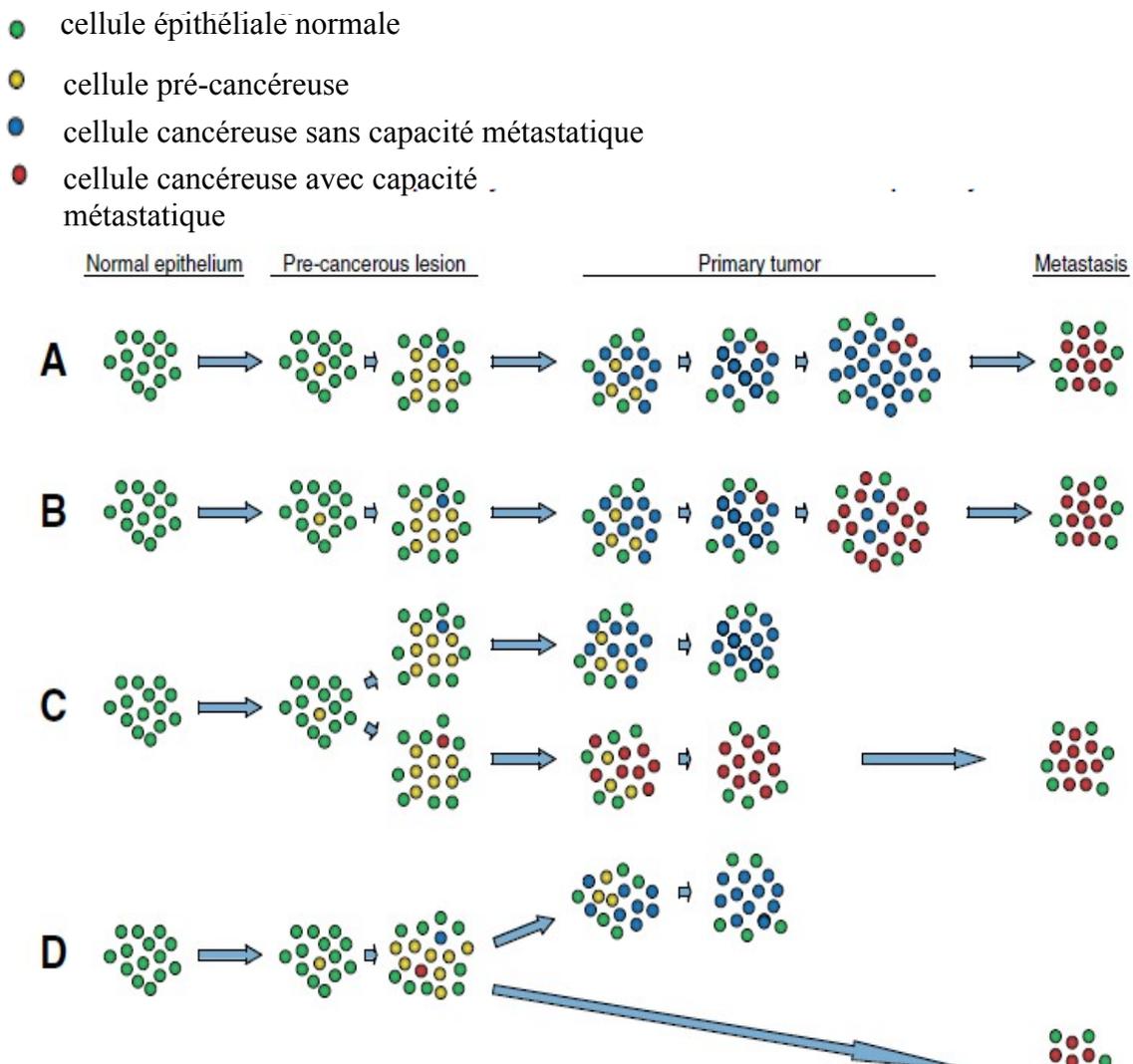


Figure 7. Présentation des différents modèles génétiques de la progression tumorale. (Source : [Yokota J, Kohno T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.* 2004;95\(3\):197-204](#))

4.2 Altérations génétiques

L'instabilité génétique et épigénétique du cancer du poumon existe à 2 niveaux :

- au niveau chromosomique, avec pertes et gains massifs,
- et au niveau nucléotidique incluant les modifications d'une ou plusieurs bases et des méthylations de promoteurs géniques.

Les cancers du poumon sont caractérisés par de nombreuses anomalies chromosomiques numériques (aneuploïdies) et des anomalies de structure incluant des délétions, des amplifications et des translocations non réciproques. Des altérations des microsatellites sont rencontrées dans 35% des CBPCs et dans 22% des CBNPCs ([Fong et al., 2002](#)). Les altérations géniques incluent de nombreuses pertes alléliques totales ou segmentaires à divers loci (dont 3p, 9p, 13q, 8p et 17p), l'aneuploïdie, les altérations de p53 et la surexpression de K-ras, myc, et Bcl-2 ([Fong et al., 2002](#); [Yokota et al., 2004](#)).

L'hyperméthylation de promoteurs tumeurs-spécifiques est un mode majeur d'inactivation de nombreux gènes. L'hyperméthylation des promoteurs constitue une modification épigénétique et non pas génétique de l'ADN ([Yokota et al., 2004](#)).

Les études de cartographie des délétions apparaissant dans les cancers bronchiques définissent plus de 30 régions situées sur 21 bras chromosomiques différents. Ces régions sont considérées comme des loci potentiels de gènes suppresseurs de tumeurs dans les CBPCs et les CBNPCs. Ceci suggère que de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs restent à identifier ([Yokota et al., 2004](#)).

La perte d'hétérozygotie est très fréquente chez les patients atteints de cancer du poumon et le nombre de pertes d'hétérozygotie augmente avec l'accroissement de la consommation tabagique ([Yoshino et al., 2003](#)) ([Tableau 1](#)).

Tableau 1. Altérations de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes dans différentes lignées cellulaires cancéreuses bronchiques.

(Source : [Yokota J, Kohno T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.* 2004;95\(3\):197-204](#))

Cell line	Histological subtype ¹⁾	Genetic and epigenetic alterations ²⁾													
		Tumor suppressor gene										Oncogene			
		<i>p53</i>	<i>RB</i>	<i>p16</i>	<i>p15</i>	<i>p14ARF</i>	<i>FHIT</i>	<i>PTEN</i>	<i>SMAD4</i>	<i>TGFβRII</i>	<i>MYO18B</i>	<i>PPP1R3</i>	<i>KRAS</i>	<i>β-catenin</i>	<i>C-myc</i>
Lu24	SCC	Mut	Mut							HD					
Lu135	SCC	Mut	Mut												Amp
N417	SCC	Mut	Mut					HD		Mut				Amp	
NCI-H209	SCC	Mut	Mut							Mut					
Lu134	SCC	Mut	—					HD						Amp	
Lu139	SCC	Mut	—												
NCI-H526	SCC	Mut	—							Mut					Amp
NCI-H774	SCC	Mut	—					HD							
SBC-5	SCC	Mut	Met	Mut											
NCI-H841	SCC	Mut	Met												Amp
NCI-H69	SCC	Mut	Met							Mut					Amp
NCI-H82	SCC	Mut	Met											Amp	
M518	SCC														
NCI-H322	ADC	Mut		HD	HD	HD									
PC-3	ADC	Mut		HD	HD	HD									
PC-14	ADC	Mut		HD	HD	HD									
RERF-LCOK	ADC	Mut	Met	HD	HD	HD									
VMRC-LCD	ADC	Mut	Met	HD	HD	HD				Mut					Amp
Ma-17	ADC	Mut	Met	HD	HD	HD									
Ma-24	ADC	Mut	Met	HD	HD	HD					Mut				
PC-9	ADC	Mut	Met	Met											
Ma-1	ADC	Mut	Met	Met											
Ma-29	ADC	Mut	Met	Met		Mut	HD		HD	Mut					
RERF-LCMS	ADC	Mut	Met	Met		Mut	HD								
ABC-1	ADC	Mut	Met	Met											
NCI-H23	ADC	Mut	Met	Met						Mut		Mut (12Cys)		Amp	
NCI-H441	ADC	Mut	Met	Met								Mut (12Val)			
Ma-10	ADC	Mut	Met	Met											
PC-7	ADC	Mut	—											Amp	
A427	ADC			HD	HD	HD						Mut (12Asp)	Mut		
A549	ADC			HD	HD	HD				Mut		Mut (12Ser)			
Ma-26	ADC			Met											
LC1-Sq	SQC	Mut	Met	HD	HD	HD									
NCI-H157	SQC	Mut	Met	Met		Mut					Mut	Mut (12Arg)			
NCI-H520	SQC	Mut	Met	Met											
EBC-1	SQC	Mut	Met	Met	HD	HD									
PC-10	SQC	Mut	Met	Met				HD			Mut				
NCI-H596	ASC	Mut	—							Mut					
Ma-25	LCC	Mut	Met	HD	HD	HD									
Lu99	LCC	Mut	Met	HD		HD						Mut (12Cys)			
Lu65	LCC	Mut	Mut	Met								Mut (12Cys)		Amp	
Ma-2	LCC	Mut	Met	Met		Mut	HD			Mut	Mut				
PC-13	LCC	Mut	Met	Met											
NCI-H1155	LCC	Mut	Mut					Mut	Mut			Mut (61His)			

1) SCC, small cell carcinoma; ADC, adenocarcinoma; SQC, squamous cell carcinoma; ASC, adenosquamous carcinoma; LCC, large cell carcinoma.
 2) Mut, mutation; HD, homozygous deletion; Met, hypermethylation; —, loss of expression (given for *RB* only); Amp, amplification. Blue, inactivation of tumor suppressor gene; Pink, activation of oncogene; Gray, not examined; Blank, no aberration.

4.2.1. Oncogènes

L'activation des oncogènes est souvent due à des mutations ponctuelles, des amplifications géniques ou des réarrangements. Les produits des oncogènes induisent l'expression de facteurs de croissance par stimulation de boucles autocrines et paracrines ainsi que l'activation de nombreuses voies de signalisation aboutissant à la production de peptides régulateurs par les cellules tumorales ou les cellules saines adjacentes ([Osada et al., 2002](#); [Fong et al., 2002](#)).

4.2.1.1. Gènes de la famille myc

Les gènes de la famille myc (C-myc, N-myc et L-myc) sont des proto-oncogènes qui codent une phosphoprotéine nucléaire qui intervient dans le passage de la phase G1/S du cycle cellulaire. Les protéines Myc régulent l'expression génique après fixation à des séquences spécifiques de l'ADN. Les mécanismes d'activation des gènes myc sont variés : translocation virale, mutation avec insertion dans la région du promoteur, amplification génique, et/ou translocation chromosomique. Les gènes de la famille myc sont amplifiés dans environ 15% des CBNPCs et dans 16 à 22% des CBPCs ([Fong et al., 2002](#)).

4.2.1.2. Gènes de la famille ras

Les gènes de la famille ras (K-ras, H-ras, et N-ras) codent pour des protéines membranaires et leur activation au niveau cellulaire provoque des modifications lipidiques de la membrane. K-ras est le gène ras le plus exprimé dans les cancers du poumon et il est aussi muté dans 15 à 20% des CBNPCs et dans 20 à 30% des ADCs ([Fong et al., 2002](#)). Les mutations de K-ras sont rares dans les carcinomes épidermoïdes ([Le Calvez et al., 2005](#)). K-ras est au moins aussi fréquemment altéré que p53 ou que la voie p16-cycline D1-Rb dans les cancers bronchiques, ce qui suggère que les mutations de K-ras pourraient être associées à des stades plus tardifs de progression maligne ou à des sous-types de cancers bronchiques ([Yokota et al., 2004](#)). Les mutations de K-ras sont corrélées avec la consommation tabagique.

La voie de signalisation ras active des produits de proto-oncogènes, comme myc, qui induisent la transcription de gènes de croissance cellulaire ([Fong et al., 2002](#)).

4.2.1.3. ErbB

Des anomalies des récepteurs de neurégulines ErbB1 (récepteur de l'EGF) et ErbB2 (HER2/neu) sont fréquemment mises en évidence dans les cancers bronchiques. Les récepteurs ErbB font partie d'une famille de récepteurs transmembranaires aux tyrosines kinases. Des taux élevés de récepteurs ErbB augmentent le potentiel métastatique des CBNPCs ([Fong et al., 2002](#)). ErbB2 est plus fréquemment surexprimé dans les ADCs que dans les carcinomes épidermoïdes ([Nakamura et al., 2003](#)).

4.2.1.4. Cyclooxygénases 1 et 2 (COX-1 et COX-2)

Les enzymes cyclooxygénases (COX) ont beaucoup attiré l'attention car l'utilisation de l'aspirine a été associée à une diminution de 40 à 50% du risque de cancer du colon. Or, COX est la cible principale de la plupart des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Les AINS inhibent la formation d'un cancer bronchique dans les modèles animaux. Deux isoformes de COX sont identifiés : COX-1, qui est exprimée constitutivement dans la majorité des tissus et joue un rôle dans l'homéostasie tissulaire, et COX-2 qui est inductible par de nombreuses substances dont les mitogènes et des médiateurs de l'inflammation ([Hastürk et al., 2002](#)).

L'expression de COX-2 apparaît préférentiellement dans les ADCs par rapport aux carcinomes épidermoïdes alors que COX-1 est exprimée par plus de cellules tumorales dans les carcinomes épidermoïdes que dans les ADCs ([Hastürk et al., 2002](#)).

COX-2 est plus exprimée chez les patients montrant une dissémination métastatique ou ganglionnaire, ce qui suggère que COX-2 pourrait jouer un rôle dans l'acquisition d'un potentiel métastatique dans les ADCs. De plus, l'expression de COX-2 est associée à la consommation tabagique ([Hastürk et al., 2002](#)).

4.2.1.5. Bombésine/gastrin releasing peptide (GRP)

La bombésine/GRP joue un rôle dans le développement et la réparation pulmonaire au niveau embryonnaire. Chez l'adulte, elle est exprimée dans de nombreux tissus, parmi lesquels, le système nerveux central et le tube digestif. La réactivation de la bombésine/GRP est mise en évidence dans 20 à 60% des CBPCs, elle est au moins présente dans les CBNPCs ([Fong et al., 2002](#); [Saurin et al., 2000](#)).

Dans le poumon, la bombésine/GRP est détectée à la fois dans l'épithélium normal et tumoral. L'activation autocrine du récepteur à la bombésine/GRP a été mise en évidence dans les lignées CBPC. La bombésine/GRP exerce un effet chimiotactique vis-à-vis des cellules tumorales exprimant les récepteurs à la bombésine/GRP dans Les CBPCs ([Saurin et al., 2000](#)).

4.2.1.6. Bcl-2

Bcl-2 est un proto-oncogène anti-apoptotique. Bcl-2 est exprimé dans 75 à 95% des CBPCs, il est plus exprimé dans les carcinomes épidermoïdes que dans les ADCs ([Fong et al., 2002](#)). Bcl-2 joue un rôle important dans la régulation de la survie des cellules B et T sélectionnées ainsi que lors de la maturation. Le virus Epstein-Barr contient un gène présentant une séquence homologue de Bcl-2 ([Goldsby et al., 2000](#)).

4.2.2. Gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont classiquement inactivés par la délétion structurale d'un allèle parental combinée avec une mutation ponctuelle ou avec l'inactivation épigénétique de l'autre allèle par méthylation ([Fong et al., 2002](#)). Les mutations intervenant dans l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs sont pour la plupart des anomalies de réparation de l'ADN avec transversion G : C (en particulier pour p53) et T : A, ou des cassures aux points de jonction terminaux des chromosomes ([Yokota et al., 2004](#)).

4.2.2.1. p53

Le gène suppresseur de tumeur p53 participe au maintien de l'intégrité génomique dans le contexte de dommages de l'ADN causés par les carcinogènes ainsi que par les radiations γ et les ultra-violets (UV). L'activation de p53 aide à réguler la transition G1/S du cycle cellulaire, l'analyse des dommages de l'ADN en phase G2/M et l'entrée de la cellule dans le processus d'apoptose. Des dysfonctions dans le gène p53 permettent la survie de cellules contenant des dommages de l'ADN, ouvrant ainsi une brèche pour l'évolution en cellule tumorale ([Fong et al., 2002](#)). La mutation ponctuelle d'un G en T dans la séquence p53 est caractéristique, elle est très fréquente dans les cancers bronchiques. La fréquence de mutation de p53 est la plus forte dans les carcinomes épidermoïdes et les CBPCs ([Yokota et al., 2004](#)). Les mutations de p53 sont très fréquentes dans les cas de cancers du poumon chez les fumeurs ([Le Calvez et al., 2005](#) ; [Yokota et al., 2004](#)).

4.2.2.2. Voie p16-Cycline D1-Rétinoblastome (Rb)

La voie de transduction p16-Cycline D1-Rb ([Figure 8](#)) est essentielle dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire. Des anomalies protéiques Rb sont mises en évidence dans 90% des CBPCs et dans 15 à 30% des CBNPCs. Des anomalies de la cycline D1 sont mises en évidence dans 25 à 47% des CBNPCs. Les altérations de p16 peuvent être associées à la progression tumorale, au stade et à la survie. L'inactivation de p16 est fréquente dans les CBNPCs ([Fong et al., 2002](#)).

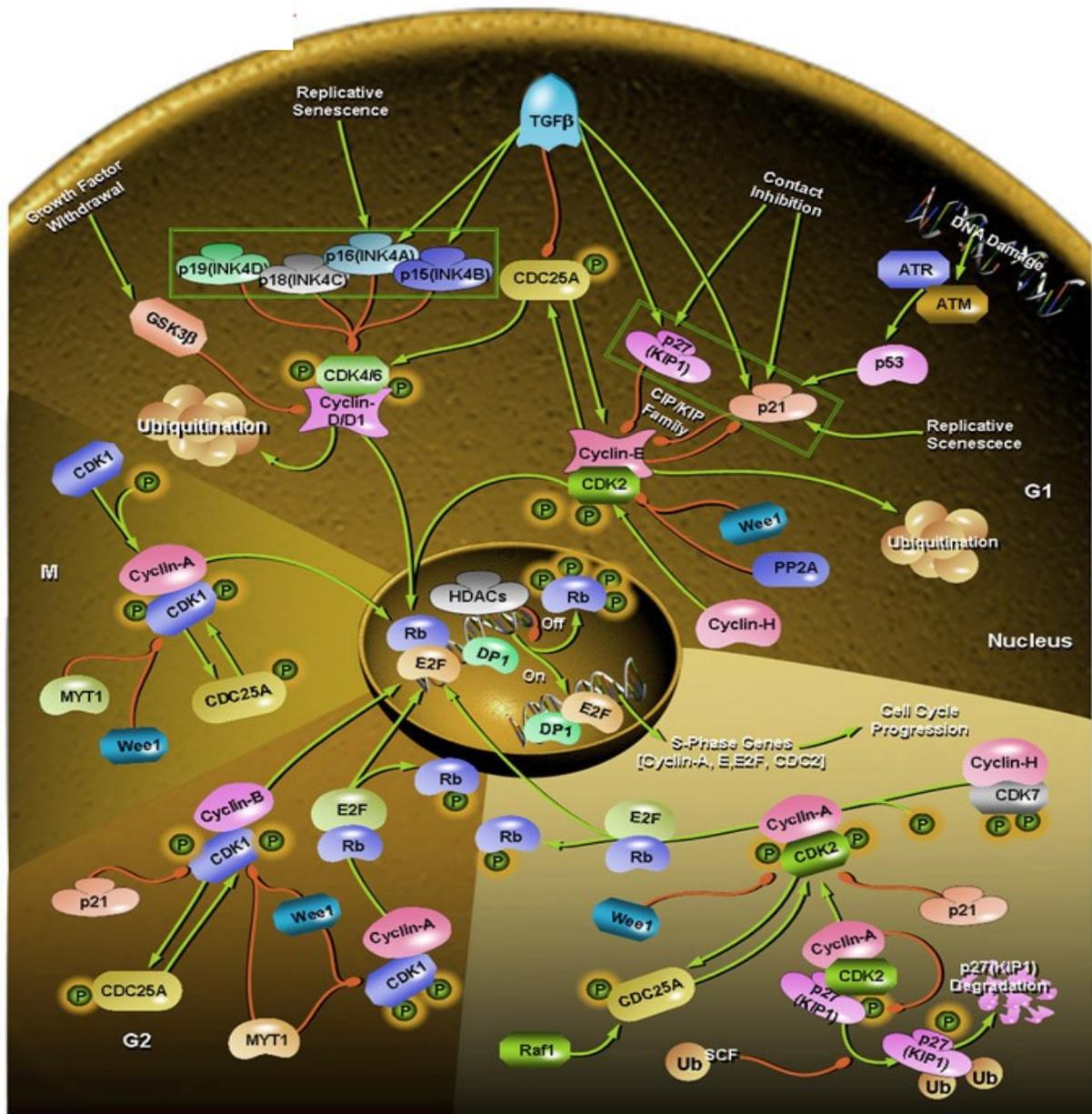


Figure 8. Régulation des différentes phases du cycle cellulaire par les cyclines et autres régulateurs.

(Source : http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Cyclins_Cell_Cycle_Regulation)

4.3. Cascade métastatique

Le processus de métastase tumorale est un phénomène dynamique complexe impliquant à la fois des interactions entre les cellules tumorales et des interactions entre les cellules tumorales et le tissu hôte. Le processus de métastase tumorale peut être sous-divisé en un certain nombre d'étapes biologiques séquentielles dont la régulation n'est pas encore entièrement comprise (Figure 9).

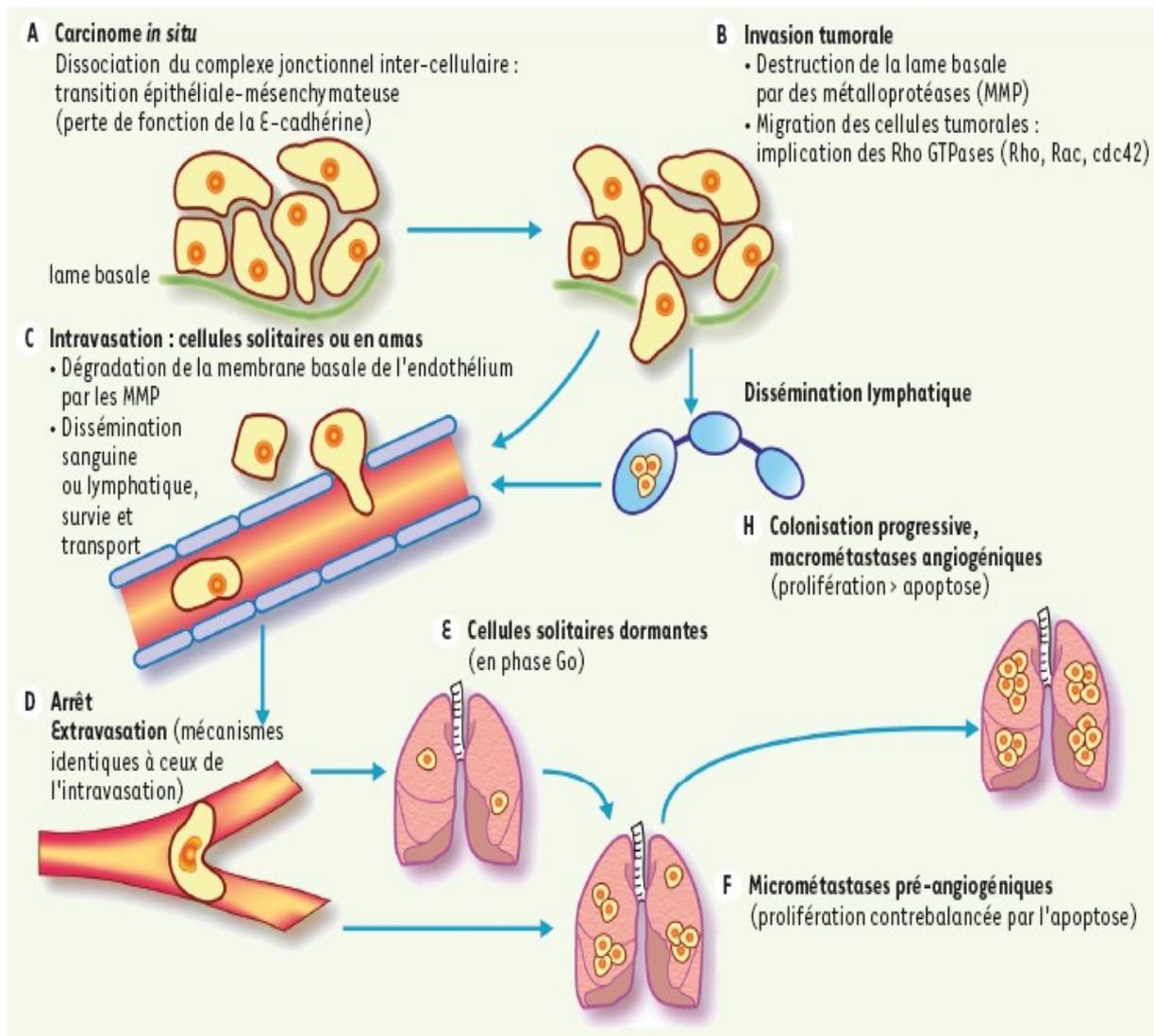


Figure 9. Présentation des différentes étapes de la cascade métastatique.

(Source : http://www.edk.fr/reserve/revues/ms_papier/e-docs/00/00/0B/B0/media_Lacombe_01.jpg)

La première étape du processus métastatique est caractérisée par la dissociation de cellules tumorales à partir de la tumeur primaire, suivie de l'infiltration active du stroma environnant : c'est l'étape d'invasion. Ces cellules pénètrent alors le système vasculaire ou lymphatique dans une étape qualifiée d'intravasation. Elles sont ensuite distribuées de façon passive par le courant vasculaire ou lymphatique vers les organes distants où elles sont stoppées, du fait de leur taille, dans les plus petits vaisseaux. Les cellules tumorales quittent alors ces vaisseaux et envahissent l'organe cible : c'est l'extravasation. Cette dernière étape d'invasion n'aboutit pas forcément à l'apparition de métastases détectables puisque les

cellules tumorales peuvent être éliminées par le système immunitaire ou rester « silencieuses » pendant un certain temps : c'est l'état de dormance tumorale. Les cellules tumorales dormantes (phase G₀), lorsqu'elles sont stimulées par des facteurs environnementaux, augmentent leur activité proliférative afin d'établir des masses tumorales secondaires détectables ([MacDonald et al., 2002](#)).

D'un point de vue moléculaire, la dissociation des cellules tumorales nécessite la perte de liaisons intercellulaires homotypiques qui sont médiées par les molécules d'adhésion, notamment celles de la superfamille des cadhérines. Les E-cadhérines sont responsables de l'organisation, de la structure, et de la morphogénèse des tissus épithéliaux. L'expression des intégrines, qui permettent la fixation au collagène et à la laminine des membranes basales, est par ailleurs diminuée dans les CBNPCs ([Fong et al., 2002](#)).

La dégradation de la matrice extra-cellulaire (MEC) et de la membrane basale par les cellules tumorales est essentielle pour l'invasion tumorale et la formation des métastases. Les métalloprotéinases de la matrice (MMP) sont responsables de la dégradation de la MEC ([Fong et al., 2002](#); [Gouyer et al., 2005](#)).

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer la formation des métastases ([Nguyen et al., 2007](#)). La première, ancienne, propose l'existence de sous-populations de cellules tumorales, variantes et rares, ayant acquis un avantage sélectif pour la dissémination métastatique. La deuxième, plus récente et obtenue à partir de l'observation des tumeurs des patients, suggère la présence d'une prédisposition métastatique établie dès le développement de la tumeur primitive. La recherche d'une « signature métastatique » a été possible grâce aux progrès de la génomique fonctionnelle. Les analyses d'échantillons de tumeurs humaines par micro-arrays ont montré que certaines combinaisons d'altérations de l'expression génique induiraient une croissance tumorale sans propension à métastaser alors que d'autres permettraient le développement d'une tumeur à potentiel métastatique. Il est intéressant de noter que plusieurs

voies impliquées dans le potentiel métastatique (SRC, PI3K, MAPK...) sont également activées lors des processus oncogéniques suggérant des mécanismes communs. Cependant, la découverte que certains gènes, par leur absence ou leur présence, favorisaient ou inhibaient la dissémination métastatique, indique que ce processus peut être contrôlé spécifiquement.

Les gènes suppresseurs de métastases (GSM) ont été identifiés par la diminution de leur expression dans des cellules tumorales métastatiques par rapport aux cellules tumorales non métastatiques à l'aide de techniques telles que le criblage différentiel, l'hybridation soustractive, les puces à ADN ou le transfert cellulaire de chromosomes. Ces gènes sont définis par leur capacité à inhiber la formation des métastases sans affecter le développement de la tumeur primitive *in vivo* ([Rinker-Schaeffer et al., 2006](#)). La fonction de GSM est validée par des expériences de surexpression de ces gènes dans des lignées tumorales hautement métastatiques, avec pour conséquence une réduction de leur potentiel métastatique testé dans des modèles expérimentaux, le plus souvent chez la souris.

Des études cliniques corrélant la diminution d'expression des GSM dans les tumeurs humaines à certains indicateurs d'agressivité clinique confirment les données obtenues dans les modèles expérimentaux. Il faut noter que les GSM ne sont pas toujours retrouvés dans les signatures métastatiques et qu'ils ne sont que rarement le siège de mutations ou de délétions. La diminution de leur expression est due le plus souvent à un mécanisme épigénétique, comme une méthylation du promoteur ou une modification post-transcriptionnelle et/ou traductionnelle ([Rinker-Schaeffer et al., 2006](#)). Aujourd'hui, près de 12 GSM ont été décrits (tels NM23, BRMS1 ou Kiss1) mais la liste n'est pas exhaustive ([Boissan et al., 2007](#)).

5. DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT

Les symptômes associés aux cancers du poumon sont peu spécifiques, ce qui explique en partie un diagnostic souvent tardif. Il faut effectivement déplorer que plus de 80% des cancers broncho-pulmonaires ne soient actuellement pas accessibles à la chirurgie, leur diagnostic se faisant encore à un stade trop tardif ([Vlastos et al., 2009](#)).

Les symptômes les plus souvent reliés à une tumeur pulmonaire primaire incluent une toux (inquiétante, rebelle mais souvent négligée chez le fumeur bronchitique chronique), une dyspnée (gêne respiratoire), une hémoptysie (crachats sanguinolents), voire une pneumonie obstructive. Des douleurs thoraciques peuvent suggérer une extension à la plèvre pariétale ou une extension extra-pulmonaire ([Hoffman et al., 2000](#)). D'autres symptômes peuvent également aiguiller le médecin vers la recherche d'une tumeur primaire pulmonaire, comme une expectoration variable et inconstante, un « wheezing » (respiration sifflante) survenant dans certaines positions, des pneumopathies à répétition, une dysphonie (changement dans le timbre de la voix), une suppuration pulmonaire, un syndrome de compression de la veine cave supérieure (l'obstruction par la tumeur du drainage veineux provoque la dilatation des veines collatérales du cou et de la partie supérieure du thorax) ([Rossan, dossier cancer du poumon](#)).

Parfois, le début est plus trompeur, il peut s'agir de troubles neurologiques provoqués par des métastases (compression médullaire, épilepsie, hypertension intracrânienne, etc.), d'un syndrome paranéoplasique (cutané, endocrinien, neurologique), de troubles ostéo-articulaires, de fracture(s) spontanée(s) (métastases osseuses) ([Rossan, dossier cancer du poumon](#)).

Le développement d'une tumeur pulmonaire produit également une altération de l'état général du malade (asthénie, anorexie, amaigrissement, fièvre au long cours et grande fatigue) ([Hoffman et al., 2000](#)).

Les métastases sont fréquentes dans le cancer du poumon. Les tumeurs bronchiques métastasent préférentiellement dans un autre lobe pulmonaire ou dans l'autre poumon, dans le cerveau, la cavité pleurale, les os, le foie les glandes surrénales ou la peau. Le processus métastatique apparaît le plus souvent chez les patients présentant un CBPC ou un ADC ([Hoffman et al., 2000](#)).

5.1. Stades de cancérisation selon la classification TNM

La classification TNM remplit plusieurs rôles : aider le clinicien à établir le traitement, fournir des indications sur le pronostic, faciliter l'évaluation des résultats thérapeutiques, permettre l'échange de renseignements entre les centres et concourir à la poursuite des recherches concernant le cancer du poumon chez l'homme.

Cette classification repose sur la définition précise de l'envahissement de la tumeur par la détermination de 3 critères. Ce sont les stades :

- T : concernant la taille et la localisation primitive du néoplasme,
- N : concernant l'envahissement tumoral des ganglions lymphatiques et leur localisation,
- M : décrivant la présence (M1) ou non (M0) de métastases à distance.

La technique de description et de classification applicable à toutes les localisations de cancer consiste en l'identification de l'extension de la maladie en utilisant 3 symboles : T, N et M, l'attribution à chacun d'entre eux d'une série de chiffres indiquant les degrés de l'envahissement ou de l'extension tumorale ainsi que le groupement des facteurs TNM en un petit nombre de classes cliniques ([Mountain, 2002](#)) ([Tableau 2](#)).

Tableau 2. Présentation des différents stades de la classification TNM.
(Source : [Mountain CF, 2002](#))

Classification du T

Statut T	Description
TX	Tumeur prouvée par la cytologie bronchique mais non visualisée ni à la radio, ni en bronchoscopie
T0	Pas de tumeur primaire
Tis	Carcinome <i>in situ</i>
T1	Tumeur de 3 cm ou moins, entourée de parenchyme pulmonaire ou la plèvre, sans invasion des bronches lobaires proximales en bronchoscopie
T2	Tumeur de plus de 3 cm ou tumeur envahissant la plèvre viscérale ou associée à une atélectasie n'intéressant pas tout un poumon. À la bronchoscopie, la tumeur est située au niveau lobulaire et à au moins 2 cm de la carène
T3	Tumeur de taille indifférente avec une extension à la paroi thoracique, au diaphragme, à la plèvre ou au péricarde sans atteinte du cœur, des grands vaisseaux, de la trachée, de l'œsophage ou du corps vertébral ou atteinte de la bronche principale sans atteinte de la carène ou atélectasie de tout un poumon
T4	Atteinte du médiastin, du cœur, des grands vaisseaux, de la trachée, de l'œsophage, du corps vertébral, de la carène ou épanchement pleural positif

Classification du N

Statut N	Description
N0	Pas de métastase des ganglions régionaux
N1	Atteinte(s) ganglionnaire(s) homolatérale(s) péri-bronchique(s) et/ou homolatérale(s) hilare(s) y compris une extension directe à partir de la tumeur primitive
N2	Adénopathie(s) régionale(s) médiastinale(s) homolatérale(s) et/ou sous-carénaire(s)
N3	Atteinte(s) ganglionnaire(s) médiastinale(s) contro-latérale(s), hilare(s) contro-latérale(s) scalénique(s) homo- ou contro-latérale(s) ou sus-claviculaire(s)

Regroupement en stades

Stades	Description
Stade 0	In situ
Stade 1	T1 N0 M0 ou T2 N0 M0
Stade 2	T1 N1 M0 ou T2 N1 M0 (pas d'atteinte médiastinale)
Stade 3a	Atteinte extra-pulmonaire (T3 N0 M0 ou T3 N1 M0, T3 N2 M0, T2 N2 M0)
Stade 3b	T1-4 N3 M0, T4 et N1-3 M0
Stade 4	Atteinte métastatique

Diverses techniques sont utilisées pour le diagnostic et la classification des cancers du poumon. La radiographie pulmonaire constitue le premier examen de détection de la tumeur et de son extension. Le scanner permet une analyse beaucoup plus précise de la localisation et de l'étendue de la tumeur. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est plus utile pour la détection et la localisation de la tumeur et des nodules périphériques. La plupart des tumeurs sont caractérisées par une augmentation du métabolisme du glucose. Cette augmentation peut être détectée par tomographie par émissions de positrons (TEP ou PET-scan) ([McLoud, 2002](#)).

5.2. Traitements

La chirurgie est indiquée en première intention à chaque fois que possible. Une combinaison de radiothérapie et de chimiothérapie est maintenant couramment utilisée, en particulier pour traiter les cancers bronchiques de stade avancé ainsi que dans le traitement de tumeurs présentant des métastases. Cette combinaison est utilisée de façon quasi-systématique pour le traitement des cancers bronchiques à petites cellules ([Hoffman et al., 2000](#)).

5.2.1. Chirurgie

La chirurgie est indiquée lorsqu'elle permet d'enlever la totalité de la tumeur. Pour opérer, il faut que le cancer soit de petite taille, localisé au poumon et que le patient soit dans un état général suffisamment bon pour supporter l'ablation d'une partie ou de tout un poumon ([Rossan, dossier cancer du poumon](#)).

Les tumeurs primaires pulmonaires peu étendues (stades T1N0 et T2N0) sont traitées préférentiellement par ablation chirurgicale. Il en est de même pour les tumeurs moyennement étendues (stades T1N1, T2N1 et T3N0). L'ablation chirurgicale de la tumeur est beaucoup moins souvent possible chez les patients présentant une tumeur étendue (stades T3 et T4 ainsi que les stades N2 et N3). La chirurgie n'est pas utilisée comme traitement des tumeurs de

stade 4 (tumeurs présentant des métastases). Les cancers bronchiques à petites cellules sont agressifs et se disséminent facilement. Pour cette raison, Les CBPCs ne sont généralement pas traités par ablation chirurgicale ([Hoffman et al., 2000](#)).

La chirurgie n'est possible que dans environ 25% des CBNPCs. Le traitement chirurgical est généralement suivi d'une radiothérapie pour éliminer les cellules cancéreuses résiduelles et, parfois, de chimiothérapie. Le taux de guérison est fonction de la taille de la tumeur et de son extension éventuelle ([Rossan, dossier cancer du poumon](#)).

5.2.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie a pour objectif de détruire les cellules cancéreuses et d'éviter les rechutes locales et les métastases. Même si les résultats s'améliorent au cours du temps, ce but est loin d'être toujours atteint et elle doit presque toujours être associée à d'autres traitements : chirurgie, radiothérapie, hormonothérapie et immunothérapie.

La chimiothérapie est un traitement systémique toxique pour la totalité des cellules capables de se diviser. Les chimiothérapies empêchent la synthèse d'ADN indispensable à la duplication des cellules et détruisent le cytosquelette. Ces traitements s'appliquent particulièrement aux cancers à petites cellules, pour lesquels il est commun de supposer une extension du cancer à d'autres organes même si cette extension n'est pas localisée avec précision. De nombreux effets secondaires sont liés au caractère toxique systémique de ces traitements : anémie, fatigue, leucopénie (en particulier neutropénie), thrombopénie, nausées et vomissements, aphtes, perte des cheveux, perte de poids, irritation des muqueuses, troubles digestifs et gynécologiques, etc. ([Heron, 2005](#)).

Dans les tumeurs peu étendues (stades T1N0 et T2N0), la chimiothérapie réalisée avant une ablation chirurgicale (chimiothérapie néo-adjuvante) permet de prévenir le développement de tumeurs secondaires. Une chimiothérapie post-opératoire est fréquemment réalisée chez les patients présentant des tumeurs moyennement étendues (stades T1N1, T2N1

et T3N0), afin d'éliminer les tumeurs satellites éventuelles et de diminuer les risques de récurrence tumorale ([Hoffman et al., 2000](#)). Les patients présentant une tumeur étendue (stades T3 et T4 ainsi que les stades N2 et N3) sont souvent traités par chimio- et radiothérapie combinées. Les patients chez qui il a été diagnostiqué une ou des métastases sont traités de façon systématique par une combinaison de chimiothérapie et de radiothérapie. La chimiothérapie est le traitement de prédilection des CBPCs ([Hoffman et al., 2000](#)).

Les divers médicaments utilisés combinés en chimiothérapie proviennent de 3 grandes classes pharmacologiques ([Figure 10](#)) :

- les anti-métabolites interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques pendant le phase S du cycle cellulaire. Ils comportent les antifolates, les analogues des bases puriques et les analogues des bases pyrimidiques ([Heron, 2005](#)).

- les médicaments agissant au niveau de l'ADN peuvent être des agents alkylants (et apparentés), intercalants, inhibiteurs des topoisomérases ou de la ribonucléotide réductase (hydroxyurée) et scindants. Ils agissent sur la duplication ou la transcription de l'ADN ([Heron, 2005](#)).

- les médicaments agissant sur les fonctions cellulaires contiennent les alcaloïdes antimitotiques de la pervenche (inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline), les dérivés de l'if (taxanes) qui sont cytotoxiques pour les cellules en mitose (inhibiteurs de la dépolymérisation de la tubuline), les épipodophyllotoxines (inhibiteurs de topoisomérase) qui empêchent l'entrée en prophase, les éthers lipides (proches des phospholipides membranaires) qui induisent l'apoptose en créant des désordres membranaires, les anticorps monoclonaux, les inhibiteurs de transduction des signaux des tyrosines kinases ([Heron, 2005](#)).

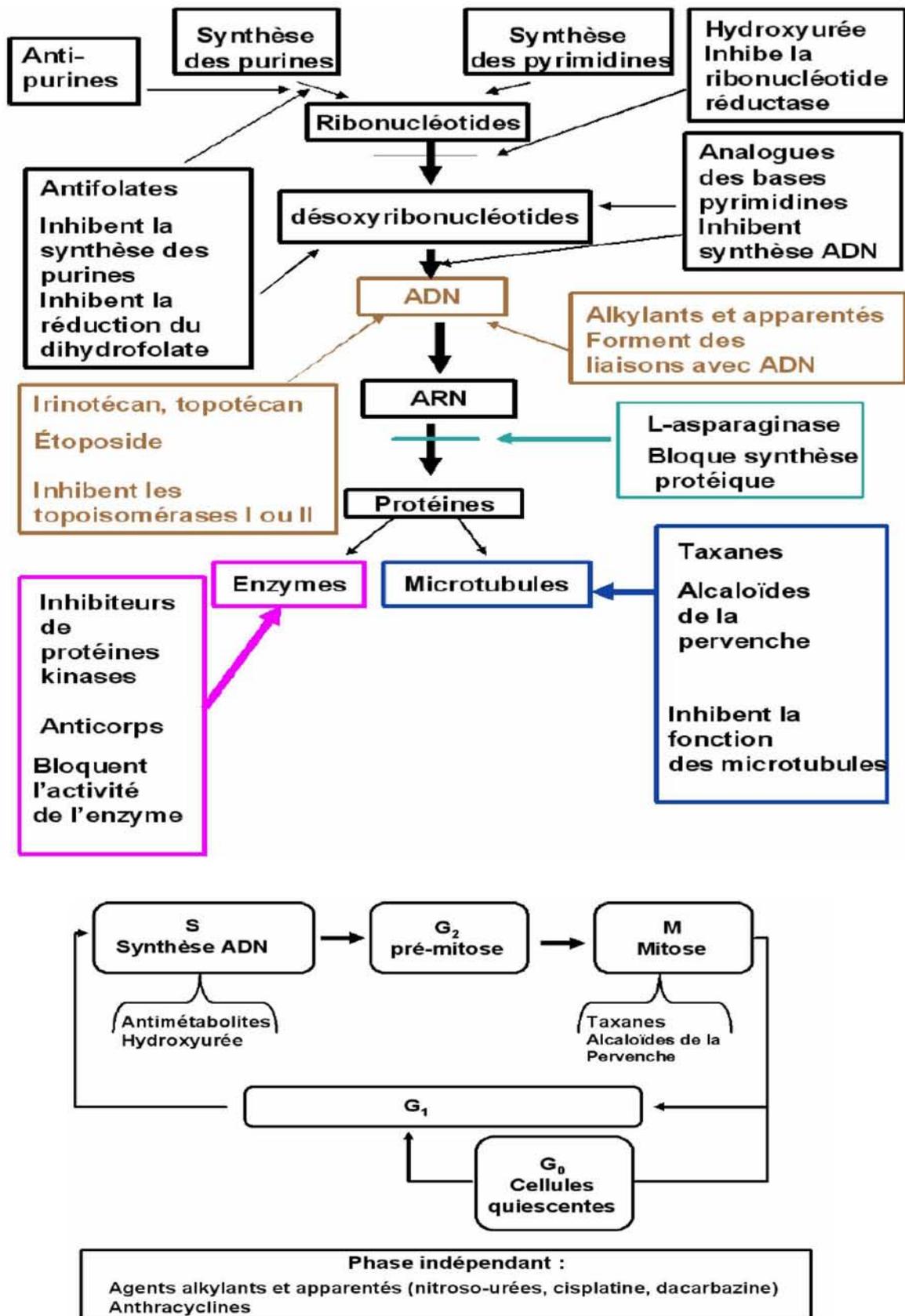


Figure 10. Présentation des différents médicaments utilisés en chimiothérapie ainsi que les phases du cycle cellulaire sur lesquelles ils agissent.

(Source : http://www-ulpmed.u-strasbg.fr/medecine/cours_en_ligne/e_cours/pharmaco/pdf/dcm3/DCEM3-%20Pharmaco_Chap22-anticancereux-cytotoxiques_2006.pdf)

5.2.3. Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement local qui provoque beaucoup moins d'effets secondaires que la chimiothérapie. Du fait de son caractère local, la radiothérapie ne peut toutefois s'appliquer qu'à des tumeurs primaires localisées et peu profondes ([Heron, 2005](#)).

La radiothérapie est utilisée chez les patients présentant une tumeur primaire peu étendue, qui ne sont pas traitables par chirurgie. Une radiothérapie post-opératoire peut être réalisée chez les patients présentant des tumeurs moyennement étendues (stades T1N1, T2N1 et T3N0) afin d'éliminer les tumeurs satellites éventuelles et diminuer ainsi les risques de récurrence tumorale. Les patients présentant une tumeur étendue (stades T3 et T4 ainsi que les stades N2 et N3) sont souvent traités par radio- et chimio-thérapie combinées. Les patients chez qui il a été diagnostiqué une ou des métastases sont traités de façon systématique par une combinaison de radiothérapie et de chimiothérapie. La radiothérapie peut être utilisée en combinaison de la chimiothérapie pour le traitement des CBPCs ([Hoffman et al., 2000](#)).

Il existe différentes sortes de radiothérapies :

- la radiothérapie externe transcutanée : elle utilise une source de rayonnements ionisants placée à distance des tissus irradiés (rayons gamma du cobalt, rayons X ou électrons des accélérateurs linéaires). Plus l'énergie du rayonnement est élevée, plus les tissus touchés par la dose maximale sont profonds. Par exemple, les rayons gamma et X touchent les tissus sous-cutanés alors que des rayons d'énergie supérieure les épargnent ([Heron, 2005](#)).

- la curiethérapie : elle utilise des éléments radioactifs artificiels scellés se présentant sous forme de fils (aiguilles vectrices, fils parallèles, Iridium 192), de source maintenue par une gaine (Cesium 137) ou de grains (Iode 125). Ces éléments radioactifs sont placés dans le tissu tumoral (curiethérapie interstitielle) ou à leur contact (curiethérapie endocavitaire). Ces sources sont parfois implantées définitivement (grains d'Iode 125). La curiethérapie est

utilisée seule ou en complément de la radiothérapie externe, elle est réservée au traitement de la tumeur primaire qui doit être accessible. La curiethérapie permet de soumettre la tumeur à des doses élevées de radioactivité avec une décroissance des doses dans sa périphérie, permettant de délivrer la dose nécessaire à l'éradication de la tumeur visible et une dose inférieure adaptée aux extensions tumorales éventuelles non visibles macroscopiquement. Cette technique permet un assez bon respect des tissus sains ([Heron, 2005](#)).

- la radiothérapie métabolique : elle utilise des particules injectées dans la circulation et qui se fixent dans des gîtes préférentiels. Elle fait le plus souvent appel à de l'Iode 131 dans certaines formes de cancers de la thyroïde. De plus, certaines substances chimiques sont captées par les cellules tumorales de certains types de cancers et y atteignent des concentrations plus élevées que dans les tissus sains ([Heron, 2005](#)).

5.2.4. Autres traitements

Un certain nombre d'autres traitements sont utilisés dans la prise en charge des cancers. Ils sont généralement non curatifs à eux seuls mais apportent une augmentation d'efficacité des autres traitements et une amélioration de la qualité de vie du patient ([Heron, 2005](#)).

L'immunothérapie utilisant divers anticorps monoclonaux peut être envisagée dans le cancer du poumon, 2 médicaments disponibles sur le marché peuvent ainsi être utilisés pour certaines tumeurs bronchiques. Le Trastuzumab (HerceptinTM) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre ErbB2 (=HER2/neu) et peut être utilisé pour le traitement des tumeurs surexprimant cette molécule. Le Cetuximab (ErbixTM) est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre ErbB1 (récepteur de l'EGF) et peut, de même, être utilisé pour le traitement des tumeurs surexprimant cette molécule ([Heron, 2005](#)).

Deux médicaments disponibles sur le marché : le Gefitinib (IressaTM) et l'Erlotinib (TarcevaTM) sont également des inhibiteurs de la voie de prolifération tumorale dépendante de

l'EGF. Ces 2 médicaments sont des petites molécules qui inhibent spécifiquement la tyrosine kinase responsable de la transduction des signaux résultant de la liaison de l'EGF à son récepteur ([Heron, 2005](#)).

Le proliférateur de peroxyosomes PPAR γ est un régulateur cellulaire important car il inhibe la croissance et induit la différenciation des cellules cancéreuses. L'utilisation de ligands de PPAR γ pourrait présenter une nouvelle voie de thérapie anti-angiogénique pour les tumeurs multi-drogues résistantes ([Panigrahy, 2002](#)). Cependant, il existe déjà divers médicaments anti-angiogéniques sur le marché dont le Bevacizumab (AvastinTM), un anticorps monoclonal humanisé qui se lie au VEGF, empêchant sa fixation à son récepteur cellulaire ([Heron, 2005](#)).

Le cancer du poumon n'est pas considéré comme un cancer hormono-dépendant et l'hormonothérapie n'est pas envisagée dans ce type de cancer ([Heron, 2005](#)).

La thérapie photodynamique constitue une autre modalité de traitement des cancers. C'est un traitement local utilisant des molécules photosensibles s'activant par éclaircissement à certaines longueurs d'onde. L'activation de ces photosensibilisateurs provoque la production de radicaux libres et de dérivés réactifs de l'oxygène capables de lyser directement les cellules tumorales. La production des espèces réactives de l'oxygène induit également une réponse immune inflammatoire et des dommages dans la microvascularisation tumorale ([Schneider et al., 2005](#)). Une stratégie de photothérapie peut être utilisée dans le traitement de certains cancers du poumon, en particulier les tumeurs de stades précoces, centrales et de petite taille ([Furukawa et al., 2005](#)).

C. LA VITAMINE A ET LES RÉTINOÏDES

1. GÉNÉRALITÉS

1.1. Historique

50 avant J.C., le médecin grec Hippocrate traitait les problèmes de vision en prescrivant du foie de veau. Au début de l'ère chrétienne, le médecin romain Celsus fut le premier à décrire une maladie, qu'il nomma xérophtalmie. La maladie était à l'origine d'une forme courante de cécité chez les enfants. Au 19ème siècle, la xérophtalmie est fréquente en Europe, et le médecin français Magendie est le premier à soupçonner qu'elle est due à une carence d'origine alimentaire : il montre que la maladie apparaît chez les chiens soumis à un régime qui n'apporte que du gluten de blé (protéines), de l'amidon (glucides), du sucre et de l'huile d'olive. Il s'agit là du premier cas expérimental démontrant l'intérêt vital des vitamines.

La Vit.A n'a été découverte qu'en 1913 par McCollum et Davis, deux chercheurs de l'Université du Wisconsin, et par Osborne et Mendel du « Connecticut Experiment Station ». Travaillant de façon indépendante, les deux équipes mirent en évidence la présence d'une substance essentielle dans les corps gras alimentaires : McCollum et Davis travaillaient sur le beurre et le jaune d'œuf, alors qu'Osborne et Mendel, géographie oblige, s'intéressaient à l'huile de foie de morue. Les chercheurs montrèrent qu'en l'absence de cet élément, les animaux de laboratoire étaient atteints d'une infection oculaire. Ils baptisèrent cette substance A liposoluble. En 1915, McCollum et Davis notèrent que les carences en A liposoluble provoquaient une baisse voire une altération complète de la vision nocturne. Ils donnaient du même coup raison à Hippocrate.

En 1931, le suisse Karrer isola la substance active dans de l'huile de poisson et détermina sa formule chimique. Karrer reçut le prix Nobel pour cette découverte, et pour ses travaux sur une autre vitamine, la riboflavine (vitamine B2). En 1937, Karrer réussit à produire de la Vit.A sous une forme cristalline à partir d'huile de poisson. La forme

synthétique est l'oeuvre de Otto Isler, des laboratoires suisses Hoffmann-La Roche, qui la réalisa en 1947. Depuis, près de 2500 dérivés de la Vit.A (rétinoïdes) ont été synthétisés (LaNutrition.fr, [dossier Vitamine A](#)).

1.2. Définitions et descriptions

Le terme « Vitamine A » regroupe l'ensemble des composés naturels présentant une activité biologique comparable à celle du rétinol. C'est une vitamine stable à la chaleur, mais sensible à l'oxydation, à la lumière, et à l'air. La Vit.A est une vitamine liposoluble qui s'appelle également rétinol parce qu'elle a été trouvée dans la rétine. Le rétinol évoque la rétine de l'œil en raison du rôle très important que joue cette vitamine sur les mécanismes de la vision. Le rétinol est d'ailleurs le composé le plus actif, le plus abondant et c'est la forme de Vit.A la mieux utilisée par notre corps. Des apports suffisants en protéines et en zinc sont essentiels au métabolisme de la Vit.A. La vitamine E accroît l'absorption de Vit.A au niveau de l'intestin grêle et favorise les réserves stockées dans le foie (LaNutrition.fr, [dossier Vitamine A](#)).

Les composés chimiques appartenant à la famille de la Vit.A ([Figure 11](#)) sont définis, par la Commission Mixte de Nomenclature Biochimique de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) et de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB), comme possédant une structure de base formées par 4 unités isoprénoïdes condensées en tête-à-queue pour former un composé parent monocyclique possédant 5 doubles liaisons carbone-carbone et un groupement fonctionnel au niveau de sa terminaison acyclique ([Dawson, 2000](#)). Le composé parent type est le rétinol tout-trans (at-retinol).

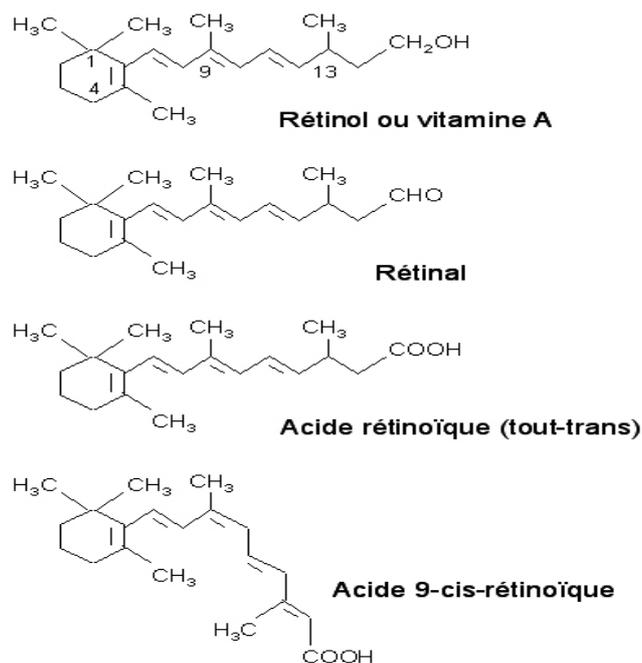


Figure 11. Formules des principaux composés chimiques naturels appartenant à la famille de la Vit.A. (Source : http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Vitamines3_1.php)

1.3. Sources de Vit.A

La Vit.A proprement dite ne se trouve que dans les produits d'origine animale mais elle peut en réalité provenir de 2 sources ([Tableau 3](#), [Figure 12](#)) :

- du rétinol ou des esters de rétinol qui sont présents dans les aliments d'origine animale (foie, viande, poissons, jaune d'oeuf, produits laitiers, beurre, etc),
- de la transformation de précurseurs en rétinol. Ces précurseurs sont essentiellement l' α - et le β -carotène, et les cryptoxanthines. Ces composés sont aussi appelés « pro-vitamine A », leurs molécules sont colorées en rouge-orangé, et ils appartiennent au groupe des caroténoïdes. Cette deuxième source constitue une part importante de l'apport alimentaire en Vit.A. Les caroténoïdes se retrouvent principalement dans les légumes verts feuillus et orangés (carottes, épinards, choux, betterave, patates douces, persil, etc), ainsi que dans les fruits orangés (abricots, mangues, melons, etc.). La teneur en β -carotène est proportionnelle à l'intensité de la couleur. Il est à noter que les caroténoïdes sont beaucoup mieux absorbés avec un peu de matière grasse.

Le plus important des caroténoïdes est le β -carotène, qui est également le plus efficacement transformé en rétinol. Une molécule de β -carotène, par hydrolyse de la liaison 15-15' sous l'influence d'une caroténoïde oxygénase, donne deux molécules de Vit.A.

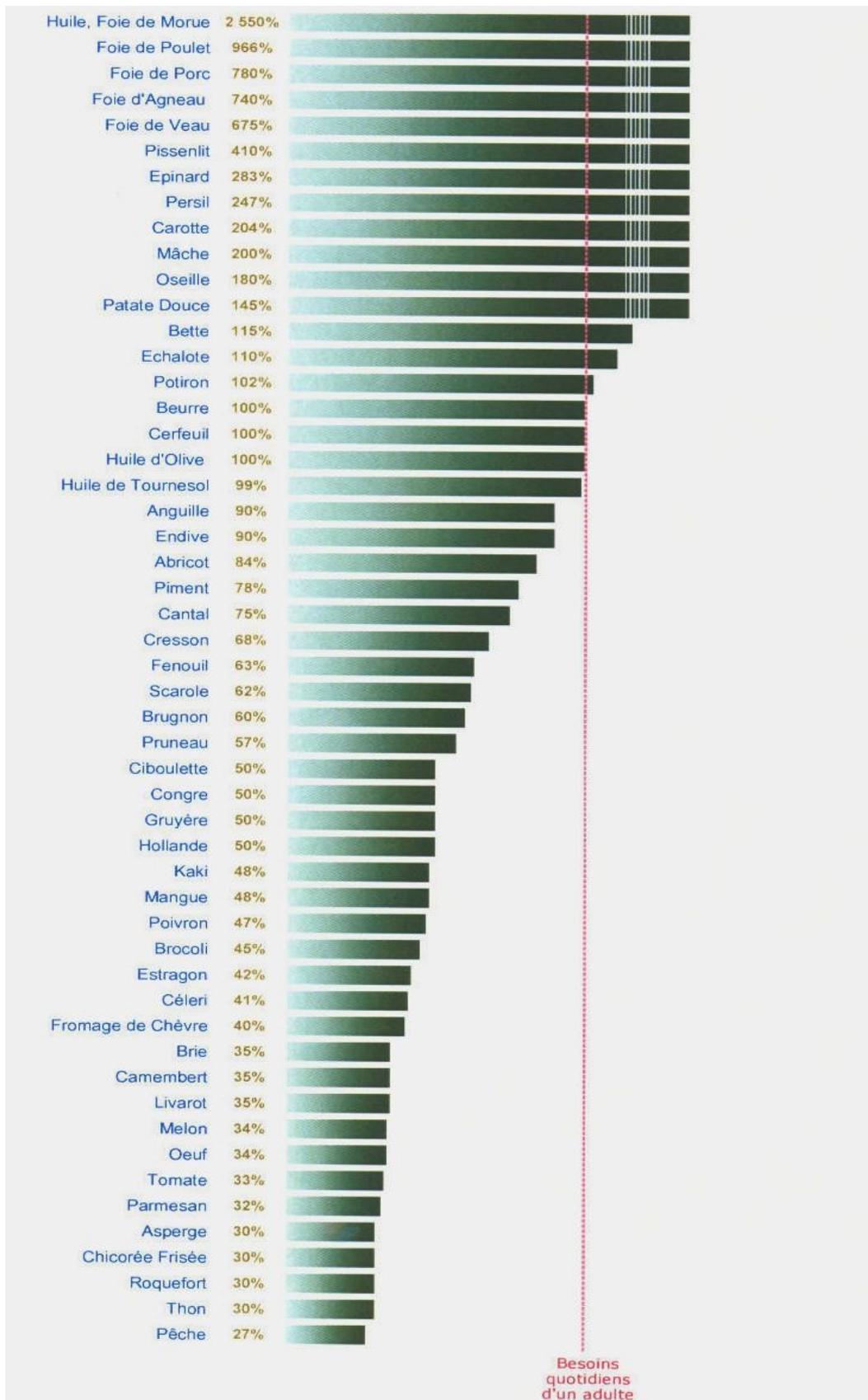
Sur les 600 caroténoïdes connus, 50 sont dits « actifs », c'est-à-dire qu'ils peuvent être convertis en Vit.A. En pratique, le β -carotène est de loin la pro-Vit.A la plus importante en raison de son abondance et du fait qu'il est le carotène dont la conversion en Vit.A est la plus efficace. Ainsi, le potentiel de transformation en Vit.A du β -carotène est de 50 (celui du rétinol étant de 100), tandis que celui des autres caroténoïdes (α -carotène, cryptoxanthine, etc) est de 25. L'absorption des caroténoïdes est aussi influencée par la génétique et le statut nutritionnel de l'individu (LaNutrition.fr, dossier Vitamine A).

A cause de cette diversité de provenance, les quantités Vit.A ne sont pas citées en grammes mais en équivalents rétinol (ER) ou en Unités Internationales (UI) ce qui permet de comparer l'activité vitaminique des différents dérivés de la Vit.A. Un ER est égal à 1 μ g de rétinol (isomère tout-trans) ou 3,33 UI. Théoriquement, un ER est aussi égal à 6 μ g de β -carotène ou 12 μ g de cryptoxanthines. Mais ces équivalences avec les caroténoïdes sont actuellement contestées, et il faudrait en réalité 10 μ g de β -carotène ou 20 μ g de cryptoxanthines pour donner un ER. Les besoins en Vit.A sont estimés à environ 3200 UI par jour pour un adulte (LaNutrition.fr, dossier Vitamine A).

La Vit.A est potentiellement plus dangereuse que la plupart des autres vitamines, puisqu'elle peut s'accumuler et atteindre des concentrations toxiques, particulièrement pour le foie. Il faut quand même souligner que le foie peut stocker jusqu'à 500 000 UI (150 mg) de Vit.A avant qu'il y ait surdose. Le β -carotène ne présente pas les mêmes risques puisque le corps ne convertit en Vit.A que la quantité dont il a besoin, évitant de la sorte un stockage excessif de cette vitamine (LaNutrition.fr, dossier Vitamine A).

Tableau 3. Présentation du pourcentage des besoins quotidiens en Vit.A d'un adulte fournis par 100 g de chaque aliment.

(Source : http://www.pvagenve.ch/attachments/Image/Nutrition%20et%20VIH/Vitamine_A.jpg)



Les besoins en Vit.A varient selon l'âge et le sexe entre 350 et 950 ER par jour soit 1200 à 3200 UI par jour. Les apports quotidiens conseillés en Vit.A pour chaque catégorie sont présentés dans le [Tableau 4](#).

Tableau 4. Apports conseillés en Vit.A, en ER et par jour.

(Source : [Apports nutritionnels conseillés pour la population Française, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 3^e édition, Ed. Tec & Doc](#))

Nourrissons	350
Enfants de 1 à 3 ans	400
Enfants de 4 à 6 ans	450
Enfants de 7 à 9 ans	500
Enfants de 10 à 12 ans	550
Adolescents de 13 à 15 ans	700
Adolescentes de 13 à 15 ans	600
Adolescents de 15 à 19 ans	800
Adolescentes de 15 à 19 ans	600
Homme adulte	800
Femme adulte	600
Personne âgée de plus de 75 ans	700 (hommes) 600 (femmes)
Femme enceinte	700
Femme allaitante	950



Figure 12. Principales sources alimentaires en Vit.A/rétinoïdes.

La carence en Vit.A est très fréquente dans les pays en voie de développement, si elle est moins fréquente dans les pays industrialisés elle n'est pas totalement absente. Les causes sont principalement les insuffisances d'apport, et les déficits causés par certaines maladies, ou leur traitement (malabsorption des gras, fibrose kystique, diarrhée chronique, maladies du foie, sida, maladie de Crohn, colite ulcéreuse, etc). Une consommation excessive et prolongée d'alcool peut également provoquer une déficience en Vit.A, particulièrement en AR.

Dans les pays en voie de développement, la carence en Vit.A est la première cause de cécité, elle est également responsable d'une mortalité infantile élevée après infection principalement par la rougeole (LaNutrition.fr, [dossier Vitamine A](#)). Dans les pays industrialisés, les états carenciels sont moins profonds et leurs signes sont donc plus discrets. Les symptômes de cette carence peuvent alors se manifester sous forme de :

- lésions cutanées (sécheresse et rugosité de la peau),
- troubles de la vision nocturne : la baisse de la vision nocturne ou héméralopie est un symptôme caractéristique de la carence en Vit.A,
- opacité de la cornée : la baisse de la vision nocturne est souvent accompagnée d'un dessèchement de la cornée ou xérophtalmie qui dans les cas les plus graves peuvent conduire à un épaississement de cette même cornée pouvant aller jusqu'à la cécité,
- problèmes de croissance osseuse : altération de la croissance osseuse produisant un arrêt de la croissance chez l'enfant,
- altération de l'émail des dents : diminution de la minéralisation débouchant sur une destruction de l'émail des dents,
- faible résistance aux maladies : faible résistance des organes aux infections virales accompagnée d'affections pulmonaires plus fréquentes,
- problèmes digestifs : perte d'appétit accompagnée de fréquentes diarrhées dues à une altération des cellules épithéliales de l'intestin.

La vitamine A étant liposoluble, il existe un véritable risque d'affections dues à une prise excessive de cette vitamine, en particulier sous forme de cocktails poly-vitaminiques. Des symptômes de cet excès peuvent alors se manifester : troubles de la vision (dédoublément de la vision des objets), altération du foie (la Vit.A étant accumulée au niveau du foie, il existe un risque d'augmentation du volume de cet organe), douleurs aux os, dessèchement de la peau, chute de cheveux, maux de tête, vomissements ([LaNutrition.fr, dossier Vitamine A](http://LaNutrition.fr/dossier/Vitamine_A)).

1.4. Rôles de la Vit.A/Rétinoïdes

Les différentes formes de Vit.A : rétinol, rétinal, acide rétinoïque all trans (at-AR) et acide rétinoïque 9-cis (9-cis AR), coexistent dans les tissus et sont en équilibre les unes avec les autres ([Figure 13](#)). Leur rôle n'est pas identique. Le rétinal joue un rôle essentiel dans la vision alors que l'AR intervient dans la croissance et la différenciation cellulaire.

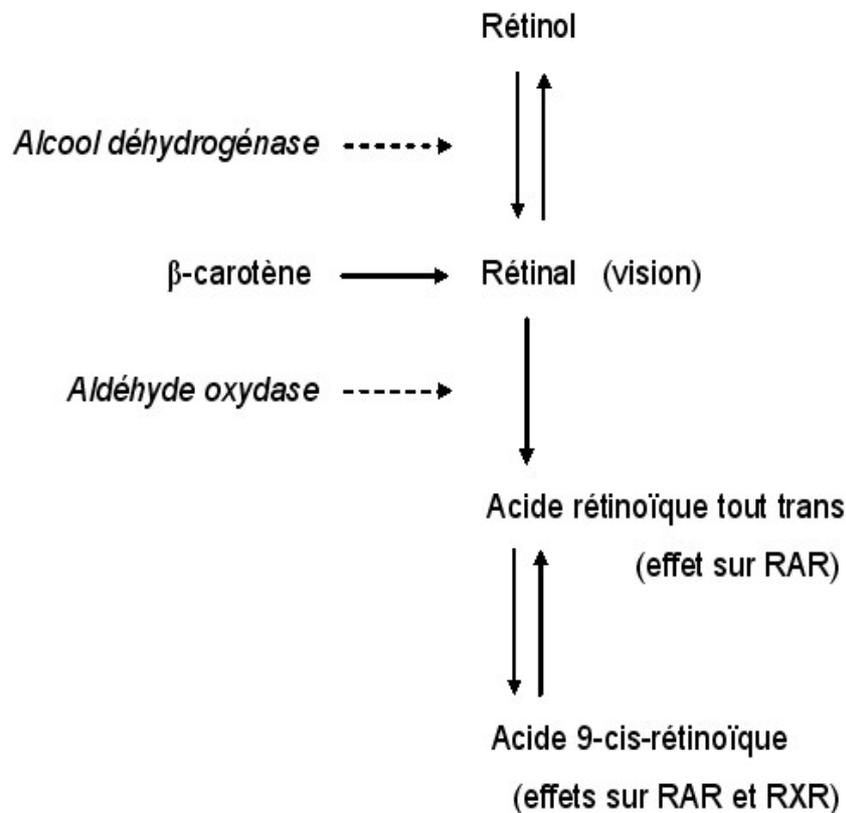


Figure 13. Interconversion des différentes formes de Vit.A.

(Source : http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Vitamines3_2.php)

Les actions de la Vit.A sont multiples (LaNutrition.fr, dossier Vitamine A) :

- Vision : La Vit.A joue un rôle important dans la vision, notamment au chapitre de l'adaptation de l'oeil à l'obscurité (vision crépusculaire). Dans les cellules en bâtonnet de la rétine, le rétinol se combine à la rhodopsine pour former un composé hautement sensible à la lumière. La lumière va scinder ce composé, ce qui va libérer de l'énergie et stimuler les terminaisons nerveuses directement connectées. Ce capteur va ensuite transmettre une image au cerveau par l'intermédiaire des nerfs optiques. L'un des premiers signes de carence vitaminique A est une mauvaise vision sous faible éclairage.

- Tissus : La Vit.A est impliquée dans la croissance et la différenciation cellulaire, favorisant ainsi le développement des tissus épithéliaux tels que la cornée, l'intestin et les voies respiratoires. La Vit.A est aussi impliquée dans la reproduction et dans la régulation du système immunitaire. Elle favorise l'absorption du fer, intervient dans la synthèse de certaines hormones telle la progestérone, et semble jouer un rôle dans la régulation des réponses inflammatoires. La Vit.A maintient également la santé de la peau (elle prévient l'acné et les dermatoses et favorise la cicatrisation) et la surface des tissus, principalement ceux qui ont des membranes muqueuses.

- Croissance : Par son rôle important dans le développement de nos cellules, la Vit.A est indispensable à la croissance de l'embryon et de l'enfant (elle est indispensable lors de la grossesse pour le développement du fœtus). Elle intervient notamment dans la croissance des tissus osseux.

- Défense immunitaire : La Vit.A participe activement à la résistance aux affections. Elle contribue à la santé de la peau et des muqueuses (yeux, voies respiratoires et urinaires, intestins), qui constituent notre première ligne de défense contre les bactéries et les virus. Elle aide ainsi à lutter contre les coups de froid et les infections.

- Anti-oxydant : La Vit.A est un anti-oxydant, elle protège contre les maladies en neutralisant les molécules d'oxygène instables, les radicaux libres, du corps. La molécule, qui comporte une partie hydrophobe et une partie hydrophile, est présente dans les membranes cellulaires qu'elle protège ainsi contre les réactions radicalaires.

- Anti-vieillessement : En bloquant le développement des radicaux libres, la Vit.A ralentit également le processus de vieillissement.

- Anti-cancer : Les actions de la Vit.A précédemment décrites expliquent en partie son effet anticancéreux. Son action sur les radicaux libres permet aussi à la Vit.A de prévenir l'apparition de certains cancers. La déficience en Vit.A pourrait augmenter les risques de certains cancers. Chez l'animal, l'administration de fortes doses de Vit.A réduit la croissance et le développement de certaines tumeurs. Le β -carotène et les caroténoïdes auraient un effet anticancérigène plus prononcé que la Vit.A elle-même. Plusieurs études ont montré chez l'homme une corrélation inverse entre la fréquence des cancers et l'élévation de la concentration des caroténoïdes dans le plasma mais il n'est pas prouvé qu'une supplémentation en carotène réduise leur fréquence. Chez l'animal, les caroténoïdes s'opposent au développement de diverses tumeurs.

2. MÉTABOLISME DE LA VIT.A/RÉTINOÏDES

Dans le tube digestif, le rétinol tout-trans et ses esters, qui représentent la plus grande partie de la Vit.A préformée, sont d'abord hydrolysés au niveau de l'intestin grêle afin de libérer le rétinol qui est alors intégré dans les micelles lipidiques intestinaux. Ceux-ci sont absorbés par les entérocytes par diffusion facilitée via un transporteur spécifique potentiel qui reste encore à définir ([Figure 14](#)).

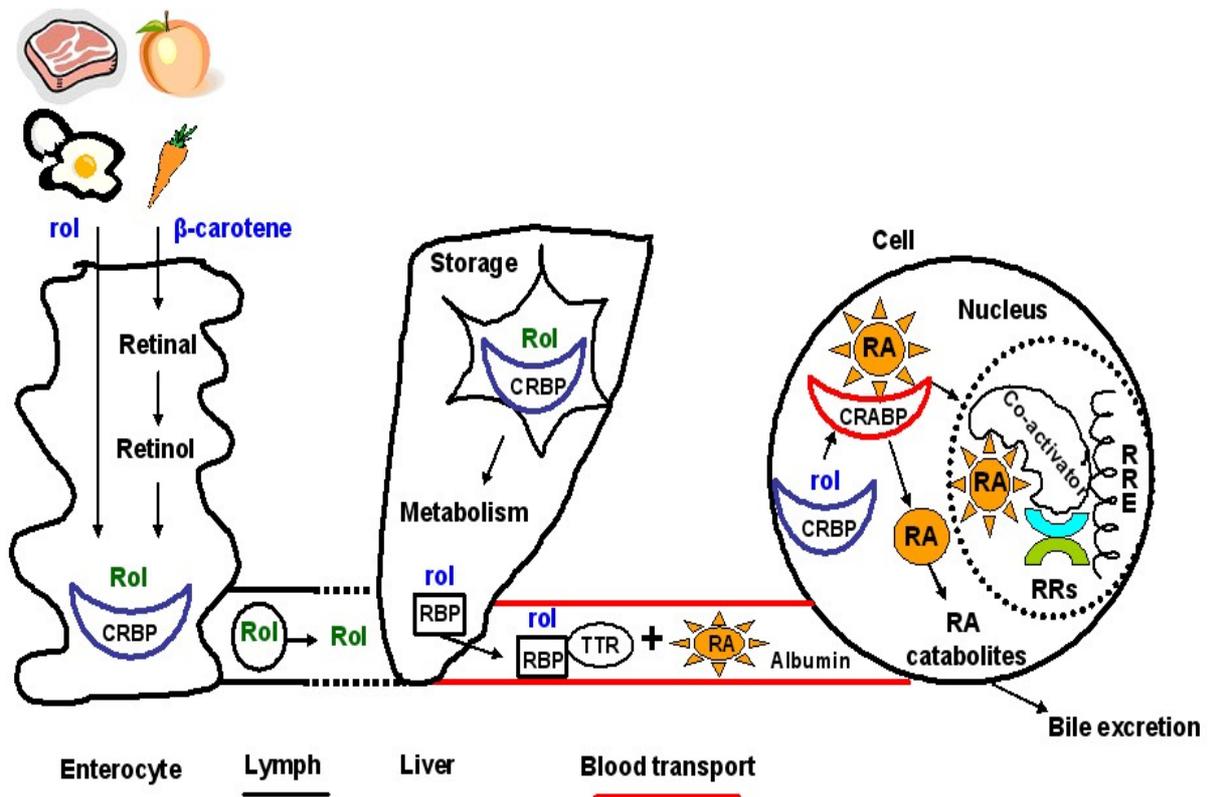


Figure 14. Métabolisme physiologique de la Vit.A/Rétinoïdes.

(Source : Poulain S, Evenou F, Carre MC, et al. Vitamin A/retinoids signalling in the human lung. *Lung Cancer*. 2009)

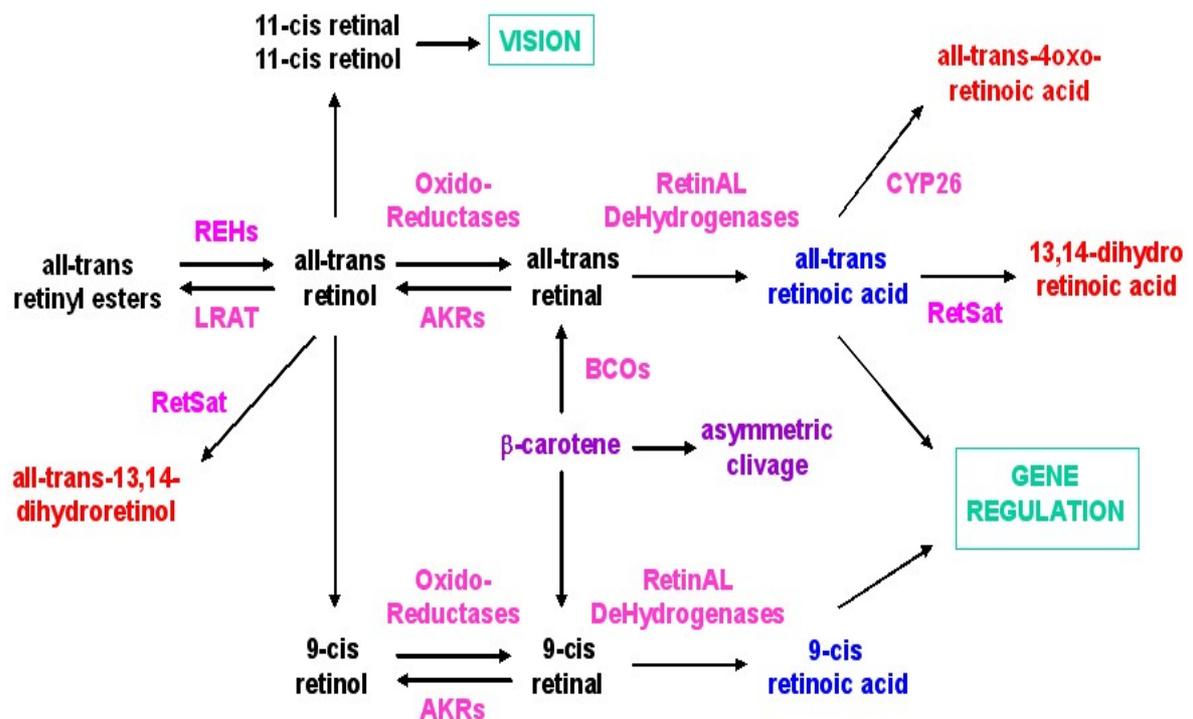


Figure 15. Métabolisme cellulaire de la Vit.A/Rétinoïdes.

(Source : Poulain S, Evenou F, Carre MC, et al. Vitamin A/retinoids signalling in the human lung. *Lung Cancer*. 2009)

Dans la cellule, le rétinol est ensuite pris en charge et complexé à son transporteur cellulaire spécifique : la Cellular Retinol Binding Protein II (CRBP_{II}), puis il est réestérifié afin d'être incorporé dans les chylomicrons, permettant ainsi son passage dans le système lymphatique par exocytose ([Figure 14](#)).

Les carotènes/caroténoïdes, qui représentent la pro-Vit.A, subissent quant-à eux un premier clivage oxydatif symétrique par les Beta-Carotene Oxygenase (BCOs) afin de donner du rétinal puis du rétinol dans les entérocytes ([Figure 15](#)). Après réestérification, celui-ci est comme précédemment incorporé dans les chylomicrons afin d'être libéré dans la lymphe ([Figure 14](#)). La conversion des caroténoïdes en rétinol dépend de la nature des besoins et de la digestibilité des aliments ingérés. Cette conversion est également possible dans le foie ainsi que dans d'autres organes. De petites quantités de caroténoïdes sont également oxydées chimiquement ou enzymatiquement. Les caroténoïdes non métabolisés, comme par exemple l' α -carotène, le lycopène, la lutéine ou la cryptoxanthine, peuvent de plus être complexés à des lipides ou à des lipoprotéines dans le plasma, les tissus adipeux, le foie, les glandes surrénales, les muscles et les ovaires ([Peters et al., 2007](#)). Le β -carotène peut également subir un clivage oxydatif asymétrique afin de fournir de l'apo-caroténal, dont la fonction métabolique reste encore méconnue.

Les esters de rétinol dérivant de l'intestin et qui gagnent la lymphe via les chylomicrons sont transportés majoritairement vers le foie afin d'y être stockés sous forme de rétinylesters par action de l'enzyme Lecithine:Retinol AcylTransferase (LRAT) ([Zolfaghari et al., 2004](#)) ([Figures 14](#) et [15](#)). Le foie est le lieu de réserve principal de l'organisme, il stocke 50 à 80% de la Vit.A totale. Les esters de rétinol hépatiques sont stockés pour environ 10% dans les hépatocytes et dans les cellules de Ito (cellules stellaires) pour le reste. Une partie minoritaire des esters de rétinol est néanmoins transportée puis stockée dans des tissus extra-hépatiques comme la moëlle hématopoïétique, le rein et le muscle squelettique ([Blaner, 1994](#)).

Les esters de rétinol ainsi stockés peuvent être libérés sur demande et orientés vers la synthèse d'AR dans les cellules cibles. Ils sont d'abord hydrolysés en rétinol tout-trans par la Retinol Ester Hydrolase (REH) ([Linke et al., 2005](#)) ([Figure 15](#)) puis, le rétinol ainsi libéré entre dans la circulation sanguine pour être transporté et finalement distribué dans les cellules spécialisées ([Figure 14](#)).

Étant donné qu'il s'agit, comme l'AR, d'une molécule hydrophobe, le rétinol est lié à des protéines chaperones spécifiques assurant son transport et son métabolisme adéquat. Dans le plasma, l'at-rétinol est transporté par une protéine synthétisée par le foie : la Retinol Binding Protein (RBP) ([Figure 14](#)), sous forme d'un complexe holo-RBP. Le niveau d'expression de RBP est régulé par différents moyens dont un mécanisme de rétro-contrôle en fonction du niveau d'AR disponible. [Formelli et al.](#) ont décrit en 1996 que le N-(4-hydroxy-phenyl)retinamide est capable d'abaisser la quantité de rétinol plasmatique en inhibant la libération de protéines holo-RBP à partir du foie. Ce composé a récemment été testé chez des fumeurs chroniques et il a été constaté une diminution de l'activité télomérase dans leur muqueuse bronchique ([Bowman et al., 2002](#)). Le gène encodant la protéine RBP est situé sur le chromosome 10q23-24, la protéine est majoritairement synthétisée par les hépatocytes et en quantités plus faibles dans les cellules stellaires, les reins, les poumons, la rate, les muscles et les tissus adipeux.

Dans le plasma, le rétinol tout-trans lié à la RBP se complexe avec la protéine TransThyRetin (TTR) ([Figure 14](#)), ce qui permet ainsi de réguler le niveau de rétinol libre dans le plasma et de prévenir la filtration incontrôlée du rétinol au niveau des reins. Les souris mutantes pour le gène TTR se développent normalement, même avec un niveau de rétinol plasmatique très bas. Un haut niveau d'at-AR est cependant observé ([Wei et al., 1995](#)).

La concentration de rétinol plasmatique augmente avec l'âge et elle est de l'ordre de 2 $\mu\text{mol/L}$ chez l'adulte. Il y a aussi environ 0,2 $\mu\text{mol/L}$ de rétinylesters dans les « fantômes de

chylomicrons » et dans les lipoprotéines de basse densité (LDL). L'AR plasmatique est quant-à lui complexé à l'albumine ([Figure 14](#)). La lipoprotéine lipase hydrolyse les triglycérides présents dans les chylomicrons afin de les convertir en « fantômes de chylomicrons ». Ceux-ci contiennent les rétynylesters, qui sont finalement retirés de la circulation sanguine par absorption au niveau des cellules cibles (principalement les cellules hépatiques). Les autres formes de Vit.A présentes dans le plasma (13-cis AR, at-AR, etc.) sont trouvées à des concentrations de l'ordre de 2-20 nmol/L. Dans le plasma humain, l'at-AR (lié à l'albumine sérique) est habituellement trouvé à une concentration 150 fois moins élevée que celle du rétinol.

Après adressage au niveau de la membrane plasmique de la cellule cible par un mécanisme encore flou (récepteur spécifique ?), le complexe RBP-rétinol est transporté passivement au travers de la membrane. Le rétinol est alors pris en charge par les « Cellular Retinol Binding Proteins I et II (CRBPs) », permettant ainsi son transport spécifique à l'intérieur des cellules ([Ghyselink et al., 1999](#)) ([Figure 14](#)). Dans le foie, ces 2 protéines protègent également le rétinol d'une oxydation incontrôlée par des déshydrogénases non spécifiques reconnaissant le rétinol libre. Dans les entérocytes, les CRBPs jouent le rôle de transporteurs de substrats pour la synthèse des esters de rétinol. Chez l'homme, CRBP I est principalement exprimée dans le foie, bien que de petites quantités soient retrouvées dans les reins et les testicules. Les gènes CRBPs sont localisés sur le chromosome 3q21-22. CRBP II est principalement trouvée dans les entérocytes matures et également en petites quantités dans le plasma, le colon, le foie et les yeux. L'interruption du gène CRBP I produit des souris presque normales si elles sont nourries avec une alimentation riche en Vit.A, indiquant ainsi que CRBP I n'est pas essentielle pour la synthèse de l'AR.

Chez les vertébrés, de multiples oxydo-réductases, comme par exemple les Retinol DeHydrogenases microsomaux (RDHs) ([Lidén et al., 2003](#)) ([Figure 15](#)) sont impliquées dans

l'interconversion réversible rétinol/rétinal. Ces enzymes sont ubiquitaires, chevauchantes et redondantes. Les enzymes qui appartiennent à la famille des Medium-chain Dehydrogenases/Reductases (comme par exemple les Alcohol Dehydrogenases ou ADHs), ainsi que celles de la famille des Short-chain Dehydrogenases/Reductases (SDRs) ont une double spécificité de substrat rétinol/stérol ([Duester, 2000](#); [Moise et al., 2005](#)). Les Aldo-Keto Reductases (AKRs) ([Penning., 2005](#)) catalysent quant-à elles la conversion inverse du rétinol en rétinol ([Figure 15](#)). Les RetinAL DeHydrogenases (RALDHs), convertissent le rétinol en at-AR dans les cellules spécialisées qui utilisent l'at-AR et le 9-cis AR comme ligands spécifiques pour les récepteurs aux rétinoïdes ([Figure 14](#)). L'interruption du gène RALDH2 chez la souris a démontré que l'at-AR produit par l'embryon est essentiel pour sa survie et sa morphogénèse. Toutes les anomalies induites par cette interruption génique peuvent cependant être corrigées par administration d'at-AR maternel ([Niederreither et al., 1999](#)).

Pour la signalisation cellulaire des RRs, le rétinol est principalement métabolisé sous forme d'at-AR et de 9-cis AR, mais aussi et non exclusivement en 13,14 dihydro-AR via la RetSaturase ([Figure 15](#)). Les « Cellular Retinoic Acid Binding Proteins I et II (CRABPs) » transportent uniquement l'at-AR, celui-ci possède une affinité supérieure pour CRABP I ([Lampron et al., 1995](#)) ([Figure 14](#)). Les CRABPs protègent l'at-AR d'un métabolisme inadéquat dans les cellules cibles et elles fonctionnent comme des transporteurs de substrats pour le catabolisme de l'at-AR sous forme de catabolites polaires actifs ou inactifs. Ces catabolites sont par la suite conjugués à l'acide glucuronique avant d'être excrétés par la bile.

Les gènes CYP26 (A1, B1 et C1) ([Abu-Abed et al., 2001](#)), et probablement CYP1A1 et CYP3A, sont les cytochromes p450 impliqués dans la dégradation de l'at-AR sous forme de 4-oxo-AR ainsi que d'une variété d'autres catabolites dont les activités biologiques

demeurent méconnues. Le 4-oxo-AR a néanmoins été décrit comme le rétinoïde spécifiant l'axe tête-queue chez l'embryon *Xenopus* ([Maden, 2000](#)).

CRABP I est exprimée dans les tissus contenant de faibles quantités d'at-AR comme par exemple dans les testicules, les ovaires, le cerveau et les yeux. CRABP II est très fortement exprimée dans la peau durant l'embryogénèse. Le gène CRABP I est localisé sur le chromosome 3p11 et celui de CRABP II sur le chromosome 1q21. Leurs expressions sont régulées au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel et les 2 gènes sont inductibles par l'at-AR. Les distributions tissulaires de ces protéines chez les rongeurs et les humains sont différentes. Les souris déficientes en CRABP II ou en CRABP I et II apparaissent majoritairement normales ([Lampron et al., 1995](#)).

L'at-AR et le 9-cis AR sont les ligands spécifiques des RARs/RXRs dans les noyaux des cellules où ils fonctionnent comme des facteurs de transcription. Il est cependant fort probable que d'autres ligands naturels de ces récepteurs existent.

D. LES RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES

En plus de leurs rôles dans la chimioprévention et dans la transformation maligne de l'épithélium bronchique, les rétinoïdes jouent un rôle crucial dans une large gamme de processus biologiques dont la morphogénèse embryonnaire des organismes vertébrés, le maintien de l'homéostasie cellulaire par prolifération et différenciation, ainsi que dans le processus d'apoptose. Les rétinoïdes exercent ces effets pléiotropiques par l'intermédiaire de 2 classes de transactivateurs nucléaires ligand-dépendants : les RARs qui sont activés par l'at-AR et son isomère 9-cis, et les RXRs activés uniquement par le 9-cis AR. Il existe 3 isotypes de RARs (α , β , et γ) et 3 isotypes de RXRs (α , β , et γ) qui sont encodés par différents gènes ([Mangelsdorf et al., 1995](#)) ([Tableau 5](#)).

Tableau 5. Clonage et localisation chromosomique des gènes RRs chez l'homme et la souris.(Source : [Picard E, 1999](#))

Récepteur	Espèce	Référence	Localisation chromosomique	Référence
RAR α	Homme	Giguere et al., 1987 ; Petkovitch et al., 1987	17q21.1	Mattei et al., 1988a
	Souris	Zelent et al., 1989	11	Mattei et al., 1991
RAR β	Homme	Brand et al., 1988 Benbrook et al., 1988	3p24	Mattei et al., 1988b
	Souris	Zelent et al., 1989	14	Ceci et al., 1990
RAR γ	Homme	Krust et al., 1989 Ishikawa et al., 1990	12q13	Ishikawa et al., 1990
	Souris	Zelent et al., 1989	15	Mattei et al., 1991
RXR α	Homme	Mangelsdorf et al., 1990	9q34.3	Mangelsdorf et al.,
	Souris	Mangelsdorf et al., 1992 Leid et al., 1992	2	Hoopes et al., 1992
RXR β	Homme	Leid et al., 1992 Fleischhauer et al., 1992	6p21.3	Mangelsdorf et al., 1992
	Souris	Hamada et al., 1989 Mangelsdorf et al., 1992 Leid et al., 1992		
RXR γ	Homme		1q22-23	Seldin, 1992
	Souris	Mangelsdorf et al., 1992 Leid et al., 1992	1	Hoopes et al., 1992

Chez l'homme, les gènes RAR α , β , et γ sont respectivement localisés sur les chromosomes 17q21.1, 3p24 et 12q13, alors que les gènes RXR α , β et γ sont respectivement sur les chromosomes 9q34.3, 6p21.3 et 1q22. Pour chaque isotype de RR, il existe au moins 2 isoformes principales de transcrits ARNm qui sont générées à partir de l'usage de promoteurs différentiels ou par épissage alternatif. Pour un RR donné, les différentes isoformes de protéines traduites à partir de ces transcrits ARNm ne diffèrent donc qu'au niveau de leurs extrémités N-terminales. Les cellules du poumon humain adulte normal expriment tous les RARs et les RXRs mais à différents niveaux d'expression ([Picard et al., 1999](#)). RAR β 2 et RAR β 4, qui sont traduites à partir des ARNm encodées par le promoteur P2-RAR β , sont les principales isoformes protéiques exprimées dans le poumon.

Les facteurs de transcription de type RARs et RXRs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdiens/thyroïdiens et se caractérisent par la présence dans leur structure de plusieurs domaines fonctionnels organisés en modules autonomes. Ces modules sont respectivement désignés de A à F de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale de chaque récepteur ([Figure 16](#)).



Figure 16. Représentation schématique d'un récepteur nucléaire de type RR.

(Source : [Poulain S, Evenou F, Carre MC, et al. Vitamin A/retinoids signalling in the human lung. *Lung Cancer*. 2009](#))

La module C, hautement conservée, est située en position centrale. Il contient le domaine de liaison à l'ADN ou « DNA Binding Domain (DBD) » ainsi que 2 motifs en « doigt de zinc » permettant la reconnaissance de séquences d'ADN spécifiques, qui correspondent dans le cas des RRs aux Éléments de Réponse à l'Acide Rétinoïque (RAREs) et aux Rétinoïdes X (RXREs) situés au niveau de la région promotrice des gènes cibles dont ils régulent la transcription.

Le module E, situé à l'extrémité carboxy-terminale, est une région fonctionnelle contenant le domaine de fixation du ligand ou « Ligand Binding Domain (LBD) », le domaine de dimérisation et une fonction de transactivation AF-2 ligand-dépendante. Cette dernière fonction dépend de l'intégrité d'une hélice alpha-amphipatique hautement conservée, le cœur AF-2 AD, correspondant à l'hélice 12 de l'extrémité C-terminale du LBD. Le module E varie entre chaque type de RR. La région D contient un signal de localisation nucléaire, elle est située entre le DBD et le LBD et possède donc un rôle de région charnière. La fonction, s'il en est une, de la région F, qui est absente chez les RXRs, demeure inconnue.

La région amino-terminale AB contient une fonction de transactivation AF-1 ligand-indépendante. Pour un RAR donné, l'activité de la fonction AF-1 agit en synergie avec celle de la fonction AF-2. Les régions A sont différentes entre les différentes isoformes d'un même isotype de RAR ou de RXR. La région B est en revanche relativement bien conservée entre les différents RARs. Cette région est phosphorylée spécifiquement au niveau d'un résidu sérine par la kinase cdk7, cycline H-dépendante, associée au facteur général de transcription TFIIH qui est impliqué dans la réparation de l'ADN. La région B est absente des RXRs, qui sont quant-à eux phosphorylés au niveau de leurs régions A par une autre kinase cycline H-dépendante, distincte de cdk7 ([Bastien et al., 2004](#)).

En tant que facteurs de transcriptions, les RARs et RXRs activent la machinerie transcriptionnelle lorsqu'ils se lient sous forme d'hétérodimères à leurs éléments de réponse spécifiques localisés dans les régions promotrices de leurs gènes cibles (gènes répondant à l'AR). Ces éléments de réponse (RAREs) consistent en 2 demi-sites répétés directement (motif puG(G/T)TCA) avec un espace de 5 pb (élément DR5), 2 pb (élément DR2) ou 1 pb (élément DR1) ([Bastien et al., 2004](#)) ([Figure 17](#)). Les éléments DR1 peuvent lier indifféremment les hétérodimères RAR/RXR ou les homodimères RXR/RXR. Les RXRs peuvent également se dimériser avec une variété d'autres récepteurs nucléaires : récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR), récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs), récepteurs orphelins, etc.

Les gènes répondant à l'AR sont nombreux (plus de 300 !), ils incluent le gène RAR β lui-même, qui contient un motif de type DR5 (β -RARE) dans la séquence de son promoteur P2, responsable de l'induction de l'expression de RAR β 2 dans divers types cellulaires suite à l'addition d'AR. Lorsqu'ils sont liés aux RAREs, ainsi qu'à leurs ligands, les dimères RARs/RXR activent alors la transcription des gènes répondant à l'AR mais répriment également les gènes contenant des sites de liaison AP-1 dans leurs promoteurs. À l'opposé,

les complexes AP-1 (c-jun/c-fos) sont capables d'inhiber l'expression des gènes qui sont sous le contrôle des RAREs. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cet antagonisme réciproque restent méconnus.

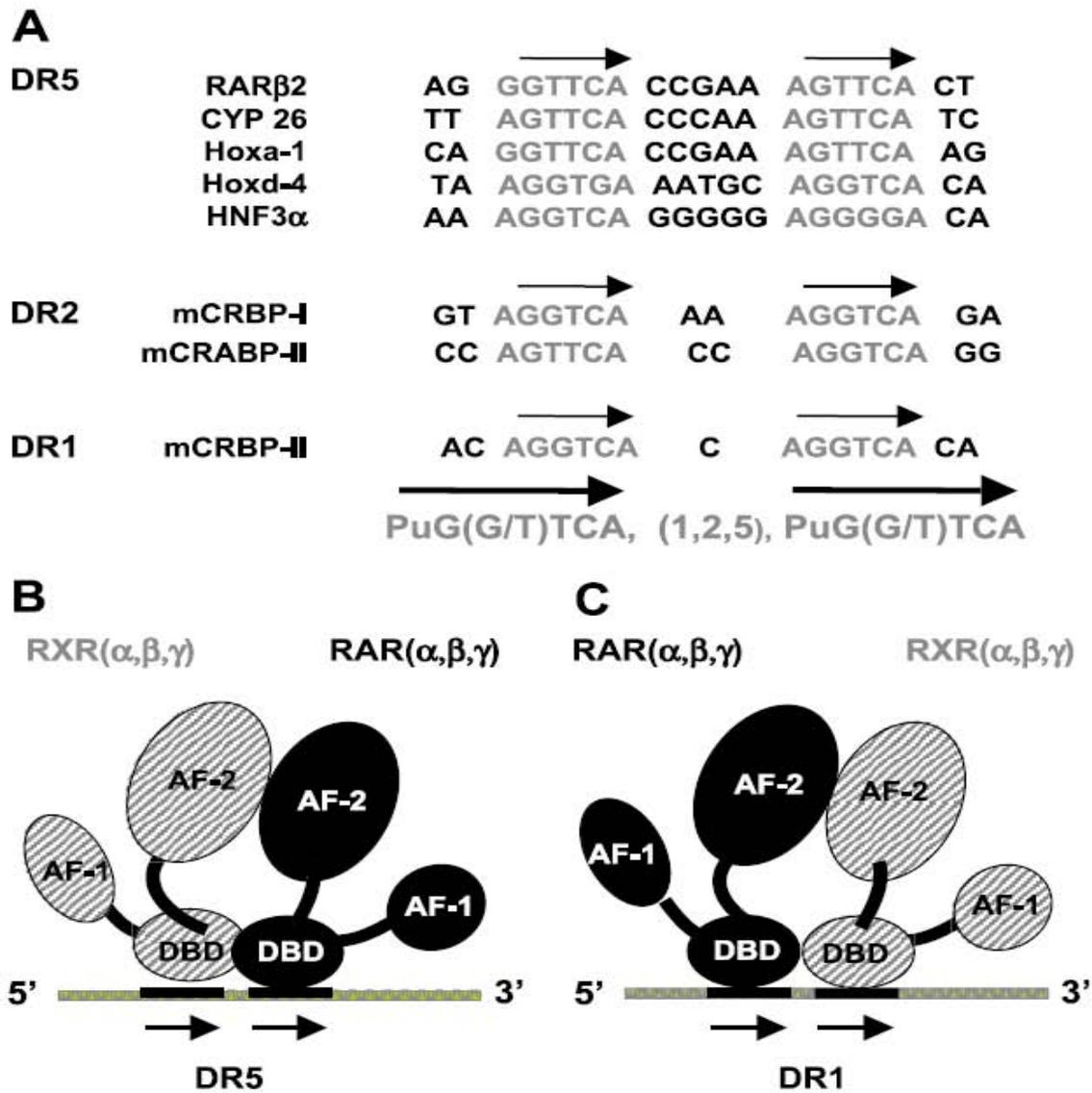


Figure 17. Présentation des modalités de liaison des dimères de RRs à leurs éléments de réponse.

(Source : [Bastien J, Rochette-Egly C. Gene, 2004;328:1-16](#))

- (A) L'élément de réponse à l'acide rétinoïque classique consiste en une répétition directe du motif 5'-puG(G/T)TCA espacé par 1 (DR1), 2 (DR2), ou 5 (DR5) paires de bases. Les séquences d'éléments de réponse aux rétinoïdes classiques situés dans les régions promotrices de certains gènes cibles de l'AR sont indiquées.
- (B) Les hétérodimères RXR/RAR lient les éléments de réponse DR2 et DR5, le partenaire RXR occupant le motif situé en 5'
- (C) Les éléments de réponse de type DR1 lient indifféremment les homodimères RXRs ou les hétérodimères RAR/RXR avec une polarité inversée.

La liaison du ligand conduit à des modifications majeures dans la conformation spatiale des RARs et des RXRs. Ces modifications de structures incluent le pivotage de l'hélice 12 (cœur AF-2 AD) qui referme alors comme un couvercle la poche du récepteur permettant la liaison du ligand. Ceci a pour effet de créer un nouveau site de liaison pour les co-activateurs, alors que les co-répresseurs sont quant-à eux libérés, initiant ainsi d'autres interactions avec les histones acétylases et la machinerie transcriptionnelle et permettant de procéder au remodelage de la chromatine puis à la transcription des gènes cibles.

L'activation de la transcription du gène cible par les dimères de RRs se fait selon un mécanisme d'action en 3 étapes ([Bastien et al., 2004](#)) ([Figure 18](#)).

(A) En l'absence de ligand, les dimères de RRs liés aux éléments de réponses localisés dans la région promotrice de leurs gènes cibles sont associés à des complexes de répression à activité type Histone DeAcetylase-Containing (HDAC), attachés à des co-répresseurs (NcoR/SMRT), et inhibant la transcription du gène cible.

(B) Suite à la liaison de l'AR, les co-répresseurs se dissocient du complexe de répression, permettant alors le recrutement de co-activateurs associés à des complexes d'activation qui présentent des activités de type Histone AcetylTransferase (HAT), méthyltransferase, et kinase. Les co-activateurs sont également associés à d'autres complexes (SWI/SNF) permettant le remodelage ATP-dépendant de la chromatine. Ceci permet ainsi de procéder à la décompaction de la chromatine responsable de la répression du gène cible.

(C) Lors de la 3^{ème} étape, les co-activateurs se dissocient et le complexe médiateur SMCC ou « Srb and Mediator protein Containing Complex » s'assemble. Le médiateur accélère alors l'entrée de l'ARN Polymérase II et des facteurs de transcription généraux (TFIIs, TBP, TAF) dans le promoteur, permettant ainsi d'initier la transcription du gène cible.

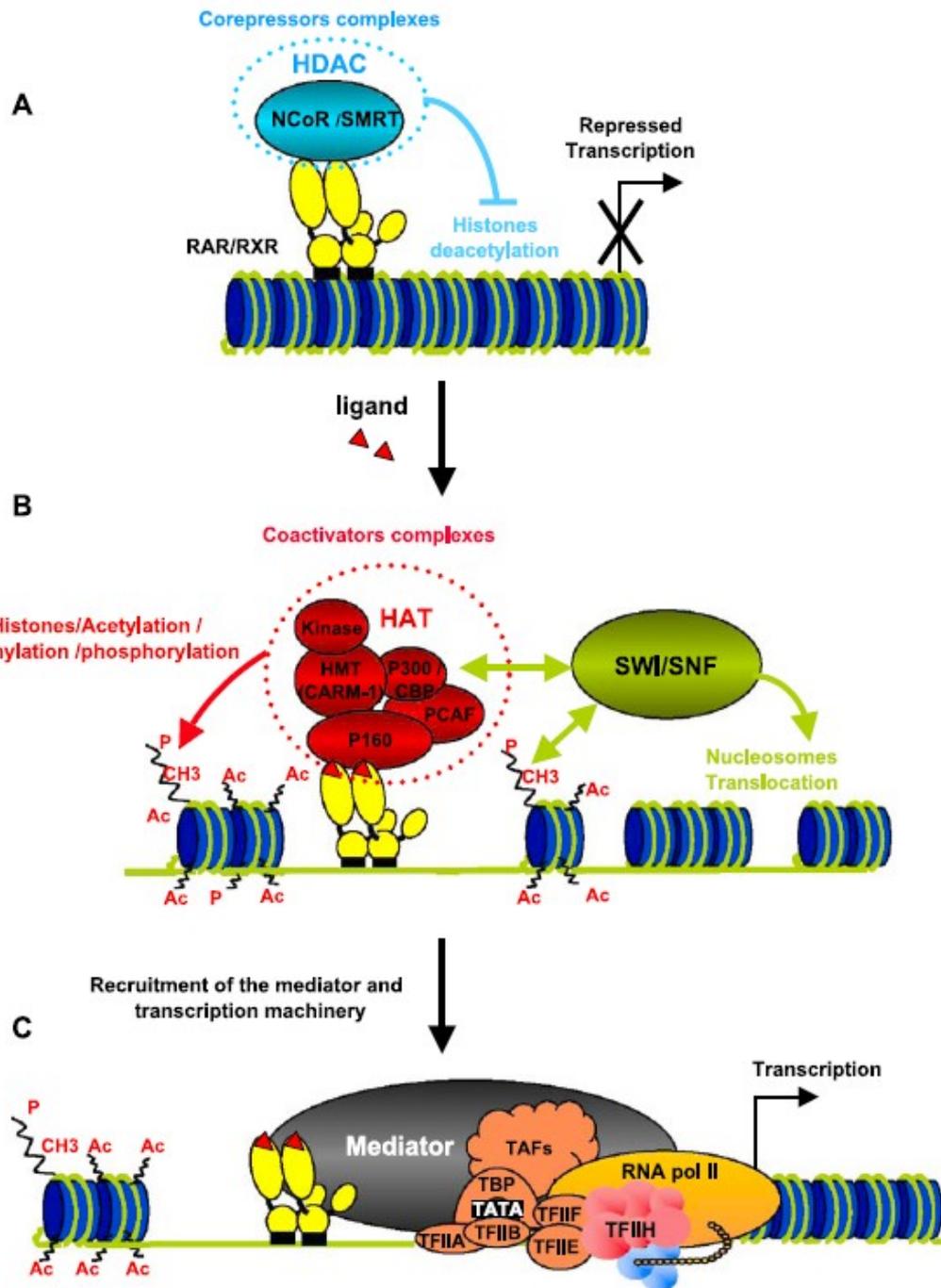


Figure 18. Représentation schématique du mécanisme d'action en 3 étapes permettant aux dimères de RRs d'activer la transcription de leurs gènes cibles.
 (Source : Bastien J, Rochette-Egly C. *Gene*. 2004;328:1-16)

E. RÉTINOÏDES ET DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME RESPIRATOIRE

Le système respiratoire humain ne devient véritablement opérationnel qu'à la naissance et il se développe jusqu'à la puberté. Au cours de la 4^{ème} semaine du développement embryonnaire, la partie caudale du sillon laryngo-trachéal (pharynx) forme un tube d'endoderme (ébauche pulmonaire) à partir duquel vont se différencier les cellules épithéliales et les glandes trachéales afin de donner naissance à l'arbre bronchique ([Figure 19](#)).

En parallèle, les cellules du mésoderme splanchnique entourent ce tube respiratoire, formant ainsi le tissu conjonctif du système respiratoire. Les 2 bourgeons pulmonaires primitifs se séparent alors et se divisent chacun régulièrement jusqu'à obtenir 17 générations de bronches et bronchioles au bout de 6 mois de développement ([Figure 19](#)). Cette ramification des bronches va se poursuivre jusqu'à la puberté.

Les cellules trachéales et bronchiques se transforment en cellules ciliées au bout de la 10^{ème} semaine de développement, les glandes à mucus apparaissent après 12 semaines, alors que le développement des alvéoles pulmonaires débute à la 16^{ème} semaine ([Figures 19](#) et [20](#)). Aux alentours de la 23^{ème} semaine de développement, des corps d'inclusion de type lamellaire sont observables au microscope électronique dans le cytoplasme des pneumocytes de type II, indiquant que la synthèse de surfactant a commencé ([Figures 19](#) et [20](#)). Finalement, les cavités pleurales dérivent des cavités cœlomiques primitives (mésoderme) avec une individualisation progressive à partir des cavités péricardiques et péritonéales ([Netter, 1980](#)). Les effets des rétinoïdes seraient médiés en fonction des changements d'expression de gènes homéotiques comme par exemple les gènes Hox ou Sonic Hedgehog.

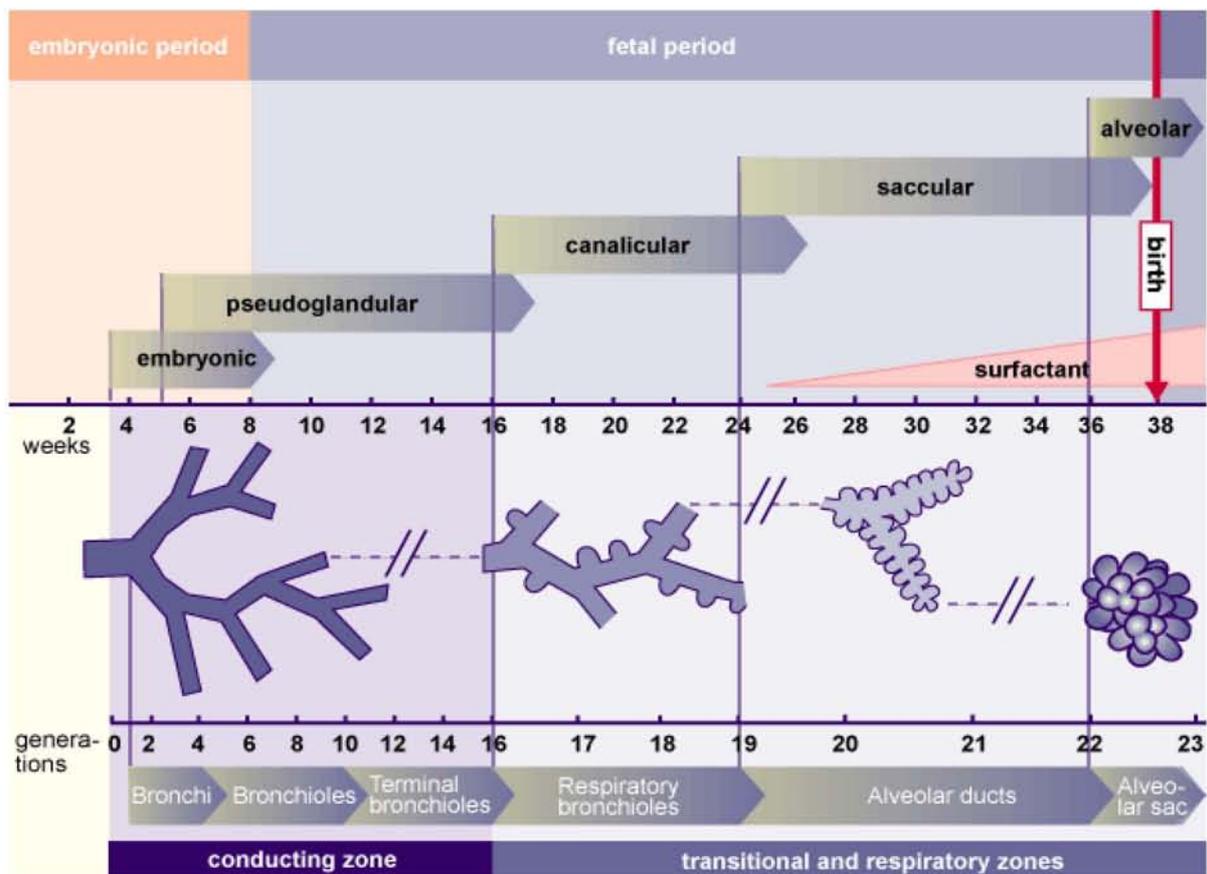
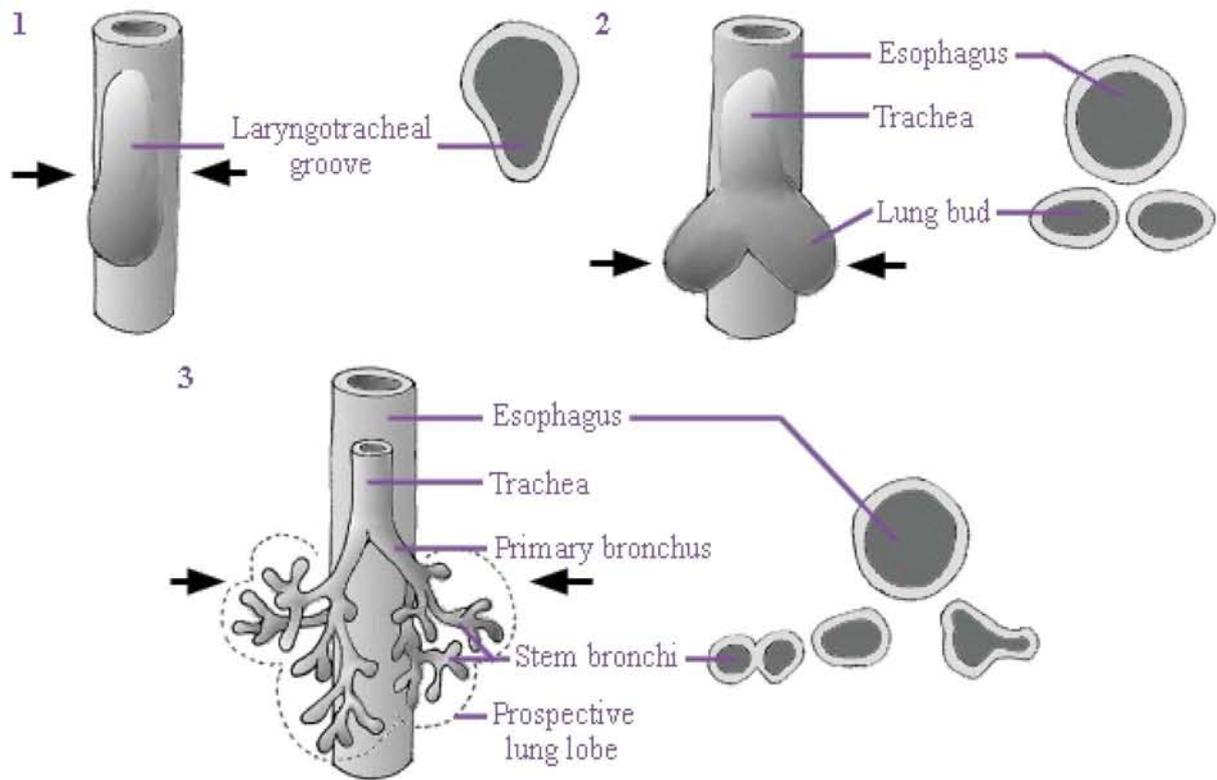


Figure 19. Présentation du développement prénatal du système respiratoire humain.
 (Sources : <http://www.uoguelph.ca/zoology/devobio/210labs/lung1.html> et <http://www.embryology.ch/anglais/respiratory/phasen07.html>)

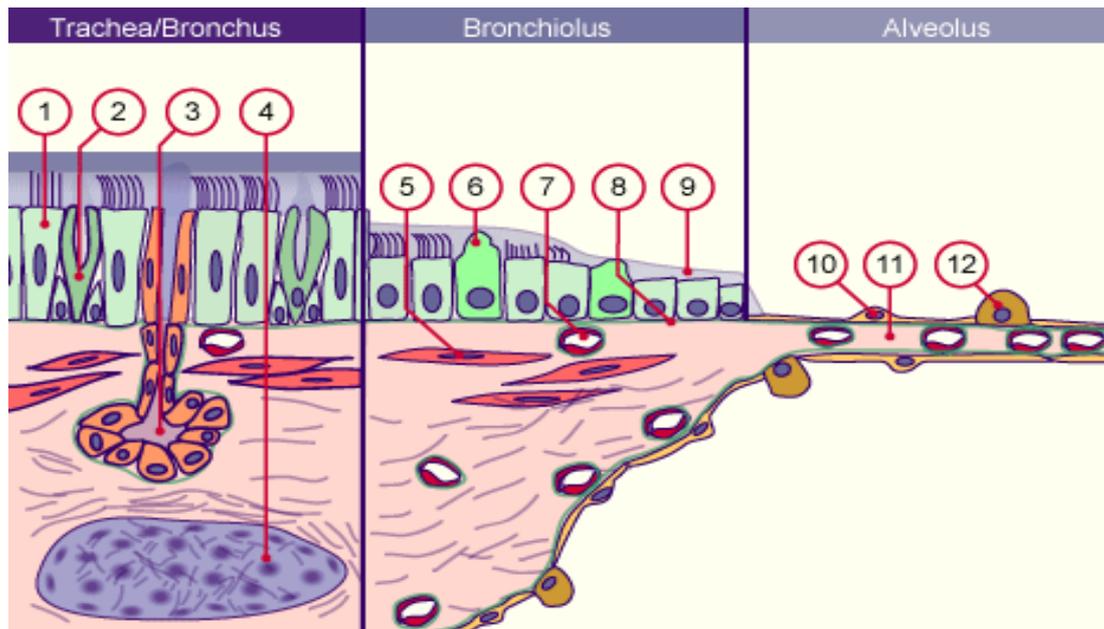


Figure 20. Représentation schématique des structures histologiques et cytotologiques composant les différentes structures du système respiratoire.

(Source : <http://www.embryology.ch/anglais/rrespiratory/phasen07.html>)

1 : épithélium cilié, 2 : cellule caliciforme, 3 : glande, 4 : cartilage, 5 : cellule musculaire lisse, 6 : cellule de Clara, 7 : capillaire, 8 : membrane basale, 9 : surfactant, 10 : pneumocyte de type I, 11 : septum alvéolaire, 12 : pneumocyte de type II.

Chez l'homme, les stocks de Vit.A présents dans le poumon fœtal sont importants durant le dernier trimestre de la vie embryonnaire, mais ils diminuent après le terme de la grossesse et au cours du début de la période post-natale. Après la naissance ou chez les nouveaux-nés prématurés, une carence alimentaire en Vit.A résulte en une métaplasie squameuse de l'arbre respiratoire ([Mollard et al., 2000](#)). Une supplémentation en AR conduit à une augmentation de la synthèse de surfactant alors qu'une supplémentation en Vit.A assure une protection contre la sépticémie et la déficience respiratoire.

Chez les rongeurs, des carences fonctionnelles en AR ou en rétinol conduisent à des anomalies similaires à celles observées dans le cas d'une dysplasie bronchopulmonaire. Les animaux sont stériles et ont des fonctions immunitaires gravement altérées. Leur épithélium trachéal muqueux se différencie en un épithélium squameux pseudo-stratifié (métaplasie squameuse).

Une déficience totale en AR fœtal induit chez les embryons un large éventail d'anomalies affectant le cerveau, les yeux, les dents, les membres, le système urogénital, le cœur et les poumons. Un excès en AR fœtal induit la croissance de structures proches de celles des voies aériennes proximales mais avec absence des bourgeons épithéliaux distaux. L'AR induit aussi la régénération des alvéoles pulmonaires chez des souris modèles atteintes d'emphysème ([Hind et al., 2004](#)). Cependant, il doit être souligné que les poumons des hommes et des rongeurs sont différents. En effet, alors que les humains respirent à la fois avec la bouche et le nez, les rongeurs respirent principalement avec le nez. Les rongeurs développent aussi expérimentalement des modèles d'adénomes pulmonaires malins qui sont rarement observés chez les humains.

Des études de carences en Vit.A appliquées chez l'animal à différents stades du développement embryonnaire ont montré que l'AR est important pour le développement de nombreux organes, ceci à différents stades de leur développement plutôt qu'à un seul. Néanmoins, l'absence de développement des poumons est observée uniquement chez les animaux carencés à des stades tardifs de l'embryogénèse. Les carences ou les excès en AR imposés aux embryons conduisent à des anomalies similaires, indiquant que les niveaux d'AR doivent être régulés avec précision au cours de l'embryogénèse ([Maden, 2000](#)).

Dans les poumons, le signal rétinolique serait conduit par l'intermédiaire de RAR β , et non par celui de RAR γ . Les niveaux d'expression de CRBP I apparaissent aussi importants pour le contrôle de la morphogénèse des ramifications bronchiques ([Gottesman et al., 2001](#)). Chez l'animal modèle, l'extrémité postérieure de l'embryon produit de l'AR alors que la tête qui se développe à l'autre extrémité le métabolise. À l'origine, l'extrémité antérieure de l'embryon se développe en absence d'at-AR mais celui-ci devient nécessaire lors du développement du tronc. Il existe également une relation intrigante entre la répartition des

enzymes permettant la synthèse des rétinoïdes et celle de CYP26 qui utilise l'AR comme substrat ([Borel et al., 2005](#)).

La répartition des RARs/RXRs a été analysée intensivement dans l'embryon de souris mais à des stades de développement précoces. Le gène $RAR\alpha$ est exprimé de façon ubiquitaire, alors que $RAR\beta$ et $RAR\gamma$ sont exprimés à des stades limités dans l'espace et dans le temps : le premier est exprimé au niveau de l'épithélium bronchique et le second au niveau de la condensation mésenchymateuses pré-cartilagineuse. Plus tard, l'expression de $RAR\alpha$ est également observée au niveau des arcs branchiaux ([Dupé et al., 1999](#)). Récemment, seules les expressions de $RAR\alpha$ et de $RXR\alpha$ ont pu être observées au niveau du site d'implantation de l'embryon ([Tarrade et al., 2000](#)). Au vu de ces informations, il apparaît évident et nécessaire de procéder à des études supplémentaires sur l'expression des RRs dans les tissus embryonnaires.

F. MODÈLES DE SOURIS KNOCK-OUT POUR LES RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES

Afin de déterminer les fonctions des différents gènes et isoformes RRs au cours du développement normal de l'embryon, des modèles spécifiques de souris knock-out ont été créés ([Mangelsdorf et al., 1995](#)).

Les souris $RAR\alpha^{-/-}$ et $RAR\gamma^{-/-}$ ont montré plusieurs symptômes comparables à ceux observés dans le cas d'un syndrome de carence post-natale en AR : létalité, faible prise de poids et stérilité des mâles ; les différents symptômes observés pouvant être soignés ou prévenus à l'aide d'une supplémentation en AR. Les souris modèles $RAR\beta^{-/-}$ ont quant-à elles présenté des membranes rétro-lenticulaire persistantes au niveau des yeux. Les souris mutantes pour un seul RAR se sont développées de façon quasi-normale, indiquant l'existence d'un certain degré de redondance entre les fonctions attribuées à chacun des RARs.

Les souris mutantes composites $RAR\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$, $RAR\alpha^{-/-}\gamma^{-/-}$ ou $RAR\beta^{-/-}\gamma^{-/-}$ ont montré les caractéristiques partielles d'un syndrome de carence fœtale en AR. Chez les doubles mutants $RAR\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$, ont été observées : une absence de poumon gauche, une hypoplasie du poumon droit, une absence de septum oesophago-trachéal, ainsi que des anomalies laryngo-trachéales. Chez les souris KO pour des isoformes spécifiques de RAR α , β ou γ , une absence des anneaux trachéaux a été observée et les animaux sont apparus de légèrement à sévèrement affectés.

Les souris $RXR\alpha^{-/-}$ sont mortes entre 12,5 et 16,5 jours après le début du développement embryonnaire et elles ont présenté toutes les caractéristiques d'un syndrome de carence fœtale en AR, avec des malformations graves de la face, des membres, du cœur et des poumons. Les mutants $RXR\alpha^{+/-}$ ont quant-à eux montré uniquement de légères malformations au niveau de la trachée. Les souris femelles $RXR\beta^{-/-}$ sont viables mais les mâles sont stériles, probablement à cause d'une anomalie du métabolisme des lipides dans les cellules de Sertoli. Les mutants $RXR\gamma^{-/-}$ sont viables, fertiles et ils ont une morphologie normale ([Mendelsohn et al., 1994](#)).

Les mutants $RXR\gamma$ placés dans un environnement génétique $RXR\alpha^{-/-}$ n'ont pas montré d'anomalies supplémentaires, alors que les doubles mutants composites $RXR\beta^{-/-}/RXR\gamma^{-/-}$ sont apparus morphologiquement normaux mais avec cependant des problèmes de locomotion. Les embryons $RXR\alpha^{-/-}/RXR\beta^{-/-}$ sont morts plus précocément que les mutants $RXR\alpha^{-/-}$ et ils ont présenté une hypoplasie du myocarde plus sévère, indiquant ainsi que $RXR\beta$ est capable d'exercer certaines fonctions dans le développement. Une telle synergie d'action n'a par contre pas été observée pour $RXR\beta$ ou $RXR\gamma$ avec les différents RARs ([Wendling et al., 1999](#); [Kastner et al., 1997](#)).

Ces données étayent fortement la conclusion que les hétérodimères RARs/RXR sont les principales unités fonctionnelles de la voie de signalisation de l'AR au cours du

développement embryonnaire de la souris. De plus, étant donné que les mutants composites $RXR\gamma^{-/-}/RXR\beta^{-/-}/RXR\alpha^{+/-}$ sont viables, la présence d'un seul allèle $RXR\alpha$ est suffisante pour assumer la plupart des fonctions nécessaires au développement. La présence de tous les RARs est cependant requise pour permettre la formation d'une trachée normale ainsi que, par la suite, pour permettre le développement avancé du poumon. La présence de $RAR\gamma$ semble quant-à elle être plus importante lors de la formation des alvéoles pulmonaires.

G. RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES ET CANCER DU POUMON

Il a dans un premier temps été découvert que plusieurs lignées de cellules cancéreuses bronchiques portent de larges délétions non aléatoires au niveau du chromosome 3p14-25 ([Kok et al., 1997](#)).

En 1991, [Houle et al.](#) ont alors cartographié le gène $RAR\beta$ en 3p24 et ils ont démontré que l'expression de $RAR\beta$ était diminuée, voire même supprimée, dans les lignées de cellules cancéreuses bronchiques, suggérant ainsi que sa réexpression pourrait conduire à supprimer la malignité de ces cellules.

Cette idée fut renforcée par le fait que la réintroduction du gène $RAR\beta$ dans des cellules cancéreuses pulmonaires chez la souris nude a permis de supprimer leur tumorigénicité, ainsi que par le fait que des souris transgéniques exprimant des ARN antisens $RAR\beta$ ont développé des tumeurs pulmonaires ([Bérard et al., 1996](#)).

Cependant, dans les tumeurs bronchiques primaires, bien que l'expression de $RAR\beta$ soit diminuée de façon significative, aucune mutation affectant le gène $RAR\beta$ lui-même n'a été trouvée ([Qiu et al., 1999](#)). Par conséquent, les mécanismes impliqués dans cette sous-régulation de $RAR\beta$ restent encore mal compris.

En 1997, [Xu et al.](#) ont analysé des pièces opératoires provenant de patients atteints de CBNPCs par hybridation *in situ* (HIS) et ils ont rapporté, qu'en plus de RAR β , les ARNm RAR γ et RXR β étaient également diminués dans respectivement 28% et 24% de leurs échantillons.

En 1999, [Picard et al.](#) ont réalisé une analyse détaillée des RARs et des RXRs dans les CBNPCs. Ils ont évalué les expressions relatives des protéines RAR α , RAR β , RXR α et RXR β par immuno-histochimie (IHC) et ont corrélé les résultats obtenus par des mesures d'expression ARNm par qRT-PCR et par hybridation *in situ* (HIS). Des surexpressions de RAR α et RXR α ont été observées dans respectivement 26% et 85% des tumeurs. En revanche, une diminution d'expression importante de RAR β a été observée dans 63% des tumeurs avec une diminution concomitante de l'expression de RXR β dans 1/3 des cas. La diminution d'expression de RAR γ n'a été observée qu'au niveau de son ARNm dans 41% des tumeurs. Par ailleurs, une perte d'hétérozygotie (LOH) au niveau du chromosome 3p24, à proximité du locus RAR β , a également été observée dans la moitié des échantillons informatifs.

En utilisant une méthode de PCR spécifique pour la méthylation, précédemment décrite en 1998 par [Coté et al.](#), sur les mêmes échantillons de tumeurs bronchiques, la diminution de RAR β précédemment observée a été associée de façon significative, dans 75% des cas, à une hyperméthylation d'ilôts CpG, normalement non méthylés, situés au niveau de la région promotrice P2-RAR β . De même, une étude plus récente a également montré que l'hyperméthylation du promoteur P2-RAR β pourrait être l'un des mécanismes inhibant l'expression de RAR β dans les CBPCs (72%) et dans les CBNPCs (41%) ([Virmani et al., 2000](#)).

H. RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES ET LÉSIONS PRÉCURSEURS DE L'ÉPITHÉLIUM BRONCHIQUE

La séquence d'événements initiant le développement d'un carcinome squameux au niveau des voies aériennes est de telle sorte que les carcinogènes, comme ceux contenus dans la fumée du tabac, sont à l'origine d'une série de changements morphologiques et génétiques de l'épithélium bronchique conduisant en fin de processus à un carcinome *in situ* ([Klein et al., 1993](#)). Ces changements induisent la formation d'une hyperplasie des cellules basales ainsi qu'une métaplasie squameuse ; ces événements semblent être réversibles. Ils sont suivis de différents degrés de dysplasies, pour finalement se transformer en un carcinome *in situ* ([Figures 21](#) et [22](#)). La sous-expression fréquente et marquée de plusieurs RARs/RXRs observée dans les carcinomes invasifs a suggéré d'établir les statuts d'expression de ces récepteurs dans les lésions précurseurs de l'épithélium bronchique.

Dans ce but, [Martinet et al.](#) ont en 2000 analysé des lésions précurseurs bronchiques de différents grades ainsi que des épithéliums bronchiques normaux provenant de fumeurs et de non fumeurs dans des essais de PCR basés sur la fluorescence et permettant de réaliser un allélotypage des différents loci de RARs et de RXRs. Des changements fréquents au niveau des régions microsatellites (LOHs) ont été observés. Cependant, aucun changement commun entre les différents types de lésions, et aucun changement spécifique d'un degré de préneoplasie donné, n'a été observé. Les changements observés sont apparus corrélés uniquement avec l'exposition au tabac et ils ont surtout affecté la région proche de RAR γ , une région sujette à des dommages de l'ADN car elle contient un site fragile.

La quantité de LOHs situées à proximité de RAR β est quant-à elle apparue proportionnelle au grade de la lésion (de 0% dans l'épithélium bronchique des non-fumeurs à 22% dans l'épithélium bronchique des fumeurs, 35% dans les lésions précurseurs et 60% dans les tumeurs appariées), avec une diminution concomitante de l'expression protéique de RAR β

et une augmentation de l'immuno-réactivité de p53 ([Martinet et al., 2000](#)). Ces résultats sont apparus similaires à ceux précédemment rapportés par [Xu et al.](#) en 1994 concernant les lésions précurseurs observées dans les cancers oraux. En utilisant l'HIS, la perte d'expression de RAR β a été retrouvée dans 60% des échantillons. Les pertes d'expression ont été corrélées au degré de la lésion alors que les expressions des autres récepteurs n'ont pas été trouvées substantiellement altérées.

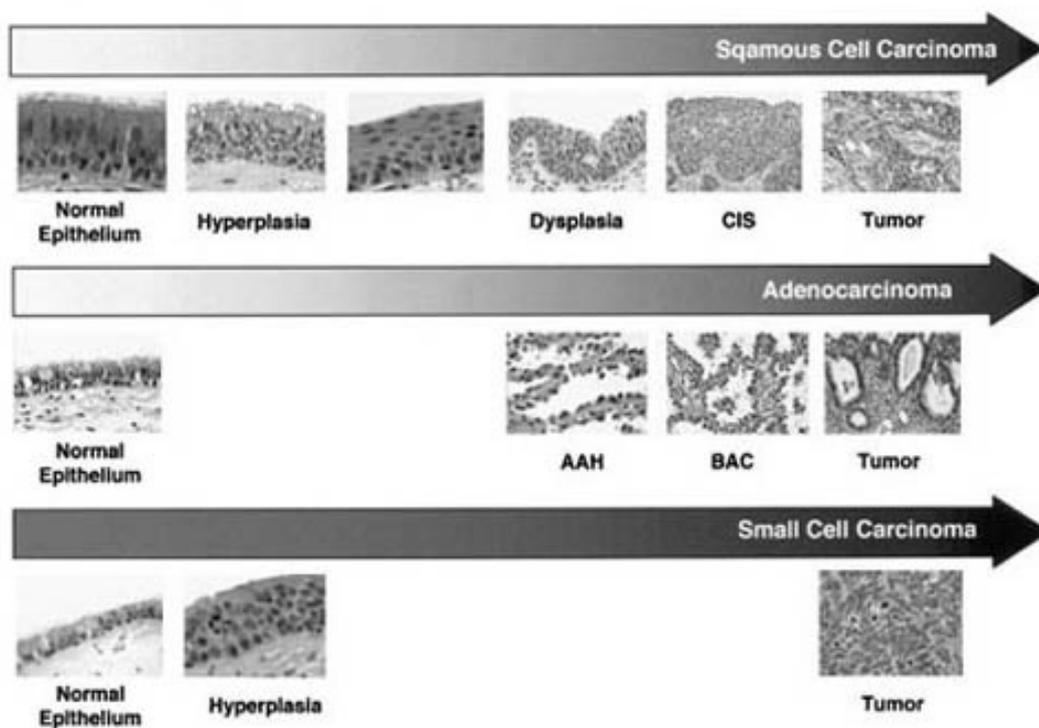


Figure 21. Histopathologie des différents types de cancers bronchiques.

(Source : http://www.nccs.com.sg/pbication/CU/vol2_03/images/Mechanism.jpg)

AAH : Hyperplasie Adénomateuse Atypique

BAC : Carcinome Broncho-Alvéolaire

CIS : Carcinome *In Situ*

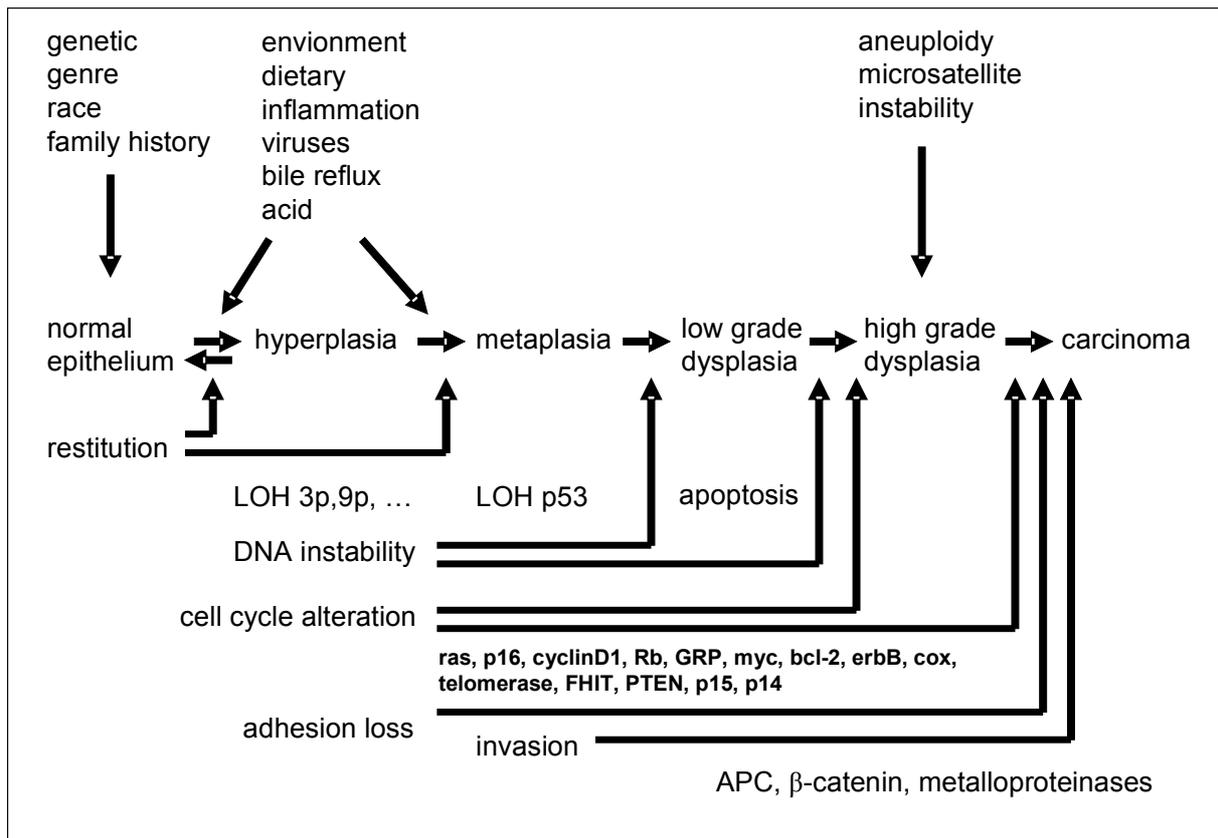


Figure 22. Pathogénèse moléculaire des cancers bronchiques.

(Source : http://www.rcsed.ac.uk/journal/vol45_4/4540034.gif)

I. RÉTINOÏDES ET CHIMIOPRÉVENTION DES CANCERS BRONCHIQUES

À partir de modèles animaux de cancers épithéliaux, les composés Vit.A/rétinoïdes ont été montrés capables de supprimer le phénotype malin induit par les carcinogènes chimiques ou physiques et ils sont aussi apparus plus efficaces au cours des phases tardives de la promotion tumorale ([Ponnamparuma et al., 2000](#)). Cependant, des résultats contradictoires ont aussi été rapportés chez des individus à risque et ils ont été attribués à des variations dans les niveaux de base en rétinol. Chez les fumeurs, bien qu'une réexpression de l'ARNm RARβ ait été observée dans la muqueuse bronchique après l'apport de 13-cis AR, il n'a pas été observé de régression des métaplasies squameuses ([Lotan et al., 1995](#)). De plus, les différents

essais de chimioprévention des maladies liées au tabac utilisant la Vit.A/rétinoïdes ont jusqu'ici donné des résultats très décevants et d'un point de vue éthique, il apparaît impossible de continuer de telles interventions de prévention utilisant ces composés.

Les raisons de ces échecs ne sont pas évidentes. Le niveau d'AR est contrôlé de façon exquise par la cellule. Il est possible qu'un ajustement des doses administrées soit plus facile à réalisé par inhalation, comme démontré récemment chez des rongeurs, par l'inhalation de 13-cis AR, qui a permis d'augmenter l'expression des RARs dans leurs poumons mais pas dans leur foie ([Wang et al., 2000](#)). De façon similaire, l'administration locale de β -carotène a permis de prévenir la formation de carcinomes chez la souris dans des modèles à deux étapes de carcinomes de peau ([Ponnampereuma et al., 2000](#)). Ces 2 études suggèrent que le catabolisme systémique de l'AR, aussi bien que celui du β -carotène, pourraient générer des métabolites toxiques, comme il a été suggéré dans le cas des métabolites caroténoïdes suspectés d'être hautement oxydants chez le fumeur.

Pendant les premières étapes de formation des CBPCs, une sous-régulation commune de RAR β , RXR β et RXR γ semble induire une carence réelle et fonctionnelle en AR, qui se traduit dans un premier temps par la formation d'une métaplasie squameuse. L'événement initiateur affectant l'expression de ces gènes reste cependant inconnu. Il pourrait s'agir de défauts au niveau de la chromatine (pertes d'allèles, hyperméthylation de promoteurs) ou encore de l'intervention de molécules d'ARN interférents (miARNs) responsables de la dégradation des ARNm de ces récepteurs. À des stades de cancérisation plus avancés, les tumeurs présentent presque les mêmes sous-régulations de RR. De plus, la sous-régulation de RAR β n'est pas spécifique au cancer du poumon, elle est en effet aussi fréquente dans les cancers du colon et du sein. Ceci souligne le rôle important de la voie de signalisation Vit.A/rétinoïdes dans tous les tissus de l'organisme.

Les dommages de l'ADN sont induits par les carcinogènes contenus dans la fumée du tabac. Les caractéristiques génétiques intrinsèques de chaque individu conditionnent l'action des carcinogènes ainsi que les réparations de l'ADN. Des cellules souches contenues dans l'épithélium bronchique pourraient être affectées par ces dommages. En fonction de leur stade de maturation, ces cellules pourraient alors se transformer pour donner naissance à des CBCSq, des ADCs ou même à des CBPCs.

Plusieurs autres mécanismes pourraient expliquer la sous-régulation observée pour les RRs : une sur-dégradation par les protéasomes ([Bastien *et al.*, 2004](#)), mais aussi un déficit en ligand, ce qui n'a pas encore été exploré en détail. Un inventaire complet de la machinerie enzymatique conduisant à la synthèse des rétinoïdes dans le poumon serait utile à cet égard. Des formes anormales de RRs pourraient être délétères en séquestrant du ligand ou en occupant de façon inappropriée les RAREs situés dans les promoteurs de certains gènes cibles. Des aérosols locorégionaux utilisant les rétinoïdes, des agonistes sélectifs de RRs, des agents déméthylants ou des inhibiteurs de l'acétylation des histones pourraient être utilisés de façon synergique pour une meilleure prévention des cancers bronchiques. Il apparaît néanmoins en premier lieu nécessaire de mieux comprendre comment fonctionne le signal Vit.A/rétinoïdes.

J. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Des altérations de l'expression des différents RRs ont été observées dans plusieurs types de cancers. Le gène $RAR\alpha$ est impliqué dans les PML et son expression est également inhibée par modifications épigénétiques dans les lignées cellulaires de cancer du sein (hyperméthylation de sa région promotrice). L'expression de $RAR\beta$ a également été montrée diminuée, voire inhibée, non par mutation ou délétion, mais plutôt par la méthylation instable de sa région promotrice dans les cancers à cellules squameuses ainsi que dans les tumeurs du poumon, du sein, de l'estomac et de la prostate. Le champ d'expression de $RAR\gamma$ est plus restreint, mais il a été montré comme impliqué dans la régulation de la croissance de certaines tumeurs. Des sous-expressions des gènes RXRs ont aussi été observées, principalement dans les cancers à cellules squameuses, ainsi que dans les cancers de la prostate et de la thyroïde.

Le gène $RAR\beta$ a principalement été étudié dans le cas du cancer du poumon. La prévention primaire de cette maladie grave par l'éradication du tabac reste une priorité absolue. Cependant, compte tenu de la médiocrité des résultats obtenus avec les traitements actuels, il semble important de pouvoir offrir aux sujets à risque une possibilité de recourir à une chimioprévention secondaire. Les rétinoïdes ont été utilisés à cette fin dans des essais cliniques à grande échelle mais les effets obtenus ont été décevants, voire contradictoires, pour des raisons qui restent encore inexplicables. Ceci souligne le besoin d'accroître les connaissances sur les mécanismes moléculaires participant à la transduction du signal rétinoïde dans les cellules bronchiques.

Dans ce contexte, nous avons dans un premier temps récapitulé les informations disponibles sur $RAR\beta$ dans les banques de données génomiques afin de reconstituer *in silico* l'organisation de sa région chromosomique étendue. Tous les transcrits inclus dans cette zone ont été répertoriés et indexés, puis des amorces spécifiques de qRT-PCR ont été dessinées afin de déterminer la présence de ces transcrits dans un large panel d'échantillons. Les séquences

situées en amont de différents transcrits non validés inclus dans la zone ont été étudiées *in silico* afin de caractériser une potentielle région promotrice RAR β additionnelle. L'activité d'une telle région P1'-RAR β a par la suite été étudiée *in vitro*.

Des valeurs de référence ont été établies par qRT-PCR pour les expressions des différents ARNm RRs dans les cellules bronchiques normales différenciées. Les niveaux d'expression relatifs de ces ARNm RRs ont ensuite été quantifiés dans différents types de lignées cellulaires modèles de cancers bronchiques ainsi que dans plusieurs échantillons de tumeurs bronchiques épidermoïdes à cellules squameuses. Les résultats obtenus dans les essais de qRT-PCR Syber Green ont été comparés à ceux obtenus en utilisant un modèle triplex de sondes Taqman reconnaissant 3 RRs (RAR α , RAR β et RXR β) dans une seule réaction de qRT-PCR et conçu afin d'économiser les échantillons d'ARN rares et précieux stockés dans les banques de tissus. Une fois validé par ces comparaisons, cet outil a été utilisé afin de procéder à l'analyse des échantillons de tumeurs bronchiques.

Finalement, au vu des résultats conflictuels obtenus précédemment avec les anticorps commerciaux RAR β , un nouvel anticorps a été dessiné de façon à reconnaître toutes les isoformes RAR β décrites dans les banques de séquences protéiques. Cet outil a par la suite été validé expérimentalement dans des expériences de western-blot et d'immunoprécipitation utilisant des extraits nucléaires de cellules bronchiques normales et de cellules BEAS-2B.

Un traitement rigoureux des échantillons ainsi qu'une analyse bioinformatique exhaustive sont les points clés de cette étude. Celle-ci a permis, d'une part, de définir des valeurs de référence pour l'expression des RRs dans les cellules bronchiques (en particulier pour RAR β) et, d'autre part, de procéder à la validation de nouveaux outils moléculaires qui sont désormais disponibles pour faire progresser nos connaissances sur les mécanismes fondamentaux participant au signal rétinoloïde dans les cellules bronchiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. ORIGINE DES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES ET CULTURE CELLULAIRE

Les échantillons analysés dans cette étude proviennent du Centre de Ressources Biologiques (CRB) du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, une banque de tissus certifiée ISO 9001-2000, sous la direction du Dr. Nadine Martinet et du Pr. Jean-Michel Vignaud ([Vlastos *et al.*, 2009](#)).

1. ÉCHANTILLONS DE TUMEURS BRONCHIQUES

Douze échantillons de tumeurs bronchiques épidermoïdes à cellules squameuses (CBCSq) ont été prélevés chez différents patients et disséqués sous microscope par l'anatomopathologiste, Jean-Michel Vignaud. Pour chaque échantillon prélevé, des coupes congelées de 10 µm de section ont été réalisées au cryostat à -30°C.

Afin d'obtenir des échantillons contenant au moins 90% de cellules tumorales, un premier examen extemporané a été réalisé, dans chaque cas, par coloration d'une coupe de l'échantillon par la méthode Hématoxyline-Éosine-Safran (HES). Chaque coupe congelée a dans un premier temps été déposée et collée sur une lame de verre placée à température ambiante. Les lames ont alors été fixées pendant 1 min dans un bain d'éthanol absolu (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier) puis rincées à l'eau.

La coloration des échantillons a ensuite été réalisée par passages successifs des lames dans une solution d'hématoxyline (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier) pendant 1 min (ce colorant cationique crée des liens chimiques avec les acides nucléiques présents dans le noyau des cellules, la couleur bleue se diffuse alors dans toutes les structures nucléaires par un phénomène d'absorption), puis dans une solution d'éosine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier) pendant 30 s (ce colorant acide forme des liens avec les structures basiques du cytoplasme, la coloration orangé diffuse dans le tissu par absorption). Un rinçage à l'eau a été

réalisé après chaque bain dans une solution colorée. Les coupes ont finalement été déshydratées par un bain d'1 min dans l'éthanol absolu et fixées pendant 1 min dans un bain de toluène (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier).

Les coupes ainsi préparées ont ensuite été montées entre lame et lamelle afin d'être vérifiées au microscope (Nikon Diaphot). Les zones contenant du tissu bronchique normal contaminant ont alors été éliminées de chaque échantillon à l'aide d'une aiguille de 0,6 mm de diamètre (23 Gauge), puis des coupes congelées de 10 µm de section ont été débitées au cryostat.

Pour chaque échantillon, une vingtaine de coupes ont été regroupées dans un tube Falcon de 15 mL en présence du réactif Trizol (Invitrogen, Cergy-Pontoise), à raison d'1 mL de réactif pour 50 à 100 mg de tissu, permettant ainsi de conserver les échantillons au congélateur à -20°C jusqu'à la purification de l'ARN total (ARNt).

2. ÉCHANTILLONS DE TRACHÉES HUMAINES NORMALES

Les échantillons de trachées humaines utilisés dans cette étude ont été prélevés chez des donneurs victimes de ruptures d'anévrismes fatales, d'accidents de la circulation, ou ayant succombés à des suicides. Tous les sujets ont été maintenus sous respiration artificielle jusqu'à ce que les échantillons soient prélevés par l'anatomopathologiste après examen macroscopique du matériel chirurgical.

Les échantillons de trachées recueillis ont immédiatement été plongés dans du milieu RPMI-1640 complété à 10% v/v par du Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier), 2 mM de L-glutamine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier), 50 unités/mL de pénicilline, 50 µg/mL de stréptomycine et 5 µg/mL de fungizone (Gibco BRL Life Technologies, Cergy-Pontoise).

Dix échantillons de trachées humaines ont ainsi été collectés et transportés immédiatement à la Faculté de Médecine de Nancy afin d'y être disséqués, par

le Dr. Nadine Martinet, en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire, dans les Postes de Sécurité Microbiologique (PSM) de type IIA, situés dans le laboratoire L2 équipant l'unité de recherche INSERM U724 (cadre légal du don multi-organe).

3. CELLULES ÉPITHÉLIALES BRONCHIQUES HUMAINES DIFFÉRENCIÉES

Après ouverture des trachées au scalpel, leurs parties internes ont d'abord été abondamment rincées avec du milieu complet RPMI. Les couches cellulaires superficielles des parties trachéales internes ont alors été grattées à l'aide de la partie non tranchante de la lame du scalpel. Ceci, afin d'en isoler les « Cellules Épithéliales Bronchiques Humaines Différenciées » ou CEBHD : l'échantillon *in vivo* de référence utilisé dans cette étude. Un premier examen histologique des échantillons recueillis a permis de démontrer qu'ils contenaient majoritairement des cellules bronchiques différenciées (cellules bronchiques ciliées).

Les différents échantillons de CEBHD ainsi obtenus ont été regroupés dans un tube Falcon de 15 mL contenant 10 mL de milieu complet RPMI-1640. Après centrifugation pendant 5 min à 1500 rpm le milieu de culture a été retiré et le culot de CEBHD resuspendu dans 3 mL de milieu RPMI. Le nombre de cellules viables a alors été estimé sous microscope inversé (Nikon Diaphot), à l'aide d'un hématimètre de Thomas, en diluant 10 µL de suspension cellulaire dans 10 µL d'une solution aqueuse (0,1X) de bleu Trypan (Gibco BRL Life Technologies, Cergy-Pontoise). La concentration cellulaire a ensuite été ajustée entre 5.10^6 et 1.10^7 cellules/mL par resuspension du culot de CEBHD dans du Trizol, permettant ainsi de conserver les cellules au congélateur à -20°C jusqu'à la purification de l'ARNt.

4. CELLULES ÉPITHÉLIALES BRONCHIQUES HUMAINES NON DIFFÉRENCIÉES

Afin de procéder à des cultures *in vitro* de « Cellules Épithéliales Bronchiques Humaines Non Différenciées » ou CEBHND, chaque échantillon de muqueuse précédemment gratté a été isolé des bronches par dissection et découpé au scalpel en petits fragments. Les faces postérieures des explants ainsi préparés ont d'abord été essuyées en conditions stériles à l'aide de compresses, puis ils ont été déposés dans des plaques à 6 puits (Nunc, Polylabo, Strasbourg) dont le fond avait préalablement été rayé avec l'extrémité pointue d'une lame de scalpel afin de provoquer l'adhésion de l'explant à la boîte de culture.

Les explants ont été cultivés dans 2 mL de milieu LH-9 (Cambrex Bio Sciences, Émerainville). Les plaques de culture ont ensuite été placées à l'étuve pendant une semaine à 37°C, sous atmosphère humide à 96% contenant 5% de CO₂, avec renouvellement régulier du milieu LH-9 tous les 2 jours. Après une semaine de culture, chaque explant a été décroché du fond de son puits et remis en culture dans une nouvelle plaque, cette manipulation a été répétée à deux reprises.

À confluence, les CEBHND ont été détachées du fond de chaque puits de culture à l'aide d'un grattoir stérile. Les CEBHND ainsi récupérées ont ensuite été mélangées, prises en charge et conservées de la même façon que les CEBHD. L'examen histologique de ces cellules a révélé la présence majoritaire de cellules basales bronchiques non différenciées (cellules non ciliées).

5. CELLULES MUSCULAIRES LISSES

Les échantillons de feuillets musculaires lisses situés à l'avant des trachées ont été isolés par dissection. Des coupes congelées de 2 µm de ces feuillets musculaires ont été réalisées au cryostat afin d'en isoler les Cellules Musculaires Lisses (CML). Les différentes coupes congelées obtenues ont été regroupées dans un tube Falcon de 15 mL en présence de Trizol (1 mL pour 50 à 100 mg de tissu) et conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

6. CELLULES DE L'ÉPIDERME

Les échantillons de peau utilisés dans cette étude ont été recueillis chez trois patientes ayant subi une liporéduction. Des coupes congelées de ces échantillons ont été réalisées par sections de 2 µm, parallèles à la membrane basale. L'examen histologique extemporané de chaque 3^{ème} section a permis de vérifier que les échantillons ainsi collectés se limitaient à la partie haute de l'épiderme. Les échantillons d'épiderme ainsi recueillis ont été pris en charge de la même façon que les échantillons de CML.

7. LIGNÉES CELLULAIRES

Toutes les manipulations de culture cellulaire ont été effectuées en conditions stériles, sous flux laminaire, dans les PSM de type IIA situés dans le laboratoire L2 équipant l'unité de recherche INSERM U724.

La lignée cellulaire BEAS-2B [CRL-9609] (cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées par transformation virale : hybride adénovirus 12/virus SV-40), ainsi que les lignées humaines de mésothéliome pleural : NCI-H513, de cancer bronchique à petites cellules : NCI-H69 [HTB-119], de cancers bronchiques non à petites cellules : NCI-H1648 [CRL-5882], NCI-H2087 [CRL-5922] et NCI-H2342 [CRL-5941], et les lignées d'adénocarcinomes pulmonaires : A549 [CCL-185] et mammaire : MDA-MB-231 [HTB-26], ont toutes été commandées auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, États-Unis).

Les cryotubes contenant les cellules, précédemment stockés dans un tank d'azote liquide, ont dans un premier temps été décongelés rapidement par friction entre les mains. Après stérilisation externe des tubes à l'éthanol 70% v/v, les cellules ont été diluées dans un petit volume de milieu complet RPMI-1640, puis agitées délicatement à la pipette. Les différentes suspensions cellulaires ont alors été transférées dans des tubes Falcon de 15 mL contenant chacun 10 mL de milieu complet RPMI, centrifugées 5 min à 1500 rpm, puis les culots cellulaires obtenus ont été resuspendus dans 5 mL de milieu frais pour la culture.

Ces lignées de cellules adhérentes ont été cultivées dans des flacons de 75 cm² (Nunc EasY Flask, Polylabo, Strasbourg) dans du milieu RPMI-1640 supplémenté par 10% de SVF, 2 mM de L-glutamine et par 0,5% d'un mélange d'antibiotiques : pénicilline (100 U/mL) / streptomycine (100 µg/mL) (Gibco BRL Life Technologies, Cergy-Pontoise). Les flacons ont été déposés dans un incubateur, à 37°C et dans un mélange d'air et de 5% de CO₂ saturé en vapeur d'eau afin de permettre une croissance cellulaire rapide.

Arrivées à confluence, les cellules ont été débarrassées de leur milieu de culture puis recouvertes de Trizol (1 mL pour 5.10⁶ à 1.10⁷ cellules). Elles ont ensuite été détachées du support de culture à l'aide d'un grattoir stérile et conservées à -20°C avant de procéder à la purification de leurs ARNt.

B. ANALYSE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DES RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES

1. EXTRACTION D'ARN TOTAL

1.1. Principes

Les ARNt sont extraits à l'aide du réactif Trizol. Ce réactif prêt à l'emploi est utilisé pour l'extraction de l'ARN et, éventuellement, à partir du même échantillon, de l'ADN et des protéines issus de cellules en culture ou de tissus. Il s'agit de dissoudre dans cette solution monophasique de phénol acide et d'isothiocyanate de guanidine tous les constituants cellulaires puis de les précipiter de façon différentielle dans des solvants organiques. L'ARNt, qui est soluble dans l'eau est ainsi séparé des autres constituants. Il est ensuite précipité dans l'alcool isopropylique (propan-2-ol). Toutes les manipulations sont effectuées sur glace afin de protéger les ARNt d'une éventuelle dégradation.

1.2. Méthode

Les tampons et solutions utilisés pour l'extraction des ARNt sont les suivants :

-Eau DEPC : eau déionisée additionnée de 0,1% DiÉthylPyroCarbonate (DEPC), agitée une nuit sous hotte à toxiques puis autoclavée 1 h à 120°C, aliquotée en tubes de 2 mL et conservée à -20°C avant utilisation.

-Tampon d'échantillon : Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 1% p/v, Bleu de Bromophénol 0,1% v/v, 0,1M Acide Éthylène-Diamine-Tétraacétique (EDTA) pH=8, 50% Glycérol v/v.

-Tampon TAE 50X (pH=8,5) : Tris-base 242 g (0,04M), acide acétique glacial 57,1 mL, EDTA disodique 37,2 g (0,001M), H₂O qsp 1000 mL.

Les différents échantillons cellulaires décrits précédemment ont été décongelés sur glace puis resuspendus dans le Trizol par pipetages itératifs. Afin de procéder à la lyse totale des cellules, les différents échantillons conservés sous formes de coupes congelées ont dans

un premier temps été dissous par passages successifs au travers d'une aiguille de 0,6 mm de diamètre (23 Gauge) montée sur une seringue de 10 mL. Les solutions obtenues ont ensuite été transférées dans des tubes de 2 mL puis laissées à température ambiante pendant 5 min.

0,2 mL de chloroforme (Carlo Erba Réactifs, Val de Reuil) pour 1mL de Trizol a alors été ajouté à chaque solution, les mélanges agités quelques s puis centrifugés à 12000 rpm pendant 15 min à 4°C afin d'isoler les ARNt. La phase aqueuse supérieure incolore ainsi obtenue pour chaque échantillon contient l'ARNt, alors que la phase organique inférieure rouge contient l'ADN et les protéines.

Les différentes phases aqueuses ont été récupérées dans des tubes propres, placés sur glace, puis, 0,5 mL d'alcool isopropylique (propan-2-ol) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier) par volume de Trizol a été ajouté dans chaque tube. Les mélanges ont été homogénéisés doucement par inversion/retournement des tubes et laissés pendant 20 min à température ambiante.

Afin de précipiter l'ARNt, les tubes ont ensuite été centrifugés à 12000 rpm pendant 20 min à 4°C. Les surnageants ont été éliminés et les culots d'ARNt obtenus ont été lavés à deux reprises dans 500 µL d'une solution aqueuse d'éthanol à 75% v/v (Carlo Erba Réactifs, Val de Reuil) par centrifugation à 7500 rpm pendant 5 min. L'excès d'éthanol a été éliminé puis les tubes ont été placés sur glace et sous une Sorbonne afin de sécher les culots à l'air en évaporant l'éthanol résiduel.

Une fois les culots secs, les ARNt ont été remis en suspension dans 10 µL d'eau DEPC avant d'être dosés au spectrophotomètre (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq) par mesure de la Densité Optique (DO) d'une dilution au 1/50^{ème} de chaque ARNt extrait (1 µL de solution d'ARNt et 49 µL d'eau DEPC). Pour quantifier l'ARNt, la relation suivante est utilisée : 1 unité de DO_{260nm} mesurée représente 40 µg d'ARNt. Le calcul du rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} permet quant à lui d'apprécier la contamination protéique; il doit être

compris entre 1,6 et 2 pour valider la pureté de l'échantillon. La DO_{230nm} permet, quant-à elle, d'apprécier la contamination en sels de l'échantillon.

Afin de vérifier rapidement l'intégrité des ARNt extraits, 1 μ L de chaque solution d'ARNt obtenue a été mélangé à 3 μ L d'EDFA et 1 μ L de tampon d'échantillon avant de déposer les mélanges dans les puits d'un gel d'agarose à 0,8% p/v (0,4 g d'agarose (Q-Biogène, Illkirch), 50 mL de tampon TAE 1X et 1 μ L d'une solution aqueuse de Bromure d'Éthidium (BET) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier) à 5 mg/mL). Le BET est un agent intercalant permettant de mettre en évidence les acides nucléiques lorsqu'ils sont excités sous lumière UV. L'électrophorèse a été effectuée pendant 45 min sous 80 V et 210 mA. Les ARNt ont alors été visualisés par irradiation du gel aux UV sur une table d'illumination (TFL-20M, Appligene-Oncor, Illkirch). Une photographie de chaque gel a été réalisée à l'aide d'un appareil numérique (CyberShot, Sony).

Les ARNt de qualité présentent deux renflements principaux qui correspondent respectivement aux ARNs ribosomaux (ARNr) 28s et 18s. Le premier renflement doit avoir une intensité double par rapport au second pour valider la qualité de l'ARNt extrait. Dans le cas d'un ARN non dégradé, les ARNs messagers (ARNm) apparaissent sous forme d'un léger étalement lumineux (smear) situé entre les deux bandes d'ARNr.

Après le dosage et le contrôle de la qualité des ARNt extraits, leurs concentrations finales ont été ajustées à environ 0,125 ng/ μ L dans de l'eau DEPC. Ceci afin d'aliquoter les ARNt en tubes de 0,2 mL, à raison de 8 μ L par tube (soit au minimum 1 μ g d'ARNt). 1 μ L d'une solution d'inhibiteur de ribonucléases porcine (RNAguard Rnase Inhibitor, GE Healthcare, Velizy) a été ajouté à chaque aliquot préparé afin de protéger les ARNs d'une éventuelle dégradation enzymatique. Les différents tubes ont alors été stockés au congélateur à -80°C avant de procéder à la rétrotranscription des ARNs extraits en ADN complémentaires (ADNc).

2. TRANSCRIPTION INVERSE DE L'ARN

2.1. Principes

La réaction de rétrotranscription de l'ARN (RT) est basée sur le fait qu'une enzyme, la Reverse Transcriptase, est capable de recopier un brin d'ARNm matriciel en un brin d'ADNc. Des hexamères aléatoires sont utilisés pour l'amorçage de la réaction. Il s'agit d'oligonucléotides de 6 bases consécutives correspondant à l'enchaînement de toutes les combinaisons possibles des 4 bases : Adénine, Thymine, Cytosine et Guanine.

Ces amorces se fixent au hasard sur les ARNm et la Reverse Transcriptase les utilise pour synthétiser l'ADNc. À sa température optimale d'activité (en général à 37°C ou 42°C), l'enzyme rallonge les amorces dans le sens 5'-3' en y incorporant les désoxyriboNucléotides TriPhosphates (dNTPs) présents dans le milieu réactionnel selon la loi de complémentarité des bases.

2.2. Méthode

La RT des ARNm a été réalisée à l'aide du kit First-Strand cDNA Synthesis kit (GE Healthcare, Velizy). Toutes les manipulations ont été effectuées dans des conditions stériles et sur glace afin de protéger les ARNs de la dégradation.

Trois tubes contenant chacun 1 µg d'ARNt suspendu dans un volume total de 8 µL ont été utilisés pour chaque échantillon. Les tubes ont d'abord été chauffés pendant 10 min à 65°C dans un thermocycleur (Crocodile II, Appligen, Illkirch) afin de linéariser les ARNs. Ils ont ensuite été placés sur glace afin de prévenir les repliements structuraux.

Dans chaque tube ont ensuite été ajoutés dans l'ordre :

- 5 µL de Bulk : le tampon réactionnel comprenant une Transcriptase Inverse d'origine virale (M-MuLV Reverse Transcriptase) et le milieu assurant les conditions nécessaires à son activité (conditions de pH, MgCl₂),

- 1 μ L d'une solution de DiThioThréitol (DTT) à 100 mM : un agent réducteur servant de stabilisateur réactionnel,
- 1 μ L d'amorces pd(N)₆ à 0,2 μ g/ μ L en solution aqueuse : les hexamères aléatoires.

Les réactifs ont été mélangés à l'ARN par centrifugation et la réaction de RT a été conduite en plaçant les tubes à 37°C pendant 1 h dans le thermocycleur. À la fin de la réaction, les différents ADNc néosynthétisés ont été dilués en cascade dans de l'EDFA aux dilutions 1/10^{ème}, 1/50^{ème} et 1/100^{ème}.

Afin de s'assurer de la qualité des différentes rétroconversions et avant de procéder à la quantification de l'expression génique des récepteurs aux rétinoïdes, une première expérience de PCR en temps réel est réalisée pour chaque échantillon, utilisant les dilutions ainsi préparées et destinée à mesurer l'expression d'un gène de ménage (housekeeping gene) fortement exprimé dans les cellules : la β -actine.

3. AMPLIFICATION EN CHAÎNE DES ADNc

3.1. Principes

3.1.1. La Réaction de Polymérisation en Chaîne conventionnelle

Le concept technologique de la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR), découvert par Kary Mullis en 1983 et qui lui a valu le prix Nobel de chimie en 1993, est aujourd'hui devenu un outil quasiment universel dans le domaine de la biologie moléculaire. À partir d'une simple copie de séquence d'acides nucléiques, celle-ci peut être spécifiquement amplifiée et détectée. La nature exponentielle de cette technique la rend particulièrement attrayante pour l'analyse quantitative des gènes et de leurs messagers.

L'amplification d'une séquence génomique d'intérêt est réalisée par la répétition cyclique de 3 étapes thermiques à l'aide d'une ADN polymérase thermostable (Taq Polymérase) ([Figure 23](#)).

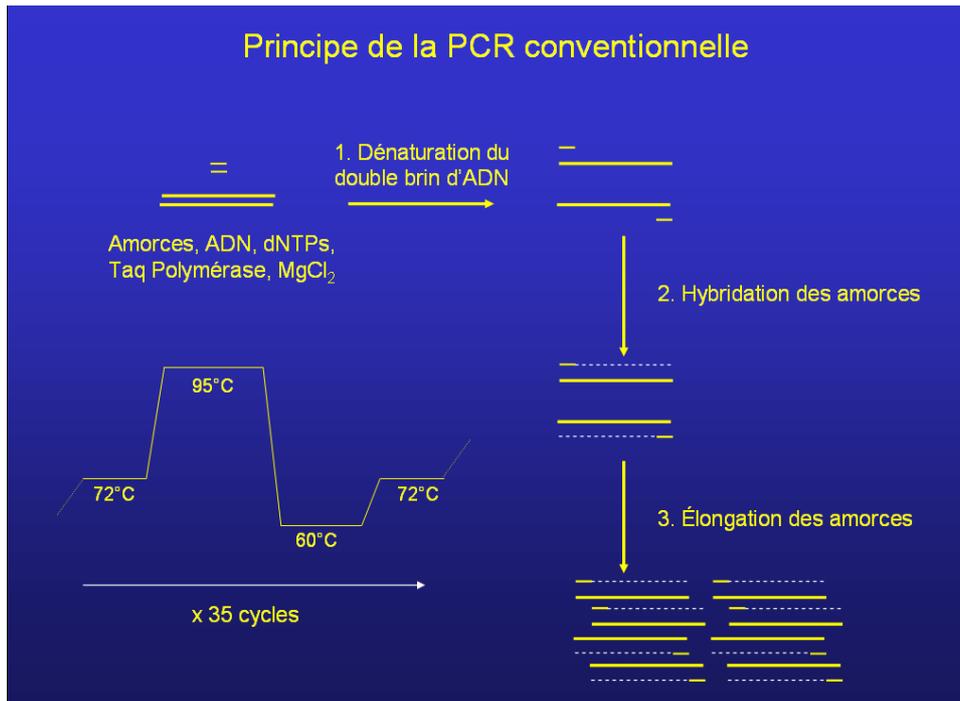


Figure 23. Présentation des différentes étapes thermiques d'une réaction de PCR.
(Source : <http://candimed.alessnet.com/links.php?lim=139&n debut=2&ntype=-1>)

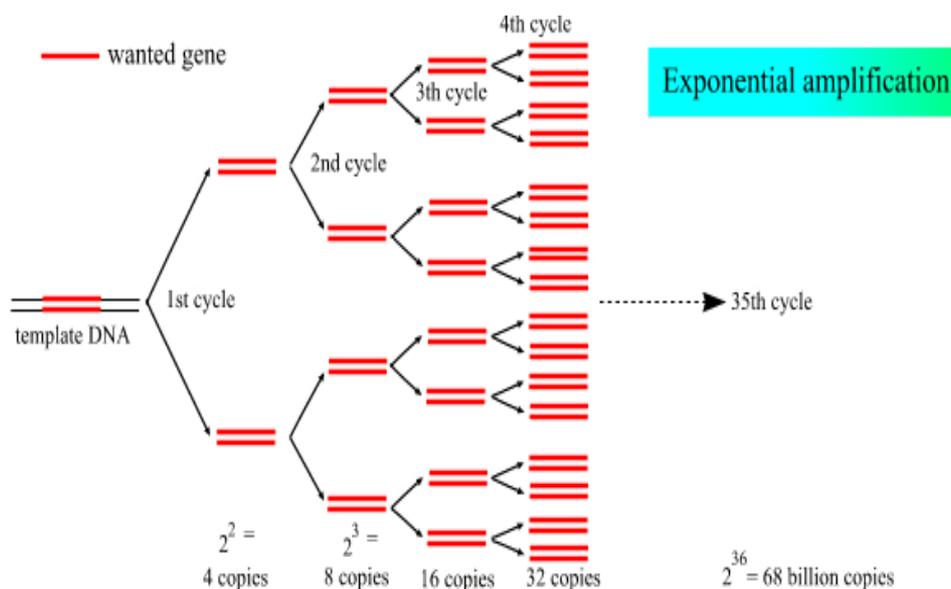


Figure 24. Amplification exponentielle de la séquence cible au cours d'une réaction de PCR.
(Source : <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

Une première étape à 94°C permet la dissociation des deux brins d'ADN matriciel. La seconde étape thermique est réalisée à la température d'appariement (T_a) des amorces encadrant la région génomique à amplifier (amplicon), permettant ainsi la liaison des amorces spécifiques à leurs séquences cibles. La troisième étape du cycle d'amplification est réalisée à la température d'activité de la Taq Polymérase (en général 72°C), qui assure alors l'élongation des amorces dans le sens 5'-3' par incorporation des dNTPs présents dans le milieu réactionnel selon la loi de complémentarité des bases.

La quantité d'amplicons néosynthétisés présents dans le milieu réactionnel augmente ainsi à un taux exponentiel au cours des premiers cycles de la réaction de PCR ([Figure 24](#)). Après la phase d'amplification exponentielle, la réaction de PCR entre dans une phase linéaire ([Figure 25](#)) où le taux d'amplification devient extrêmement variable, même au niveau de replicats d'un même échantillon. Ceci est dû à l'augmentation du nombre d'amplicons présents dans le milieu réactionnel qui a pour effet d'accroître la compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces.

Fait suite à la phase linéaire, une phase plateau (phase de saturation) qui reflète une baisse de l'efficacité d'amplification ([Figure 25](#)). La diminution du nombre d'amplicons synthétisés résulte alors en partie de l'inactivation thermique partielle de la Taq Polymérase au cours des derniers cycles et du fait que les quantités de réactifs nécessaires à l'amplification (dNTPs, amorces) deviennent limitants. D'autres phénomènes sont également impliqués : réhybridation préférentielle de la cible avec elle-même plutôt qu'avec les amorces, activation de l'activité 5'-3' exonucléasique de la Taq Polymérase et accumulation de pyrophosphates, inhibiteurs de l'activité polymérase, résultant de la dénaturation thermique des dNTPs. Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit donc être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification, qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR.

PCR conventionnelle *versus* PCR en temps réel

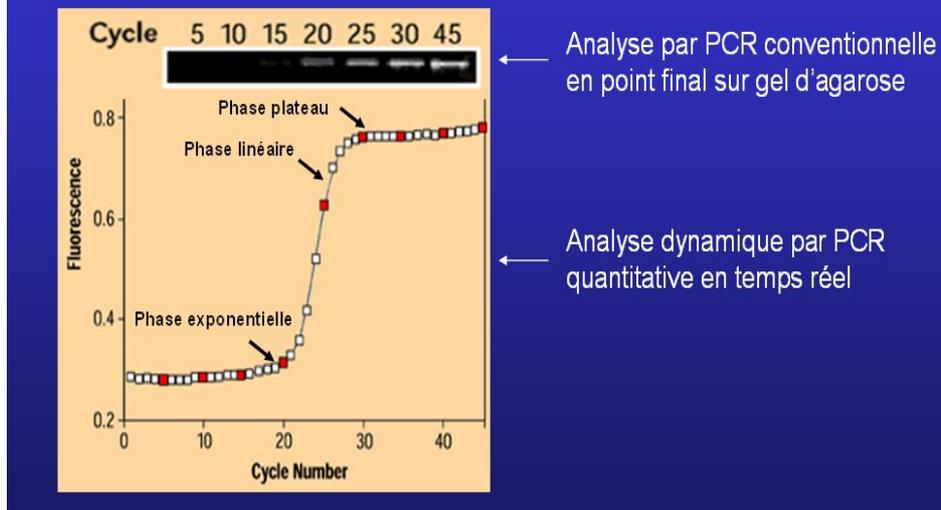


Figure 25. Présentation des différentes phases cinétiques d'une réaction de PCR et comparaison entre PCR conventionnelle et qRT-PCR.

(Source : <http://candimed.alessnet.com/links.php?lim=139&n debut=2&ntype=-1>)

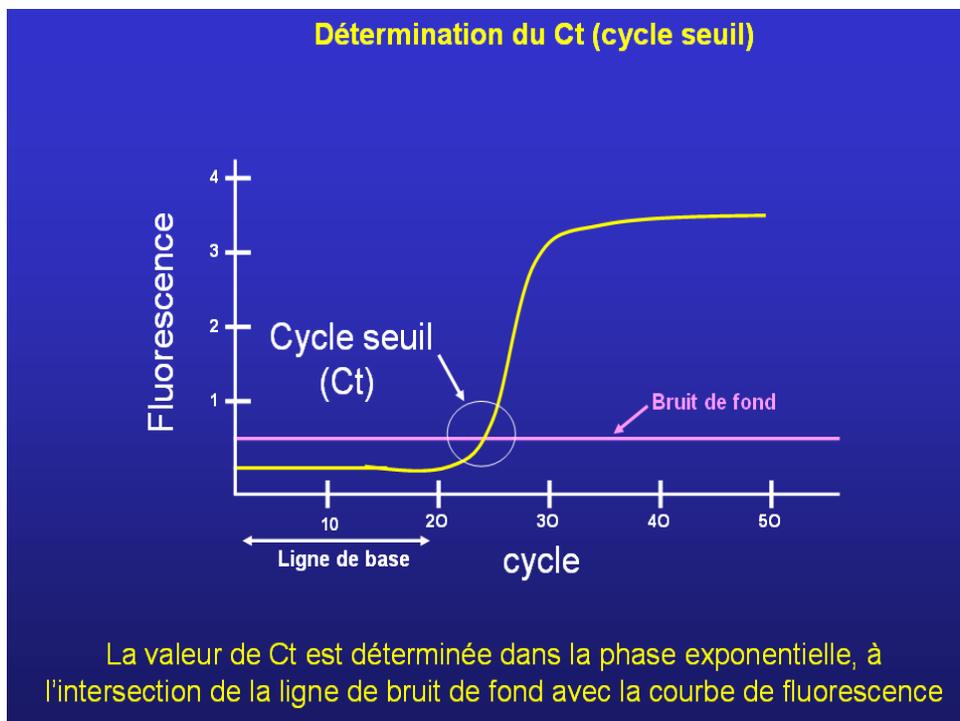


Figure 26. Présentation des principales caractéristiques associées à une courbe d'amplification par qRT-PCR.

(Source : <http://candimed.alessnet.com/links.php?lim=139&n debut=2&ntype=-1>)

3.1.2. La PCR quantitative en temps réel

[R. Higuchi *et al.*](#) furent les premiers à réaliser l'analyse des cinétiques de la réaction de PCR en élaborant un système en « temps réel » qui détectait l'amplicon au fur et à mesure qu'il s'accumulait. La technologie de PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) est basée sur la détection et la quantification du signal émis par un « reporter » fluorescent introduit dans le milieu réactionnel. L'intensité du signal fluorescent mesuré, qui augmente au cours de chaque cycle d'amplification, est ainsi directement proportionnelle à la quantité d'amplicons présents dans le milieu.

Par ce suivi, il est alors possible de tracer une courbe d'amplification, de caractériser les différentes phases de la cinétique de PCR et de mesurer la quantité d'amplicons générés en un point donné de la réaction ([Figure 25](#)), à l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus (PCR en point final).

Au cours des premiers cycles de la réaction de PCR en temps réel, l'intensité de la fluorescence émise est très faible et va permettre de définir la ligne de base (« baseline ») de la courbe d'amplification ([Figure 26](#)). Après un certain nombre de cycles, l'accumulation des amplicons entraîne une variation mesurable de l'intensité de la fluorescence émise. Le point de départ de la phase exponentielle d'amplification, phase au cours de laquelle l'efficacité d'amplification est supposée rester constante, est appelé cycle seuil optique. Plus précisément, il représente le nombre de cycles de PCR nécessaires avant que l'intensité de la fluorescence émise par le reporter ne dépasse une valeur seuil (ou seuil de détection optique) significativement différente du bruit de fond (« background »).

Selon l'algorithme utilisé pour son calcul, le cycle seuil optique est symbolisé par les lettres Ct (« threshold cycle ») ou Cp (« crossing point »). C'est un point remarquable de la cinétique d'amplification car c'est celui qui permet de calculer le nombre de molécules d'acide nucléique cible initialement présentes dans le milieu réactionnel avant l'amplification.

Le concept technologique de la qRT-PCR a rapidement évolué au cours de ces dernières années permettant ainsi de simplifier la quantification du nombre de molécules ou de copies d'un gène ou d'un messager d'intérêt dans un échantillon donné. Les performances de cette technique peuvent se résumer en quatre mots : spécificité, sensibilité, reproductibilité et linéarité sur une gamme dynamique comprise entre 10 et 10⁸ copies.

Il faut y ajouter la rapidité de la technique qui ne nécessite aucune étape d'analyse post-PCR. La méthode est donc automatisable, et par conséquent parfaitement adaptée à une analyse en routine. Par ailleurs, la réaction s'effectuant en tube fermé, le risque de contamination des échantillons est faible.

Les applications de cette technologie sont aujourd'hui très vastes et ne se limitent pas à la seule quantification des acides nucléiques. La détection de mutations ponctuelles et de polymorphismes ainsi que la recherche de délétions géniques à l'état hétérozygote sont les autres grandes applications utilisées. Dans le domaine biomédical, les applications les plus appréciables se situent en microbiologie clinique, en oncologie et dans l'étude de l'expression des gènes. Des applications très importantes ont également été développées dans le domaine agroalimentaire.

3.1.3. Les systèmes de détection utilisés qRT-PCR

Les systèmes permettant la détection des molécules d'amplicon générées après chaque cycle d'amplification font appel soit à un agent intercalant se fixant directement sur l'ADN double brin, soit à une sonde fluorogénique allant s'hybrider de manière spécifique sur le fragment cible amplifié.

3.1.3.1. Les agents intercalants

Le système de détection le plus simple repose sur l'inclusion d'un agent intercalant fluorescent dans le milieu réactionnel de PCR. L'agent le plus communément utilisé est le

Syber Green I. Celui-ci se lie préférentiellement à l'ADN double brin nouvellement synthétisé.

À chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle de PCR, le Syber Green I s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin. Lorsqu'il est excité par un rayonnement lumineux possédant une longueur d'onde d'environ 470-490 nm, il peut alors émettre un signal fluorescent spécifique à une longueur d'onde d'environ 510-530 nm (Figure 27). La mesure de l'intensité du signal émis par le Sybrer Green I à la fin de chaque étape d'élongation permet ainsi le suivi cycle par cycle de la réaction de PCR.

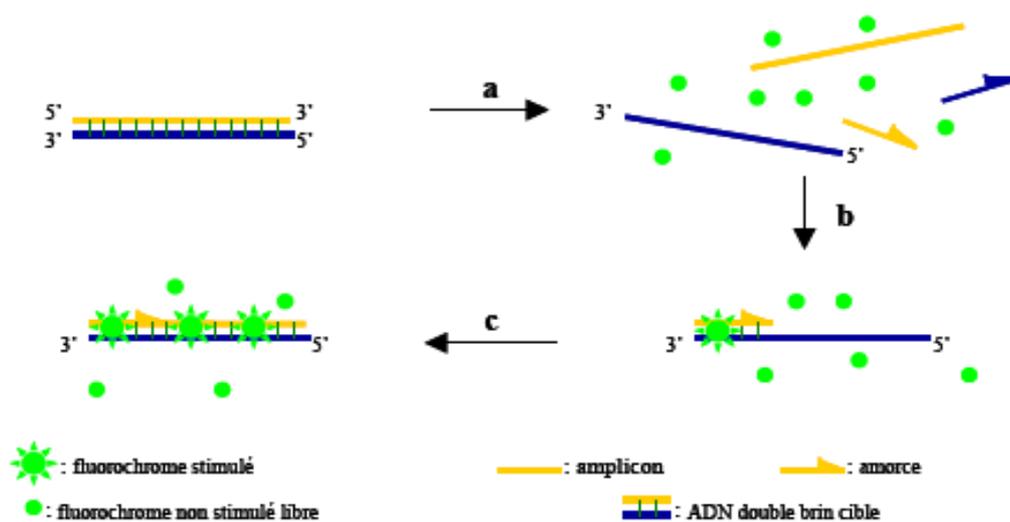


Figure 27. Présentation des différentes étapes d'une réaction de qRT-PCR utilisant le Syber Green comme système de détection des amplicons.

a : dénaturation de l'ADN, b : hybridation des amorces, c : élongation des amorces.

(Source : Poitras E., Houde A. La PCR en temps réel : principes et application. *Reviews in Biology and Biotechnology By the Moroccan Society of Biology in Canada*. 2002;2(2):2-11)

Ce système est simple, très sensible mais de spécificité essentiellement conditionnée par le choix des amorces. Le Syber Green I marque toutes les molécules d'ADN double brin, qu'elles soient spécifiques ou non de la séquence d'intérêt. De ce fait, tous les produits de PCR non spécifiques ainsi que les dimères d'amorces éventuellement formés vont également engendrer un signal de fluorescence. Ce défaut de spécificité constitue la limite majeure des systèmes de détection utilisant un agent intercalant.

L'autre limite du système est liée au fait que l'intensité générée est proportionnelle à la masse d'ADN double brin produite et par conséquent à la taille des amplicons. Ce qui n'est pas le cas des systèmes utilisant une sonde fluorogénique pour lesquels la production d'un signal de fluorescence est indépendante de la longueur du produit amplifié et spécifique de l'amplicon détecté. Néanmoins, le système de détection utilisant le Syber Green I est un système très simple qui permet de tester la spécificité d'une réaction PCR par l'établissement d'une courbe de fusion post-PCR (« melting curve ») déterminant la température de fusion (« melting temperature » ou T_m) spécifique de chaque produit amplifié.

3.1.3.2. Les sondes fluorogéniques

3.1.3.2.1. Un principe de base : le quenching par effet FRET

Une sonde fluorogénique est un fragment d'ADN monobrin, non extensible par l'ADN polymérase, spécifique de la séquence cible à amplifier, et portant un ou deux groupements fluorophores à ses extrémités. Un groupement fluorophore est une molécule capable d'absorber de l'énergie lumineuse et ainsi de passer à un état énergétique excité, puis de restituer cette énergie sous forme d'une émission fluorescente en retournant à son état initial.

À chaque cycle d'amplification de PCR, l'hybridation spécifique d'une molécule de sonde fluorogénique sur chaque molécule d'amplicon, couplée à une mesure de l'intensité de la fluorescence émise par le groupement fluorophore excité, vont permettre le suivi en direct de la réaction d'amplification. Cependant, l'émission de fluorescence mesurée ne doit se produire que lorsque la sonde s'est hybridée sur sa cible spécifique. D'où l'introduction d'un second fluorophore allant plus ou moins complètement absorber l'énergie émise par le fluorophore excité et réduire voire empêcher l'émission de fluorescence lorsque la sonde se trouve libre dans le milieu réactionnel.

Afin d'obtenir un signal intense avec un très faible bruit de fond, le système permettant la détection des produits d'amplification exploite le processus de transfert

d'énergie par résonance (« FRET : Förster Resonance Energy Transfer ») entre une molécule électroniquement excitée (le fluorophore donneur ou « reporter ») et une molécule voisine (le fluorophore accepteur, également dénommé inhibiteur ou « quencher »). Suite à ce transfert d'énergie, le fluorophore donneur excité retourne à son état initial sans émettre de fluorescence. L'énergie transférée au quencher est alors acceptée par ce dernier qui la dissipe par émission de fluorescence dans sa gamme de longueur d'onde spécifique. Ce processus de capture et de transfert d'énergie lumineuse est appelé quenching par effet FRET. Le fluorophore quencher est la molécule qui réalise le quenching de fluorescence. Deux conditions sont essentielles pour obtenir un quenching efficace par FRET : un chevauchement spectral compatible du couple donneur/accepteur et un rayon dit de Förster (distance optimale entre donneur et accepteur) compris entre 40 et 100 angströms. Sous certaines conditions, lorsque le fluorophore accepteur est un composé non fluorescent et qu'il est situé à une très grande proximité du donneur, l'énergie transférée à l'accepteur peut alors être dissipée dans l'environnement sous forme de chaleur. On parle alors de quenching collisionnel.

Selon la nature du quencher participant au processus FRET, plusieurs systèmes de détection ont été élaborés. À l'heure actuelle, les stratégies de détection les plus employées sont celles utilisant comme sonde fluorogénique, les sondes TaqMan ou sondes d'hydrolyse, les sondes FRET en tandem ou sondes LightCycler et les balises moléculaire ou sondes Molecular Beacon. D'autres systèmes comme par exemple le système Scorpion, le système Amplifluor et le système des sondes peptidiques light-up ou sondes « Peptide Nucleic Acids » (PNA) ont également été développés.

3.1.3.2.2. Les sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman

La sonde TaqMan ([Figure 28](#)) est un fragment oligonucléotidique marqué par deux groupements fluorophores à ses extrémités 5' et 3'. L'extrémité 5' porte le fluorophore donneur qui est souvent un dérivé de la fluorescéine (FAM, TET, JOE, HEX, VIC, etc).

À l'extrémité 3', se trouve le fluorophore accepteur qui est habituellement un dérivé de la rhodamine (TAMRA). Du fait de la proximité des deux groupements fluorophores, liée à la petite taille de la sonde (25 à 30 nucléotides, soit moins de 55 angströms entre les 2 fluorophores), l'énergie lumineuse absorbée par le fluorophore donneur excité est transférée par effet FRET au fluorophore accepteur. Le spectre d'absorption du TAMRA chevauchant le spectre d'émission du fluorophore donneur, celui-ci absorbe donc l'énergie qui lui est transmise et aucune fluorescence spécifique n'est ainsi émise par le fluorophore donneur.

La particularité du système TaqMan est d'exploiter l'activité 5'-3' exonucléasique de l'ADN polymérase qui permet d'hydrolyser la sonde hybridée à sa cible spécifique lors de l'étape d'élongation des amorces. Le clivage de la sonde au cours de cette étape a pour conséquence d'éloigner les deux fluorophores, de libérer le fluorophore donneur de l'effet inhibiteur exercé par le TAMRA et ainsi de rétablir son émission de fluorescence. L'intensité de la fluorescence émise par le fluorophore donneur, couramment dénommé fluorophore reporter dans une sonde TaqMan, est mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification.

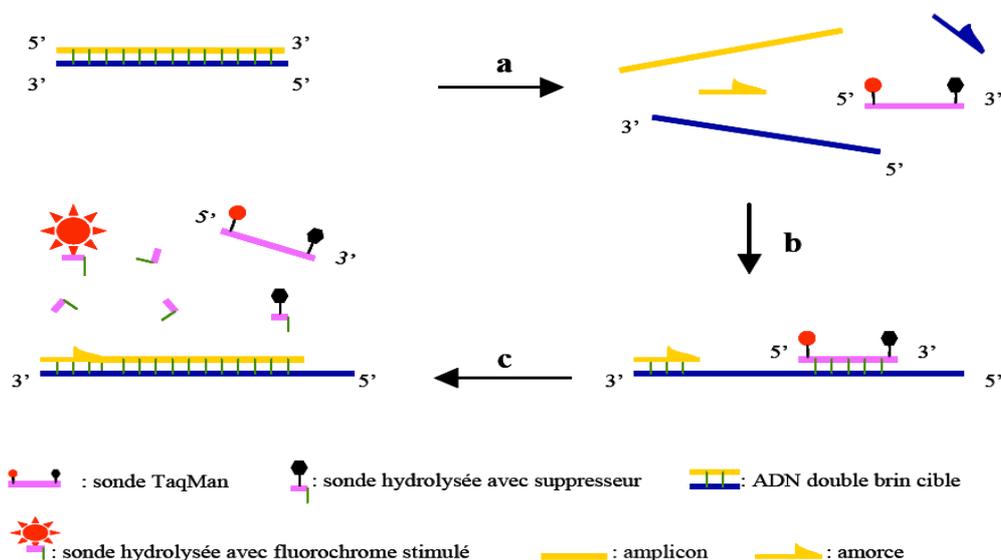


Figure 28. Présentation des différentes étapes d'une réaction de qRT-PCR utilisant la sonde Taqman comme système de détection des amplicons. a : dénaturation de l'ADN, b : hybridation de la sonde Taqman et des amorces, c : élongation des amorces et libération du fluorophore reporter.

(Source : [Poitras E., Houde A. La PCR en temps réel : principes et application. Reviews in Biology and Biotechnology By the Moroccan Society of Biology in Canada. 2002;2\(2\):2-11](#))

De par son mode de fonctionnement, le système TaqMan utilise des conditions d'amplification particulières en 2 étapes, une étape de dénaturation à 94°C et une seconde étape combinant hybridation et élongation réalisées à une température identique (aux alentours de 60°C).

La sonde ne pouvant être clivée que lorsqu'elle est hybridée à son brin complémentaire, la température d'extension des amorces doit être compatible avec la température d'hybridation de la sonde. La T_m d'une sonde TaqMan doit donc être élevée et voisine de 70°C, ce qui impose une conception rigoureuse des amorces mais facilite l'application d'un profil de thermocyclage standard.

Le système TaqMan impose l'utilisation d'une ADN polymérase obligatoirement dotée d'une activité 5'-3' exonucléase dont l'efficacité conditionnera la qualité et l'intensité du signal émis. Le clivage de la sonde étant irréversible, le système TaqMan ne permet pas l'établissement d'une courbe de fusion post-PCR. Par ailleurs, dans une sonde TaqMan, le fluorophore reporter peut être associé à un quencher non fluorescent, ce qui rend possible la détection de plusieurs cibles au cours d'une même réaction de PCR (multiplexage).

Le développement d'un nouveau type de sondes TaqMan, les sondes TaqMan-MGB, a permis de pallier certaines limites du système TaqMan. L'introduction à l'extrémité 3' de la sonde d'une molécule ayant une affinité pour le petit sillon de l'ADN ou noyau MGB (« Minor Groove Binder ») augmente la T_m de la sonde et stabilise plus fortement son interaction avec la matrice ADN. Ceci permet de dessiner des sondes de plus petite taille (13 à 20 nucléotides) qui sont capables de s'hybrider avec une matrice riche en dinucléotides GC ou AT. Ces modifications chimiques apportées aux sondes TaqMan ont également permis d'étendre les applications de cette chimie au génotypage par discrimination allélique.

3.1.4. Les appareils de qRT-PCR

Une instrumentation sophistiquée a été développée pour capitaliser les nouvelles approches de PCR quantitative. Les appareils actuellement commercialisés combinent un thermocycleur et un module de détection fluorimétrique pilotés par une station de travail informatique permettant l'acquisition de la fluorescence émise et le traitement des données obtenues.

Les principaux systèmes haut débit permettant le suivi simultané de 72 à 480 réactions de PCR sont : l'ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), l'i-Cycler iQ (BioRad), le Mx3005P (Stratagene), le LightCycler 2.0 et le LightCycler 480 (Roche Applied Science), le SmartCycler (Cepheid) et le RotorGene 6000 (Corbett Research). Les caractéristiques techniques de ces appareils ([Figure 29](#)) sont résumées et comparées dans le [Tableau 6](#).

Appareils de PCR en temps réel



Figure 29. Photographies des principaux appareils de qRT-PCR.

(Source : Présentation powerpoint S.Poulain. Introduction générale sur la PCR en temps réel. Formation Labgene (Corbett Research) – CRB Nancy – Inserm U724 sur la bioinformatique et les technologies de PCR en temps réel. Mai 2007)

Tableau 6. Caractéristiques techniques des principaux appareils de qRT-PCR.

(Source : Présentation powerpoint S.Poulain. Introduction générale sur la PCR en temps réel. Formation Labgene (Corbett Research) – CRB Nancy – Inserm U724 sur la bioinformatique et les technologies de PCR en temps réel. Mai 2007)

Fabricant	Applied Biosystems	Bio-Rad Laboratories	Cepheid	Corbett Research	Roche Applied Science	Roche Applied Science	Stratagene
Système	ABI 7500 Fast Real-Time PCR System	i-Cycler™	SmartCycler® TD System	RotorGene™ 6000	LightCycler® 480	LightCycler® 2.0	Mx3005P® Multiplex qPCR System
Avantages	-Rapidité des essais (40 min) -Essais Taqman prêt à l'emploi disponibles	-Bloc thermique réalisant des gradients de température	- Blocs de 16 échantillons contrôlés indépendamment - 96 échantillons au total -Rapidité des essais (20 min) en utilisant des tubes propriétaires	-Système centrifuge adapté à toutes les chimies -Uniformité des températures assurée par la rotation des échantillons -Logiciel d'analyse performant	-Blocs thermiques 96- et 384-puits interchangeableables -Dessin du bloc thermique assurant l'uniformité des températures	-Système centrifuge adapté à la plupart des chimies (sondes FRET) -Rapidité des variations thermiques (tubes capillaires en verre)	-Référence passive inutile, utilisation des sondes ROX ou Texas Red -Lecteur de microplaques -Logiciel pouvant conduire plusieurs machines
Excitation	Lampe Tungstène/Halogène, 5 filtres d'excitation	Lampe Tungstène/Halogène (475-645nm), Roue de 4 filtres d'excitation	LED	LED couleur haute intensité pour chaque canal	Lampe Xenon haute intensité, 5 filtres d'excitation	LED bleue (470nm)	Lampe Tungstène/Halogène à quartz Roue de 4 filtres d'excitation
Détection	5 filtres d'émission, Caméra CCD	4 filtres d'émission, Caméra CCD (515-700nm)	Photodétecteur en silicium, 4 filtres d'émission	Tube PMT Filtre d'émission pour chaque canal	5 filtres d'émission, Caméra CCD	6 photodiodes	Fibres optiques 5 filtres d'émission Tubes PMT
Bloque thermique	Peltier	Peltier et Joule Gradient de 25° C max	Bloc chauffant solide Refroidissement par air insufflé	Air thermostaté	Peltier, Dessin du bloc	Air thermostaté	Peltier
Volumes réactionnels	20-100 µL	15-100 µL	25 ou 100 µL	5-100 µL	5-100 µL (96 puits) ou 5-20 µL (384 puits)	20 ou 100 µL	10-60 µL
Multiplexage	5 fluorophores	4 fluorophores	4 fluorophores	2, 5 ou 6 couleurs	5 fluorophores	4 fluorophores (530-705nm)	5 fluorophores
Logiciel	System Software (SDS) et Primer Express inclus	i-Cycler iQ software version 3.1 inclus	SmartCycler inclus	RotorGene Software inclus	LightCycler software inclus, modules non inclus	LightCycler software 4.05 inclus	MxPro™ et Beacon Designer inclus

3.1.4.1 Le thermocycleur

La majeure partie des systèmes haut débit précédemment cités utilisent un thermocycleur 96 puits muni d'un module thermoélectrique à effet Peltier et d'un couvercle chauffant contribuant à limiter la formation de gradients de température au sein des tubes. Afin de compenser les incohérences liées à un effet de gradient de température entre le centre et les bords du bloc thermique (ou « effet bord »), ce dernier peut être équipé de bords chauffants ou d'un couvercle chauffant à gradient de température.

Par ailleurs, l'association d'un effet Joule à l'effet Peltier a permis d'obtenir une meilleure homogénéité de la température au sein du bloc thermique, d'atteindre des variations thermiques plus rapides que celles obtenues par simple effet Peltier (vitesses de chauffage et de refroidissement de l'ordre de 2 à 3°C/s au lieu d'1°C/s) et ainsi de raccourcir la durée des cycles de température (soit 40 cycles réalisés en environ 90 min au lieu de 120 min).

Le développement de blocs spéciaux permettant d'effectuer les PCR directement au sein des puits de microplaques permet l'automatisation des étapes pré-PCR et post-PCR au moyen de stations de pipettage. D'où l'évolution du format 96 puits vers des microplaques de 384 voire 768 puits.

Le LightCycler 2.0 et le RotorGene 6000 ont un thermocycleur à air pulsé. L'air ambiant insufflé dans une enceinte hermétique est chauffé au moyen d'une résistance électrique puis homogénéisé par un ventilateur (cas du LightCycler 2.0) ou par la force centrifuge d'un rotor animé d'une certaine vitesse (cas du RotorGene 6000). L'air chaud est ensuite refroidi par une nouvelle insufflation d'air ambiant. Comparé aux thermocycleurs à effet Peltier, les thermocycleurs à air pulsé assurent une répartition plus homogène de la température d'un échantillon à un autre, l'homogénéité de la température étant un critère très important allant conditionner la précision et la reproductibilité des mesures effectuées.

Le LightCycler présente la particularité d'utiliser un carroussel piloté par un moteur pas-à-pas qui porte 32 capillaires en verre dans lesquels vont se dérouler les réactions de PCR. Les capillaires étant en verre, de faible section et totalement immergés dans l'enceinte thermorégulée, les transferts thermiques sont extrêmement rapides et les vitesses de montée et descente en température également rapides, pouvant atteindre jusqu'à 20°C/s. Les cycles sont très courts et la durée d'amplification peut être réduite à 30 min pour 40 cycles.

Dans le cas du RotorGene 6000 (Figure 30), l'action combinée de la force centrifuge exercée par le rotor (36 ou 72 puits) en mouvement (500 tours/min pour les montées en température et 1000 tours/min pour les descentes) et de l'air pulsé sur la résistance électrique permet de maintenir une uniformité de température largement supérieure à celle obtenue dans les autres thermocycleurs ($\pm 0,01^\circ\text{C}$ entre les puits).

Rotorgene™ 6000 (Corbett Life Science)

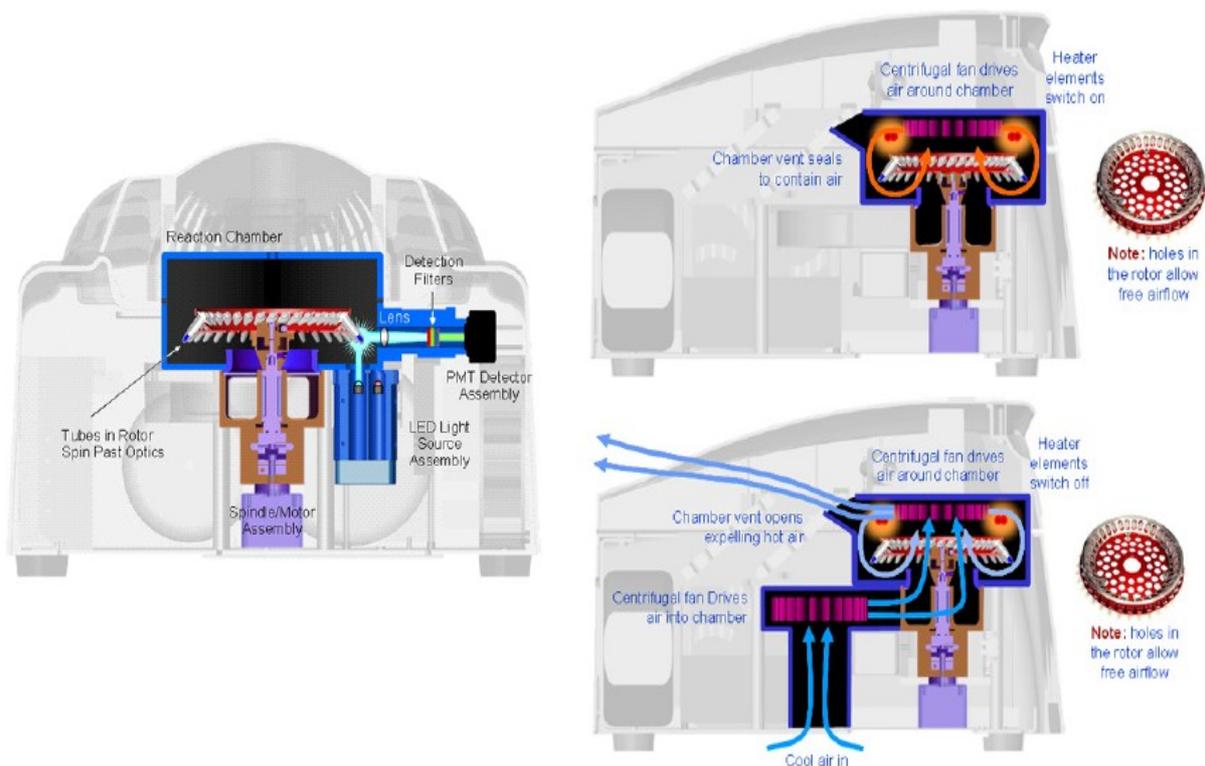


Figure 30. Représentation schématique du RotorGene 6000 (Corbett Research). (Source : Présentation powerpoint S.Poulain. Introduction générale sur la PCR en temps réel. Formation Labgene (Corbett Research) – CRB Nancy – Inserm U724 sur la bioinformatique et les technologies de PCR en temps réel. Mai 2007)

3.1.4.2. Le module de détection fluorimétrique

Il est composé d'une source lumineuse d'excitation et d'un système de détection captant les signaux fluorescents émis lors de la réaction de PCR en temps réel. Les sources lumineuses d'excitation employées sont de 2 types : lampe électronique LED (« Light Emitting Diode ») ou lampe halogène à filament de tungstène.

Les sources LED (systèmes RotorGene, LightCycler et SmartCycler) produisent un faisceau lumineux très intense mais correspondant à un domaine très étroit de longueurs d'ondes, ce qui limite le choix des fluorophores mais augmente le nombre de fluorophores détectables simultanément. Elles sont préconisées pour les fluorophores qui possèdent une longueur d'onde d'excitation proche de la longueur d'onde centrale de leur domaine spectral et apporteront dans ce cas une très grande sensibilité et brillance spectrale. Elles sont en revanche moins efficaces pour les fluorophores dont la longueur d'onde d'excitation s'éloigne de la longueur d'onde maximale et totalement inefficaces pour les fluorophores dont la longueur d'onde d'excitation n'appartient pas à leur domaine spectral.

De par l'étendue de leur domaine spectral, les lampes halogènes (ABI 7500 Fast Real Time PCR System, Mx3005P et i-Cycler iQ) offrent la possibilité d'un très grand choix de fluorophores dont les longueurs d'onde d'excitation sont sélectionnées à l'aide de filtres optiques optimisés pour éviter un chevauchement des spectres d'excitation. Elles produisent une luminosité moins intense que les LED et sont donc moins sensibles, mais le bruit de fond est beaucoup plus faible.

À la différence des autres systèmes qui incluent dans un même ensemble le thermocycleur et le module de détection fluorimétrique (systèmes compacts), l'i-Cycler iQ ([Figure 31](#)) est un système modulaire comprenant un thermocycleur, possédant la particularité très intéressante de pouvoir réaliser des gradients de température, auquel peut être adapté un bloc optique optionnel pour la PCR quantitative en temps réel. Le module optique de l'i-Cycler iQ dispose d'une technologie exclusive d'amplification qui permet l'obtention d'un signal lumineux intensifié suffisant pour illuminer simultanément les 96 puits du bloc thermique.

I-Cycler iQ™ (BioRad)

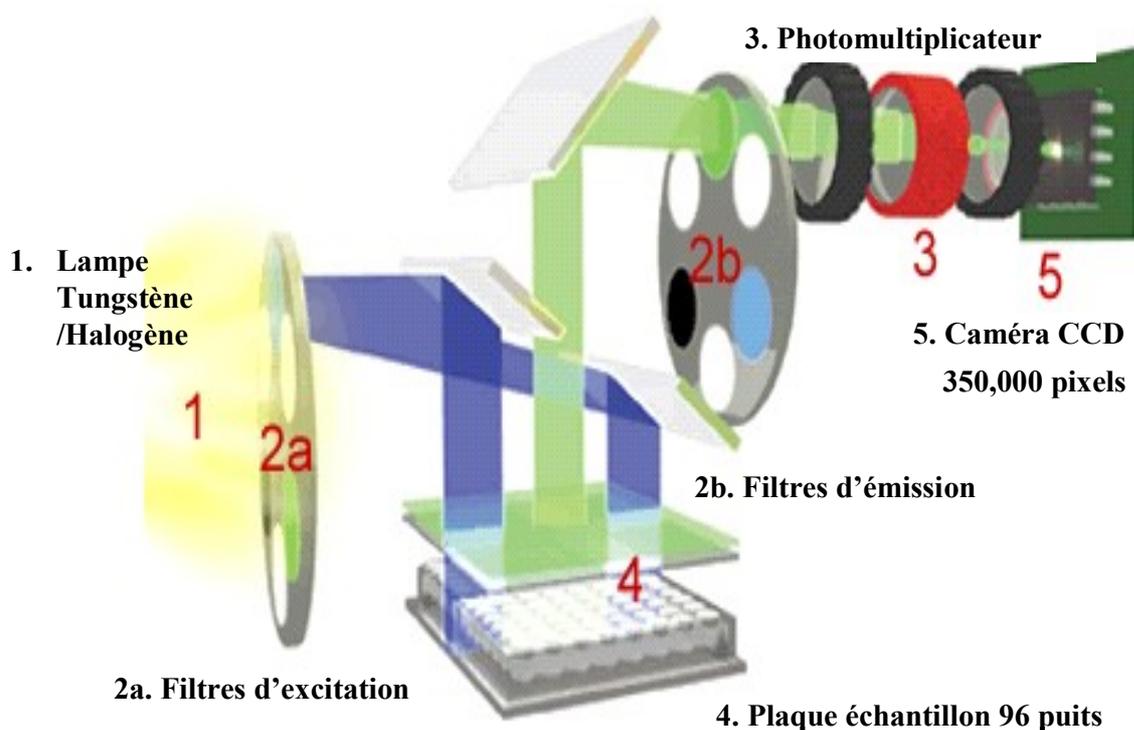


Figure 31. Représentation schématique de l'i-Cycler iQ (BioRad).

(Source : Présentation powerpoint S.Poulain. Introduction générale sur la PCR en temps réel. Formation Labgene (Corbett Research) – CRB Nancy – Inserm U724 sur la bioinformatique et les technologies de PCR en temps réel. Mai 2007)

Dans le cas du Mx3005P, le faisceau lumineux émis par une lampe tungstène/halogène à quartz est transmis dans les puits par l'intermédiaire de fibres optiques ([Figure 32](#)). L'émission de fluorescence est ensuite dirigée via les fibres optiques vers le système de détection, conférant au système une sensibilité maximale.

Mx3005P™ (Stratagene)

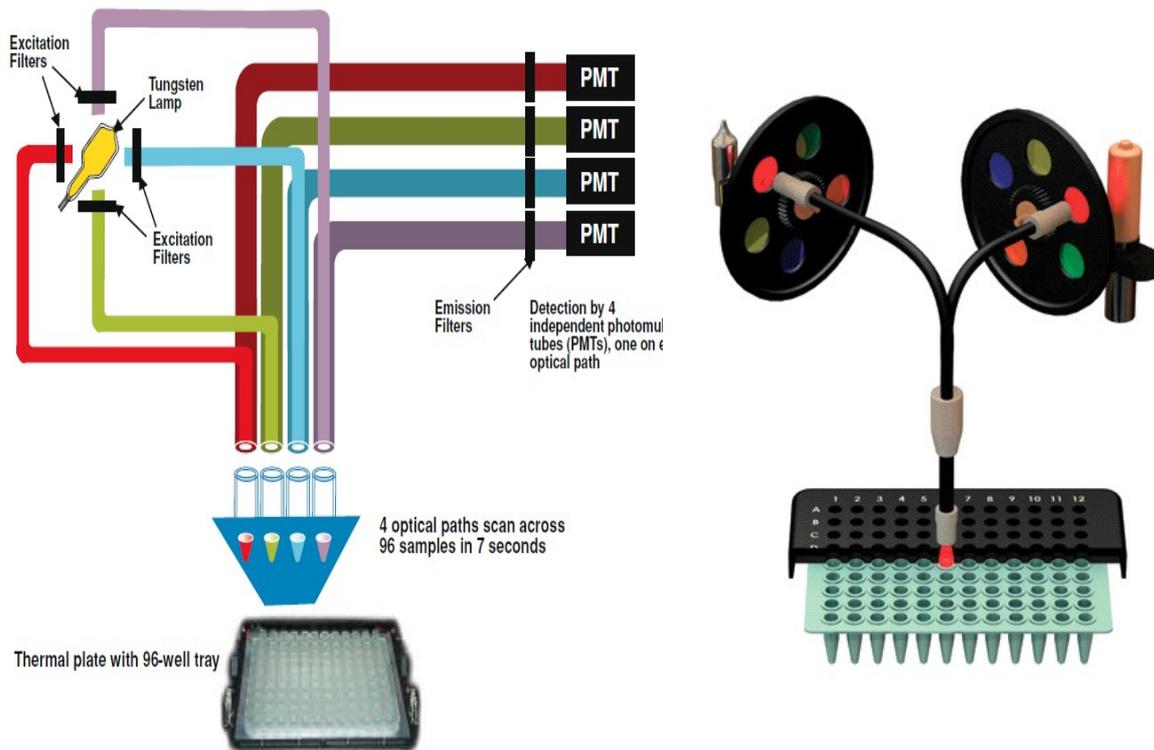


Figure 32. Représentation schématique du Mx3005P (Stratagene).

(Source : Présentation powerpoint S.Poulain. Introduction générale sur la PCR en temps réel. Formation Labgene (Corbett Research) – CRB Nancy – Inserm U724 sur la bioinformatique et les technologies de PCR en temps réel. Mai 2007)

Les signaux de fluorescence émis sont ensuite détectés par l'intermédiaire d'une caméra CCD (« charge coupled device »), d'une barrette de photodiodes ou d'un ou plusieurs tubes photomultiplicateurs (PMT) indépendants ([Tableau 6](#)). Le refroidissement d'une caméra CCD réduit de façon très significative le bruit de fond électronique et améliore considérablement la sensibilité de détection et la linéarité de réponse du système. Les tubes PMT sont autoajustables en fonction de la longueur d'onde émise.

Ils détectent les signaux de fluorescence émis avec une très grande sensibilité et un faible bruit de fond. Comparés aux caméras CCD et aux photodiodes, ils auraient un pouvoir discriminatoire supérieur et seraient particulièrement adaptés à la détection simultanée des signaux émis par plusieurs fluorophores au cours de réactions de PCR multiplexes.

La capacité d'un système de PCR quantitative en temps réel à réaliser du multiplexage est en effet liée, non seulement au choix de la chimie et des fluorophores portés par les sondes fluorogéniques mais aussi aux performances du système de détection optique (filtres optiques et détection simultanée des signaux de fluorescence émis par plusieurs fluorophores) et à la capacité du logiciel à effectuer, selon un algorithme matriciel, l'analyse différentielle de tous les fluorophores présents dans le milieu réactionnel (ou analyse multicomposant).

3.1.4.3. La station de travail informatique

Tous les systèmes présentés précédemment permettent d'acquérir et d'afficher en temps réel les données mesurées, et par conséquent de suivre en direct la cinétique d'amplification de la réaction de PCR. La vitesse d'acquisition des données est variable d'un système à l'autre et dépend du mode de détection des signaux de fluorescence émis : simultané ou séquentiel (lorsqu'un seul signal de fluorescence est détecté), position par position ou simultanément sur toutes les positions.

Les logiciels d'analyse assurent le pilotage du thermocyclage, l'acquisition et l'analyse des données brutes de fluorescence ainsi que l'exploitation de ces données pour obtenir le résultat final selon l'application choisie (quantification absolue ou relative, courbes de fusion). Ils offrent également la possibilité d'importer ou d'exporter les données brutes ou analysées sous forme de tableaux (type Excel) et ils peuvent être complétés par un logiciel de dessin des amorces et des sondes.

Les systèmes décrits apparaissent tous comme des systèmes intéressants, équivalents en termes de sensibilité et de reproductibilité. La possibilité d'adapter plusieurs chimies de détection, de quantifier plusieurs cibles simultanément, de disposer d'un logiciel d'analyse des résultats performant et souple, d'utiliser des consommables standard et de bénéficier de bonnes prestations de service (formation et service après-vente) apparaissent comme étant les principaux critères de choix à considérer lors de l'achat d'un système de PCR quantitative en temps réel. Le coût de l'appareil lui-même et des réactifs associés (sondes, kits de PCR,...) est bien sûr un élément important à prendre en compte.

3.2. Méthode

3.2.1. Dessin des amorces de qRT-PCR et des sondes Taqman

Les séquences génomiques de la β -actine et des différents RRs ont été obtenues à partir des principales banques de données disponibles sur internet : la banque du National Center for Biological Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et les navigateurs génomiques de l'Université de Californie Santa Cruz (UCSC) (<http://genome.ucsc.edu/>) et Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Les différents isotypes de RRs possèdent des séquences génomiques proches et chaque isotype possède lui-même plusieurs isoformes de transcrits ARN. Afin de retenir une séquence minimale, spécifique à chaque transcrit RR, les différentes séquences obtenues à partir des banques de données ont dans un premier temps été comparées entre elles à l'aide du logiciel d'alignement ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Les séquences minimales spécifiques de chaque transcrit RR ainsi retenues, et celle de la β -actine, ont ensuite été introduites dans le logiciel Beacon Designer version 5.1 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, États-Unis) afin de dessiner les amorces et les sondes Taqman utilisées dans cette étude. Celles-ci ont été choisies avec des T_m de 60°C pour les amorces et de 70°C pour les sondes.

Le choix d'amorces et de sondes chevauchant plusieurs exons a été favorisé dans chaque cas pour assurer la spécificité de l'amplification de l'ADNc (absence d'amplification d'un éventuel ADN génomique (ADNg) contaminant). Afin d'établir une reproductibilité satisfaisante dans l'efficacité de polymérisation des amplicons, une attention toute particulière a été donnée concernant la longueur des amorces et des sondes, leurs compositions en bases (%GC), la stabilité de leurs extrémités 3' ainsi qu'à la présence d'éventuels polymorphismes dans les séquences nucléotidiques (SNPs ou Single Nucleotide Polymorphisms).

Concernant le dessin du triplex de sondes Taqman RAR α , RAR β et RXR β , les séquences des amorces et des sondes ont été choisies afin d'éviter les répétitions de bases ou de séquences en tandem, ainsi que la formation de structures en épingle à cheveux ou encore de dimères possédant des énergies de liaison (ΔG) importantes (dimères internes, inter-amorces, inter-sondes ou amorces-sondes).

La spécificité de chaque amorce, sonde et amplicon ainsi dessiné a d'abord été établie *in silico* par l'alignement local des différentes séquences, en interrogeant en ligne les programmes BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) et BLAST (<http://www.ebi.ac.uk/blastall/nucleotide.html>). Leurs spécificités ont été par la suite confirmées *in vivo* par la présence, dans chaque cas, d'un seul amplicon visualisé lors des courbes de fusion réalisées en qRT-PCR Syber Green.

3.2.2. Synthèse des oligonucléotides

Toutes les amorces et les sondes Taqman 5' FAM-RAR β -3' TAMRA et 5' Texas Red-RXR β -3' Deep Dark Quencher 2 ont été commandées auprès de la société Eurogentec (Liège, Belgique). La sonde Taqman 5' VIC-RAR α -3' TAMRA a été synthétisée par la compagnie Applied Biosystems (Courtaboeuf, France).

3.2.3. Essais de qRT-PCR Syber Green

Pour chaque échantillon analysé, les essais de qRT-PCR Syber Green ont été réalisés en triplicats, à l'aide d'un appareil RotorGene 6000 (Corbett Research, Labgene, Archamps), et en utilisant la cascade de dilution d'ADNc : 1/10^{ème}, 1/50^{ème}, et 1/100^{ème}.

La qualité de la réaction de RT ainsi que l'intégrité des ARNs extraits ont été validées, dans chaque cas, par la réalisation d'une première expérience de qRT-PCR utilisant les amorces de la β -actine. Les expressions des différents gènes et isoformes RRs ont ensuite été mesurées en utilisant les mêmes dilutions d'ADNc que celles utilisées pour amplifier la β -actine.

Le volume réactionnel final pour les essais de qRT-PCR Syber Green est de 10 μ L, il contient :

- 0,14 μ L d'amorces à 10 μ M (140 nM chacune),
- 0,72 μ L d'EDFA,
- 5 μ L d'Absolute QRT-PCR SYBR Green Mix (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf),
- 4 μ L de la dilution d'ADNc.

Le programme thermique utilisé est le suivant :

- 95°C → 15 min : activation de la Taq Polymérase par déblocage thermique,
 - 95°C → 10 s : dénaturation des doubles brins d'ADN,
 - 60°C → 20 s : hybridation des amorces,
 - 72°C → 20 s : élongation des amorces par la Taq Polymérase,
 - 95°C → 5 s : dénaturation des amplicons,
 - de 70°C à 95°C en augmentant la température de 0,5°C toutes les 15 s : courbe de fusion des amplicons.
- } 50 cycles

Le signal de fluorescence a été collecté durant la 3^{ème} étape thermique de chaque cycle d'amplification. Le gain de détection du canal vert de l'appareil de PCR en temps réel a été optimisé afin d'obtenir une d'intensité de fluorescence initiale comprise entre 5 et 10 unités fluorescentes. L'optimisation du gain a été réalisée à 60°C avant la première acquisition de fluorescence par l'appareil de qRT-PCR.

3.2.4. Essais de qRT-PCR utilisant le triplex de sondes Taqman

Les essais de qRT-PCR utilisant le triplex de sondes Taqman ont été réalisés en duplicats en utilisant les mêmes gammes de dilutions d'ADNc que celles utilisées précédemment pour les essais en Syber Green.

Le volume réactionnel final pour ces essais est de 25 µL, il contient :

- 0,5 µL de chaque amorce à 10 µM (200 nM chacunes),
- 0,25 µL de chaque sonde Taqman à 20 µM (200 nM chacunes),
- 12,5 µL de Quantitect Multiplex PCR Mastermix 2X (Qiagen, Courtaboeuf),
- 3,75 µL d'EDFA,
- 5 µL d'ADNc.

Le programme thermique utilisé est le suivant :

- 95°C → 15 min : activation de la Taq Polymérase par déblocage thermique,
 - 94°C → 60 s : dénaturation des doubles brins d'ADN,
 - 60°C → 90 s : hybridation des amorces et des sondes +
élongation des amorces et clivage des sondes par la Taq
Polymérase (activité 5'-3' exonucléasique).
- } 50 cycles

Les mesures de fluorescence ont été réalisées au cours de la 2^{ème} étape thermique de chaque cycle d'amplification. Les gains de détection des canaux vert, orange et jaune de l'appareil de PCR en temps réel ont été optimisés indépendamment, à 60°C, avant la première acquisition de fluorescence par l'appareil de qRT-PCR. Ceci, afin d'obtenir une intensité de fluorescence initiale comprise entre 7 et 10 unités fluorescentes sur chaque canal.

Des essais de qRT-PCR monoplex, utilisant chaque sonde Taqman indépendamment, ont d'abord été réalisés sur un échantillon test et dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites précédemment. Les résultats de ces essais ont ensuite été comparés aux résultats obtenus avec le triplex de sondes Taqman pour ce même échantillon. Ceci a permis d'optimiser les conditions réactionnelles afin obtenir des efficacités de qRT-PCR triplex optimales et similaires pour les 3 sondes Taqman.

4. QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES

4.1. Principes

4.1.1. Exploitation des courbes cinétiques

Les courbes cinétiques générées au cours d'une même série de réactions de qRT-PCR sont significativement comparables :

- 1) après normalisation des fluctuations auxquelles sont soumises les mesures de fluorescence réalisées,
- 2) après définition d'un seuil de fluorescence commun à toutes les courbes cinétiques.

4.1.1.1. Normalisation des mesures de fluorescence et ligne de base

Elle s'effectue à 2 niveaux :

- normalisation des différences de mesures de fluorescence qui se produisent de cycle à cycle,
- normalisation des différences de mesures de tube à tube.

Les variations dans le temps du signal mesuré pour un échantillon donné sont le plus souvent causées par une dérive de la lampe émettrice ou par une dégradation des fluorophores au cours de la réaction de qRT-PCR. Les variations tube à tube sont principalement liées à des erreurs de pipettage, mais aussi à la non-uniformité de l'illumination des échantillons et à la différence de transmissibilité de la lumière au travers des capuchons optiques fermant les tubes de qRT-PCR.

Afin de corriger cette variabilité des mesures de fluorescence, source de bruit de fond, l'intensité de fluorescence émise par le reporter est rapportée, soit à celle émise par une référence passive (la référence passive étant un fluorophore présent dans le milieu réactionnel mais inerte à la réaction de PCR comme les fluorophores ROX ou Texas Red), soit à la fluorescence basale mesurée dans chaque tube avant le démarrage de la réaction d'amplification (normalisation dynamique tube par tube). Les valeurs mesurées relatives aux variations du signal de fluorescence émis d'un cycle à un autre sont ainsi exprimées en unités relatives de fluorescence (« RFU : Relative Fluorescence Units »). C'est la méthode de normalisation dynamique tube par tube qui a été utilisée dans cette étude afin de corriger la variabilité des mesures de fluorescence à l'aide du logiciel (RotorGene Software v.1.7.87) fourni avec notre appareil de PCR en temps réel.

Le fait de normaliser les mesures et de les exprimer en valeur relative plutôt qu'absolue permet de définir une ligne de base (ou bruit de fond) commune à toutes les cinétiques générées ([Figure 26](#)). La ligne de base permet de caractériser et de corriger toute dérive de fluorescence au cours de la réaction d'amplification. Dans le cas d'une dérive de la ligne de base, cette dernière peut être calculée comme étant la moyenne des intensités de fluorescence émise au cours des premiers cycles (par défaut entre 3 et 18 cycles) ou auto-ajustée au moyen d'un algorithme de calcul (droite des moindres carrés).

4.1.1.2. Définition d'un seuil de fluorescence

La quantité de matrice initiale contenue dans un échantillon n'est extrapolable qu'au cours de la phase exponentielle de la cinétique d'amplification. La comparaison entre toutes les cinétiques de PCR produites n'est significative qu'après établissement d'un seuil de fluorescence (ligne seuil ou « treshold ») commun à toutes les phases exponentielles.

Le seuil de fluorescence correspond à une intensité de fluorescence significativement plus grande que la fluorescence de bruit de fond ([Figure 26](#)). Il est calculé comme étant une fonction du bruit de fond. La ligne seuil peut aussi être établie par l'utilisateur lui-même qui la définira comme étant une droite parallèle à l'axe des abscisses et coupant toutes les cinétiques en un point de leur phase exponentielle.

4.1.1.3. Détermination du cycle seuil

Selon le logiciel d'analyse équipant l'appareil de PCR quantitative en temps réel, plusieurs méthodologies ont été développées pour déterminer le cycle seuil (Ct ou Cp) à partir de la courbe cinétique $RFU = f(n)$, n étant le nombre de cycles d'amplification.

Le cycle seuil est le nombre de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence émise a dépassé une valeur statistiquement significative du bruit de fond. Dans la méthode dite du seuil (« threshold method »), il peut être défini comme étant le nombre de cycles correspondant au point d'intersection de la courbe d'amplification avec la ligne seuil établie. Dans la méthode dite des points ajustés (« fit points method »), la courbe cinétique est convertie en fonction semi-logarithmique.

Après exclusion des points non informatifs (ligne de base et phase plateau), une droite de régression est établie à partir des points restants qui sont ceux de la phase exponentielle linéarisée. La valeur du cycle seuil correspondant à une cinétique donnée est alors définie comme étant le point d'intersection de la droite de régression avec la ligne seuil.

Le cycle seuil correspondant aussi au point de départ de la phase exponentielle de la cinétique d'amplification par PCR, le calcul de la valeur maximale de la dérivée seconde de la courbe $RFU = f(n)$ est une autre méthode de calcul du cycle seuil. C'est une variante de cette méthode de détermination du cycle seuil, la méthode dite « Take-Off Point », qui a été exploitée dans cette étude à l'aide du logiciel (RotorGene Software v.1.7.87) fourni avec notre appareil de PCR en temps réel.

4.1.2. Les bases mathématiques de la réaction de qRT-PCR

4.1.2.1. Nature exponentielle de la réaction

La PCR est par définition une réaction en chaîne au cours de laquelle les produits issus d'un cycle d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant. Ainsi, la réaction en chaîne qui s'établit par la répétition des cycles de dénaturation-hybridation-élongation aboutit à une accumulation exponentielle théorique de 2^n fois par molécule d'ADN.

Autrement dit, la quantité de produits de PCR double à chaque cycle d'amplification suivant la relation mathématique suivante : $N = N_0 \cdot 2^n$ (où N est le nombre de molécules amplifiées au final, N_0 le nombre initial de molécules et n le nombre de cycles d'amplification).

4.1.2.2. Efficacité d'amplification

Au niveau expérimental, la quantité d'amplicons synthétisés dépend d'un facteur primordial qui est l'efficacité d'amplification (E) définie comme étant la proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification. L'efficacité d'amplification est comprise entre 0 (aucune amplification ne s'est produite) et 1 (après chaque cycle de PCR, chaque molécule d'ADN cible a généré 2 amplicons).

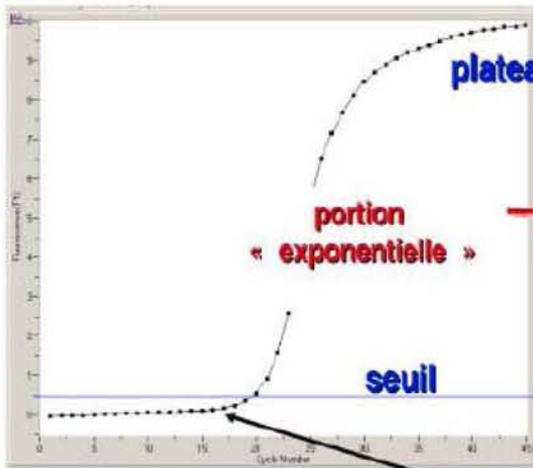
Dans les conditions expérimentales habituelles, E doit être le plus proche de 1 et varie en fonction du gène amplifié et de l'échantillon analysé. L'introduction de ce facteur essentiel, qu'est l'efficacité d'amplification, dans le calcul du nombre d'amplicons générés après n cycles de PCR conduit à l'équation suivante : $N = N_0 \cdot (1+E)^n$, ou convertie sous forme logarithmique: $\text{Log } N = \text{Log } N_0 + n \cdot \text{Log } (1+E)$.

La représentation graphique des variations du logarithme du nombre N de molécules amplifiées (Log N) en fonction du nombre de cycles d'amplification (n) est une droite (courbe standard) dont la pente (k) est Log (1 + E) et l'ordonnée à l'origine le nombre initial de molécules (N₀). Il est alors possible de calculer E selon la formule : $E = 10^{-1/\text{pente}(k)}$, puis d'en déduire le nombre initial de molécules N₀ ([Figure 33](#)).

De nombreux facteurs expérimentaux peuvent affecter l'efficacité d'amplification d'une réaction de PCR. Par exemple :

- les concentrations en réactifs (dNTPs, MgCl₂, Taq Polymérase et ADN matriciel),
- la spécificité, la composition en bases (%GC, répétitions de bases ou de séquences nucléotidiques), la longueur ainsi que les T_m des amorces et de l'amplicon,
- la formation de structures secondaires en épingles à cheveux (« hairpins ») et les dimères intra-amorces (« self dimers ») ou inter-amorces (« cross dimers »),
- ou encore la présence d'éventuels inhibiteurs enzymatiques dans le milieu réactionnel.

Fluorescence



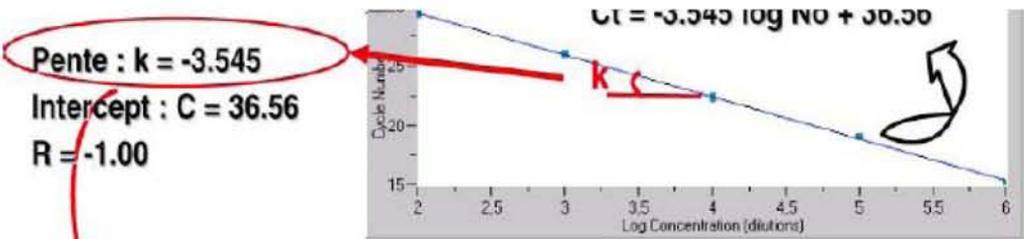
$$N = N_0 (1+E)^n$$

N = nb de copies au cycle n
 N₀ : nb initial de copies
 E : efficacité

No?

Temps (nb cycles)

Bruit de fond



$$\begin{cases} Ct = k \log N_0 + C \\ N = N_0 (1 + E)^{Ct} \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} (1+E) = 10^{-1/k} \\ E = 10^{-1/k} - 1 \end{cases}$$

$E = 10^{1/3.545} - 1 \Rightarrow E = 0.915 = 91.5\%$

Exemples

k	1+E	efficacité	équation
-3.32	2	100%	$N = N_0 2^n$
-3.6	1.9	90%	$N = N_0 1.9^n$
-4.1	1.75	75%	$N = N_0 1.75^n$

Figure 33. Démarche utilisée en qRT-PCR pour quantifier le nombre de copies initiales (N₀) de matrice cible présentes dans un échantillon.

(Source : http://transcriptome.ens.fr/sgdb/contact/download/200611_Coulier_PCR.pdf)

4.1.3. Stratégies de quantification des acides nucléiques par qRT-PCR

La concentration en acide nucléique cible peut être mesurée, soit de façon « absolue » après établissement d'une courbe d'étalonnage à partir d'un standard homologue externe, soit de façon relative après normalisation par rapport à un gène de référence (gène endogène validé) ou un calibrant (échantillon servant de référence).

Les stratégies de quantification « absolue » expriment la concentration en cible d'intérêt en tant que valeur absolue, c'est-à-dire en nombre de copies par μL ou en unités de concentration (par exemple en moles d'acide nucléique par μL), celles de quantification relative mesurent la concentration en cible d'intérêt relativement à la concentration d'une référence choisie, c'est-à-dire au moyen d'un rapport cible/référence.

4.1.3.1. Quantification « absolue » par étalonnage avec un standard

4.1.3.1.1. Principes

La détermination d'une quantité absolue d'acides nucléiques repose sur l'établissement d'une gamme d'étalonnage à partir de plusieurs dilutions en série d'un standard externe homologue titré en nombre de copies de gène ou de transcrite cible.

Pour chacune des dilutions effectuées, la cinétique de la réaction PCR est suivie en temps réel afin de déterminer le cycle seuil correspondant. La droite d'étalonnage exprimant les variations du C_t en fonction de la quantité d'acide nucléique cible contenu dans chaque point de gamme est ensuite tracée.

Après validation de la droite obtenue par le calcul de l'efficacité d'amplification (E doit être voisine de 1) et du coefficient de régression linéaire R qui permet de vérifier la reproductibilité du pipetage ($R^2 \geq 0,99$), il est alors possible d'en extrapoler le C_t et par conséquent d'en déduire la quantité d'acide nucléique cible initialement présente dans le milieu réactionnel.

4.1.3.1.2. Le standard

Le standard servant à l'établissement de la courbe d'étalonnage doit présenter une efficacité d'amplification similaire à celle des échantillons (la différence d'efficacité maximale tolérée étant de 5%) et une séquence amplifiable homologue à celle de la cible (même longueur d'amplicon et même contenu en nucléotides G et C) afin que l'amplification par qRT-PCR soit réalisée avec le même couple d'amorces et la même sonde d'hybridation que celle du gène cible.

Les standards externes habituellement employés sont constitués par une solution titrée de plasmides contenant la séquence d'intérêt ou de produits de PCR contenant les séquences du couple d'amorces utilisées pour l'amplification par PCR du fragment d'intérêt. Pour la quantification d'ARN messagers et, afin de contrôler l'efficacité de l'étape de RT, le standard préconisé est une solution titrée, soit d'ARN recombinant, soit d'ARN complémentaire (ARNc) synthétique, identique à l'ARN cible natif et généré par transcription *in vitro*.

Les stratégies de quantification utilisant un standard externe sont souvent qualifiées de quantification « absolue ». Cependant, l'exactitude de ce type de quantification est totalement dépendante de l'exactitude du titre des standards employés. La difficulté majeure d'une quantification « absolue » est la préparation d'un standard dont le nombre absolu de copies ou la concentration en cible d'intérêt est exactement connu, reproductible et stable durant un temps bien défini. Il se pose alors le problème de déterminer avec exactitude le nombre absolu de copies de gène cible par μL du standard utilisé. Cette concentration est en général mesurée par un dosage spectrophotométrique UV qui ne donne en fait qu'une valeur approximative et très souvent surestimée de la quantité de gène cible amplifiable.

Seules la méthode des dilutions limites et l'application d'une méthode d'analyse statistique reposant sur la distribution de Poisson permettent de déterminer le nombre absolu moyen de copies du standard préparé. Etant donné la difficulté et l'extrême lourdeur de

préparation d'un standard exactement titré en acide nucléique, les stratégies de quantification « absolue » sont le plus souvent réservées à des applications bien particulières telles que la quantification dans les liquides biologiques de virus responsables de pathologies telles que le sida et les hépatites B ou C.

Les applications principales de la PCR quantitative sont représentées par la comparaison entre différents types cellulaires du niveau d'expression d'un gène. Pour de telles applications, la connaissance exacte du nombre de molécules d'acide nucléique ne s'avère pas indispensable, d'où le développement des stratégies de quantification relative.

4.1.3.2. Quantification relative

4.1.3.2.1. Principes

Les méthodes de quantification relative permettent d'analyser la quantité de cible relativement à un gène de référence utilisé pour normaliser les différences liées à la qualité et la quantité des acides nucléiques extraits et pour détecter la présence d'éventuels inhibiteurs de la PCR. Le gène de référence doit satisfaire aux critères suivants :

- 1) être un gène endogène existant à l'état d'une seule copie et d'expression constante,
- 2) être amplifié par PCR avec une efficacité similaire de celle du gène cible, quelle que soit la nature de l'échantillon étudié.

Les gènes de référence les plus utilisés sont les gènes des sous-unités 18s et 28s des ARNs ribosomiaux, des gènes de structure tels que ceux de la β -actine ou de la GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase (GAPDH), les gènes de l'albumine, de la cyclophylène et de l'Hypoxanthine PhosphoRibosylTransférase (HPRT). Il est toutefois nécessaire de valider la stabilité d'expression du gène choisi comme référence en vérifiant au préalable que les niveaux d'expression de ce gène sont équivalents dans différentes conditions expérimentales.

Le résultat obtenu pour le gène cible est divisé par celui obtenu pour le gène de référence. Le rapport cible/référence ainsi calculé pour chaque échantillon inconnu est dans un second temps rapporté à celui d'un calibrant. Le calibrant est un échantillon servant de contrôle et contenant les gènes cible et référence appropriés. Le résultat final est exprimé par un indice et non pas, contrairement aux méthodes de quantification absolue, par une valeur absolue.

4.1.3.2.2. Quantification relative avec standard externe (méthode des courbes standards)

Cette méthode est en fait une variante de la méthode par étalonnage qui utilise pour calibrant un standard externe allant être dilué en série. Deux courbes d'étalonnage sont parallèlement construites, l'une pour le gène cible et l'autre pour le gène de référence endogène.

Les quantités de gène cible et de gène de référence contenues dans l'échantillon étudié sont ensuite extrapolées à partir des courbes établies puis divisées entre elles pour obtenir une valeur normalisée de la quantité de gène cible. Le fait de normaliser la quantité de gène cible par rapport à celle du gène de référence ne nécessite pas l'utilisation d'un standard externe titré de façon absolue.

4.1.3.2.3. Méthode comparative des Ct

C'est une méthode de quantification relative qui permet de calculer à partir d'une formule mathématique le nombre de molécules de gène ou de messenger contenues dans un tissu donné. Elle consiste, après coamplification du gène cible avec un gène endogène de référence à comparer les Ct calculés à partir du tissu analysé et du calibrant.

Le calibrant est ici une solution d'acide nucléique obtenue à partir d'un tissu sain ou tissu contrôle. Le nombre de molécules de gène ou de transcrit initialement présents dans le tissu analysé, normalisé par rapport au gène de référence et relatif au calibrant est alors donné par la relation mathématique suivante : $2^{-\Delta\Delta Ct}$,

dans laquelle : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{tissu analysé}) - \Delta Ct (\text{calibrant})$,

avec : $\Delta Ct = Ct (\text{gène cible}) - Ct (\text{gène endogène})$.

Comme toute méthode de quantification, la méthode de calcul du $\Delta\Delta Ct$ repose également sur l'hypothèse que les échantillons et le calibrant ont des efficacités d'amplification égales. Néanmoins, pour un gène donné, il existe des différences d'efficacité d'amplification d'un échantillon à un autre, susceptibles de générer des erreurs de calcul plus ou moins importantes.

Cette variabilité est probablement liée à différents facteurs (qualité des acides nucléiques extraits, présence de composés inhibiteurs de la PCR et différence d'efficacité du processus FRET selon les matrices) et se trouve à l'origine du manque d'exactitude et de reproductibilité des résultats obtenus par les méthodes de quantification relative.

D'où le développement de nouveaux modèles mathématiques permettant de corriger les différences d'efficacité d'amplification entre les échantillons et ainsi d'obtenir des résultats exacts et reproductibles.

4.1.3.2.4. Méthode de Pfaffl

L'une de ces méthodes permettant de corriger les différences d'efficacité d'amplification entre les échantillons est celle développée par [Pfaffl et al.](#) en 2001. Cette méthode introduit la notion d'efficacité d'amplification (E) pour chacun des gènes étudiés (gène cible et gène endogène). Elle permet ainsi d'affiner le calcul du ratio d'expression du gène cible dans le tissu analysé par rapport au tissu calibrant, selon la

formule : $R (\text{ratio}) = \frac{[E_{\text{gène cible}}]^{\Delta Ct (\text{gène cible})}}{[E_{\text{gène endogène}}]^{\Delta Ct (\text{gène endogène})}}$,

avec : $\Delta Ct (\text{gène cible}) = Ct_{\text{gène cible}} (\text{calibrant}) - Ct_{\text{gène cible}} (\text{tissu analysé})$,

et : $\Delta Ct (\text{gène endogène}) = Ct_{\text{gène endogène}} (\text{calibrant}) - Ct_{\text{gène endogène}} (\text{tissu analysé})$.

C'est cette méthode de calcul que nous avons utilisée dans cette étude afin de réaliser la quantification relative de l'expression ARNm des RRs dans les différents échantillons analysés par rapport au calibrant CEBHD : notre échantillon contrôle.

4.2. Méthode

4.2.1. Analyse des données brutes

Les données brutes obtenues à partir des essais de qRT-PCR Syber Green et des essais utilisant le triplex de sondes Taqman ont été recueillies par le logiciel RotorGene 6000 Series version 1.7.87 (Corbett Research).

L'amplification du gène cible est ainsi initialement représentée sous forme d'un graphique : $RFU = f(n)$, où n représente le nombre de cycle de PCR (Figure 34).

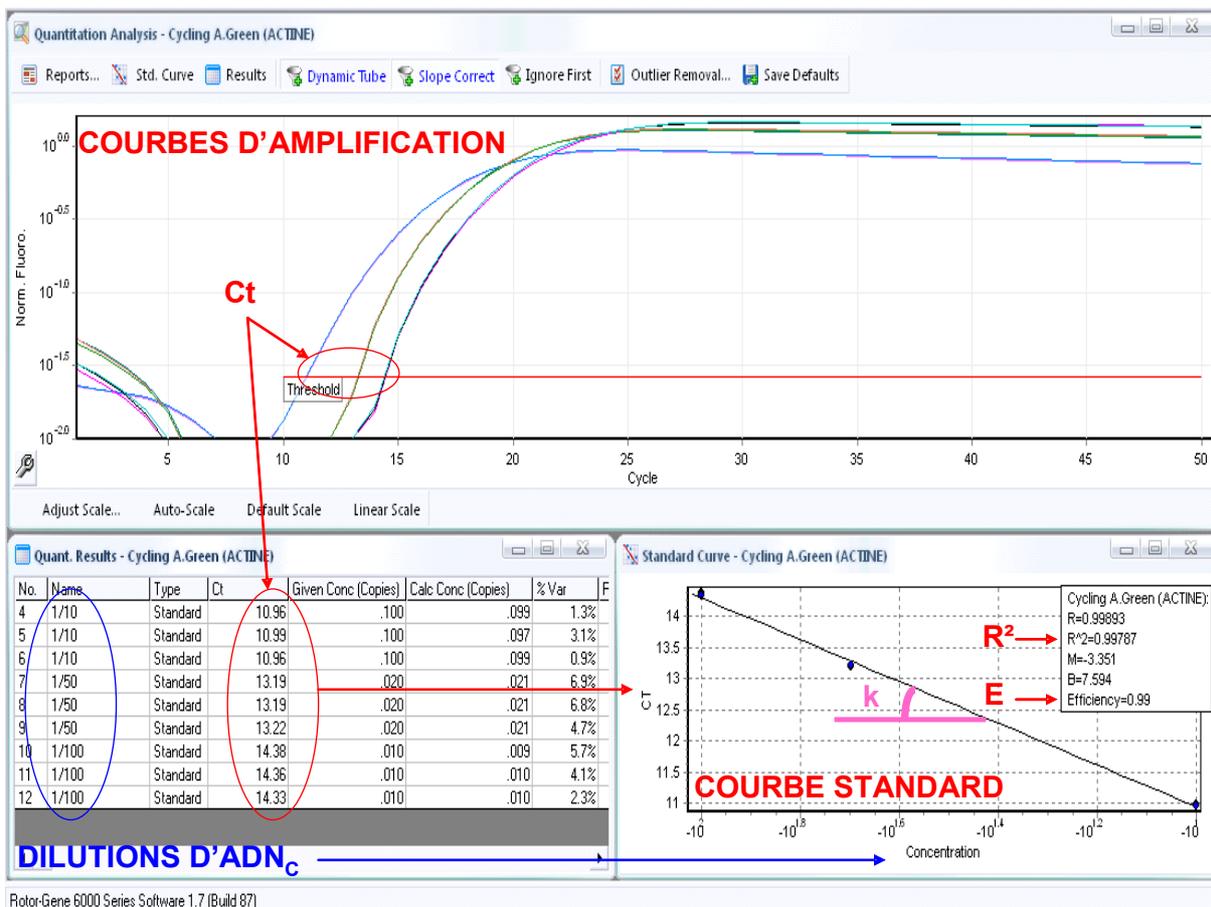


Figure 34. Exemples de courbes d'amplification (résultats bruts) obtenues lors de l'amplification de la β -actine en utilisant les dilutions d'ADNc $1/10^{\text{ème}}$, $1/50^{\text{ème}}$ et $1/100^{\text{ème}}$ en triplicats (RotorGene 6000 Series version 1.7.87).

Dans chaque cas, c'est la méthode de normalisation dynamique tube par tube (« Dynamic Tube ») qui a été utilisée afin de corriger la variabilité dans les mesures de fluorescence (Cf. [B.4.1.1.1.](#))

Pour chaque gène amplifié, les valeurs de Ct associées à chacun des réplicats de la gamme de dilution d'ADNc de l'échantillon testé (1/10^{ème}, 1/50^{ème} et 1/100^{ème}) ont été déterminées au point d'intersection entre les différentes courbes d'amplification et la ligne seuil de fluorescence (« treshold ») définie de façon automatique par le logiciel du RotorGene (Cf. [B.4.1.1.2.](#) et [B.4.1.1.3.](#)).

Les valeurs de Ct ainsi obtenues pour les différents réplicats de chaque point de la gamme de dilution d'ADNc ont été reportées sur un graphique en fonction de la concentration initialement associée à ce point, permettant ainsi d'établir une courbe standard :

Ct = f(concentration) , ([Figure 34](#) et [Figure 33](#)).

La valeur de la pente (k) associée à chaque droite ainsi obtenue a permis de calculer l'efficacité d'amplification de chaque gène dans chaque échantillon testé, selon la formule :

E = 10^(1/pente) , ([Figure 34](#) et [Figure 33](#)).

La qualité des réplicats (pipettage) a, quant à elle, été établie par le calcul des valeurs des coefficients de régression linéaire (R) et des coefficients de corrélation (R²) associé à chaque courbe standard (Cf. [B.4.1.3.1.1.](#)).

Un module original de quantification comparative est inclus dans le logiciel du RotorGene 6000. Ce module permet d'établir la dérivée seconde de chaque courbe d'amplification : **dF2/d2C = f(n)** , où n représente le nombre de cycles de PCR ([Figure 35](#), Cf. [B.4.1.1.3.](#)).

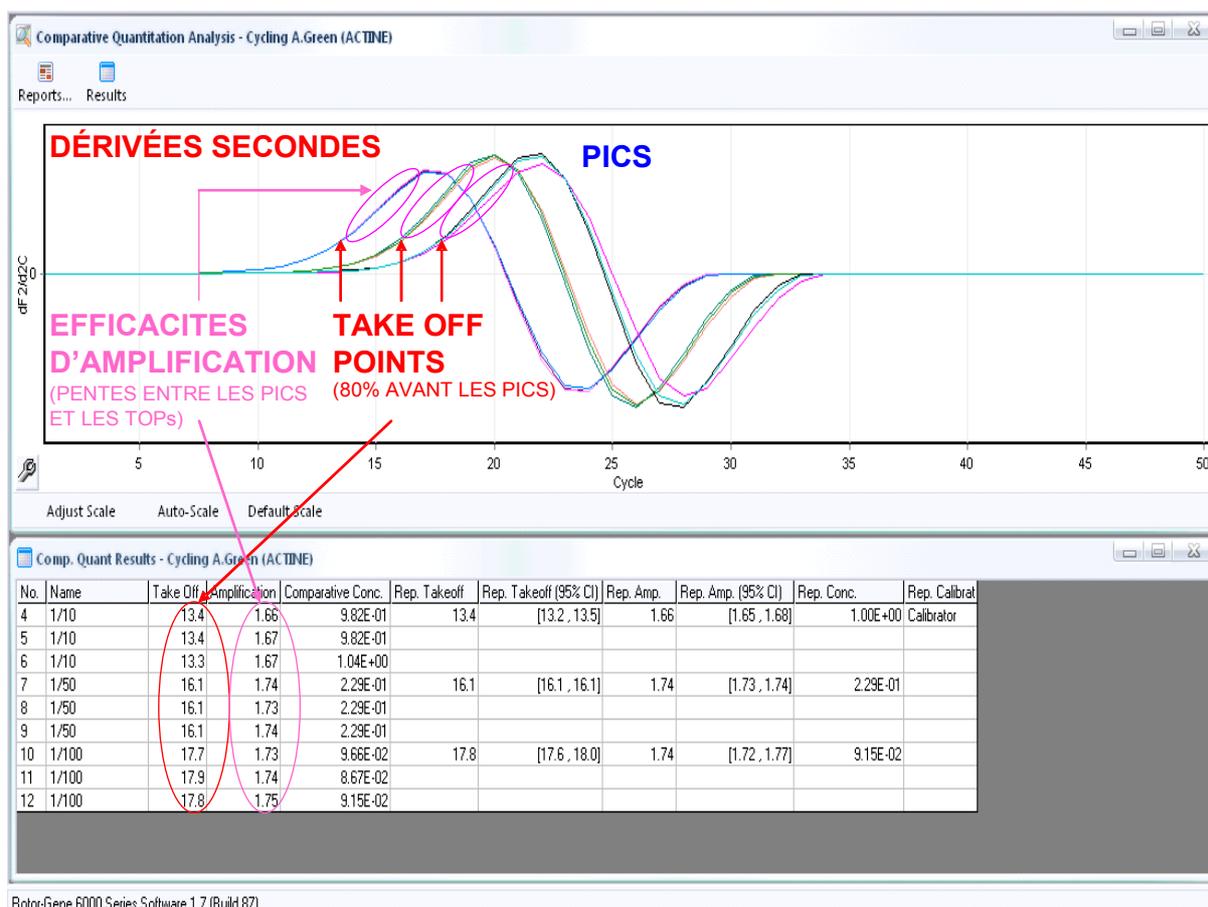


Figure 35. Exemples de dérivées secondes et de résultats obtenus lors de l'utilisation du module de quantification comparative inclus dans le logiciel du Rotorgene (ces dérivées secondes ont été obtenues à partir des courbes d'amplification présentées dans la Figure 34).

Le pic ainsi obtenu pour chacune de ces dérivées secondes correspond au cycle de PCR pour lequel la synthèse de l'amplicon est la plus efficace. Pour chaque dérivée seconde, le logiciel détermine alors automatiquement une nouvelle valeur de cycle seuil, appelée « Take-Off Point (TOP) », et correspondant au cycle d'amplification situé 80% avant celui correspondant au pic de la dérivée seconde (Figure 35).

Le logiciel détermine également dans chaque cas une Efficacité d'Amplification (AE) à partir de la pente de la section de courbe située entre le TOP et le pic de la dérivée seconde. Pour chaque gène et pour chaque échantillon analysé, ont ensuite été calculées les moyennes de toutes les valeurs de TOP et d'AE ainsi obtenues pour les différents réplicats de la gamme de dilution d'ADNc, permettant d'établir les valeurs mTOP (Take-Off Point moyen) et mAE (Efficacité d'Amplification moyenne) ainsi que leurs Déviations Standards (SD).

4.2.2. Analyse statistique

Les données obtenues précédemment ont ensuite été exportées dans 2 logiciels d'analyse statistique, développés par [Pfaffl et al.](#) en 2002 et 2004, et téléchargeables gratuitement sur internet.

4.2.2.1. Logiciel Bestkeeper

Le premier logiciel utilisé est le logiciel Bestkeeper version 1. Il permet, à l'aide d'un test de randomisation statistique, de valider la stabilité d'expression des gènes de référence (gènes endogènes) utilisés pour la normalisation des résultats de qRT-PCR (Cf. [B.4.1.3.2.1.](#)). Le logiciel permet aussi d'établir un index de normalisation (index Bestkeeper) à partir de la combinaison des gènes de référence dont les expressions sont établies comme stables et fortement corrélées au travers des différents échantillons analysés.

La valeur de mTOP associée à chaque gène pour chaque échantillon analysé ainsi que la valeur moyenne de toutes les mAE calculées pour chaque gène (Av. mAE) sont introduites dans le logiciel. Celui-ci évalue, dans un premier temps, la qualité de chaque échantillon d'ARNt analysé par le calcul d'un indice de qualité (indice InVar).

Bestkeeper calcule ensuite la Déviation Standard (SD) des différentes valeurs de mTOP entrées pour chaque gène. Les gènes dont la SD a une valeur < 1 (signifiant ainsi une stabilité d'expression au travers des différents échantillons analysés) sont alors désignés comme des gènes de référence potentiels.

Le logiciel teste après les corrélations qui existent entre les niveaux d'expression respectifs de chaque gène de référence potentiel. Les gènes dont les expressions sont fortement corrélées ($p < 0.05$) sont combinés dans un index de normalisation (index Bestkeeper). Les corrélations qui existent entre cet index de normalisation et chacun des gènes utilisés pour son calcul sont aussi testées. Dans le cas d'une bonne corrélation avec l'index ($p < 0.05$), le gène de référence est alors validé.

Finalement, l'index Bestkeeper issu de la combinaison des gènes de références ainsi validés est utilisé pour la normalisation fiable de l'expression des différents gènes cibles.

4.2.2.2. Logiciel REST-RG

Le deuxième logiciel utilisé est le logiciel REST dont une version, appelée REST-RG, a été spécialement adaptée pour l'import direct des résultats (TOP et AE) obtenus en utilisant le module de quantification comparative inclus dans le logiciel du RotorGene.

REST-RG permet la transformation des données brutes obtenues par qRT-PCR en ratios d'expression génique (R). Ce logiciel exploite le modèle mathématique décrit par [Pfaffl et al.](#) en 2001 qui tiend compte des différences d'efficacités d'amplification et combine la quantification génique avec la normalisation par un ou plusieurs gènes de référence ainsi que par un échantillon contrôle. Le modèle mathématique utilisé est le suivant :

$$\text{Ratio (R)} = \frac{(E_{\text{gène cible}})^{\Delta Ct \text{ gène cible (échantillon contrôle-échantillon analysé)}}}{(E_{\text{gène de référence}})^{\Delta Ct \text{ gène de référence (échantillon contrôle-échantillon analysé)}}$$

Le calcul des ratios d'expression génique est réalisé en se basant sur la valeur spécifique de mAE associée à chaque gène dans chaque échantillon analysé ($mAE \leftrightarrow E$) et sur les écarts de mTOP correspondants calculés entre l'échantillon analysé et l'échantillon contrôle ($\Delta mTOP \leftrightarrow \Delta Ct$).

L'expression du gène cible est par ailleurs simultanément normalisé par la combinaison optimale de gènes de référence précédemment définie par le logiciel Bestkeeper (index de normalisation).

Les résultats des calculs de ratios d'expression sont validés à l'aide d'un test de randomisation statistique intégré dans le logiciel (« Pair-Wise Fixed Reallocation Randomisation Test ») et ils sont finalement représentés sous forme de graphiques associés à leurs Erreurs Standards (ES) qui sont estimées via un algorithme de Taylor.

C. ÉTUDE DE LA RÉGION GÉNOMIQUE RAR β

1. TRANSCRITS NON VALIDÉS SITUÉS DANS LA RÉGION GÉNOMIQUE RAR β

1.1. Dessin des amorces de PCR

Les navigateurs génomiques de l'UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) et d'Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) ont été interrogés afin de rassembler les dernières données mises à jour concernant le gène RAR β et de reconstituer ainsi *in silico* l'organisation de sa région chromosomique étendue.

Après le recueil des différentes séquences, des amorces de RT-PCR spécifiques ont été dessinées à l'aide du logiciel Beacon Designer version 5.1, selon la même méthodologie que celle décrite précédemment pour les amorces de la β -actine et des RRs.

Ceci, afin de rechercher la présence de transcrits ARNm RAR β non validés : [GenBank:DA240288], [GenBank:U52076], [GenBank:DC376623] et [GenBank:DQ083391] dans différents échantillons d'ARNt.

1.2. Amplification par RT-PCR des transcrits RAR β non validés

Les échantillons d'ARNt précédemment extraits à partir de CEBHD, CEBHND, CML, ainsi que des lignées cellulaires A549, H2087, H2342 et BEAS-2B, ont dans un premier temps été rétroconvertis selon la même procédure que celle décrite précédemment.

Les ADNc néosynthétisés ont d'abord été dilués au 1/10^{ème} dans de l'EDFA puis amplifiés par PCR dans un thermocycleur (DNA Engine, Peltier Thermal Cycler PTC200, Bio-Rad, Marne-la-Coquette), en utilisant les amorces dessinées pour [GenBank:DA240288], [GenBank:U52076], [GenBank:DC376623] et [GenBank:DQ083391].

Le volume réactionnel final de PCR est de 20 μ L, il contient :

- 2 μ L de tampon réactionnel 10X (1X)
- 0,6 μ L de $MgCl_2$ à 50 mM (1,5 mM)
- 2 μ L de dNTPs à 500 μ M (50 μ M)
- 0,5 μ L d'amorces à 10 μ M (250 nM chacune),
- 0,2 μ L de Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Cergy-Pontoise) (1U),
- 10,2 μ L d'EDFA,
- 3 μ L de la dilution d'ADNc.

Le programme thermique utilisé est le suivant :

- 94°C → 2 min : activation de la Taq Polymérase par déblocage thermique,
 - 94°C → 20 s : dénaturation des doubles brins d'ADN,
 - 62°C → 20 s : hybridation des amorces,
 - 72°C → 45 s : élongation des amorces par la Taq Polymérase,
 - 72°C → 10 min : fin de synthèse des amplicons.
- } 30 cycles

À la fin des réactions, les différents milieux réactionnels ont été mélangés à 1 μ L de tampon d'échantillon puis analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% p/v (0,5 g d'agarose (Q-Biogène, Illkirch) pour 50 mL de tampon TAE 1X et 1 μ L d'une solution aqueuse de BET (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier) à 5 mg/mL). La migration électrophorétique a été effectuée pendant 45 min sous 75 V et 210 mA. Les amplicons ont été visualisés par irradiation du gel aux UV (TFL-20M, Appligene-Oncor, Illkirch).

2. ANALYSE *in silico* DES RÉGIONS PROMOTRICES POTENTIELLES SITUÉES EN AMONT DES TRANSCRITS NON VALIDÉS

Les séquences des régions génomiques 5' (-1500/-50) situées en amont des transcrits non validés : [GenBank:DC376623] (région P1), [GenBank:DQ083391] (région P1') et [GenBank:U52076] (région P1''), ont été recueillies à partir du navigateur génomique de l'UCSC.

Afin d'y déceler les caractéristiques d'une éventuelle région à activité promotrice (TATA Box,...), ces séquences ont dans un premier temps été analysées *in silico* en ligne par les programmes : Proscan version 1.7 (<http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>), Promoter 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>), et Promoter Inspector (<http://www.genomatix.de/>).

De plus, afin d'identifier la présence spécifique d'un RARE, les mêmes séquences ont été analysées par le programme ModelInspector (<http://www.genomatix.de/>) en utilisant une matrice de poids générée à partir de la séquence RARE DR5 modèle suivante : **[pu]g[g/t]tca=[ag]g[gt]tca / tga[ac]c[ct]**.

Une analyse additionnelle de ces séquences a été conduite à l'aide des programmes MatInspector (<http://www.genomatix.de/>) et de TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) afin de déterminer la présence éventuelle d'autres sites de liaison de facteur de transcription.

Finalement, la conservation orthologue de ces séquences a été étudiée en utilisant le module de génomique comparative inclus dans le programme Eldorado (<http://www.genomatix.de/>).

3. CLONAGE DE LA RÉGION CONSERVÉE P1'-RARβ

3.1. Extraction de l'ADNg des CEBHD

L'extraction de l'ADNg a été réalisée à l'aide du réactif Trizol à partir de la phase organique inférieure rouge obtenue lors de l'extraction de l'ARNt contenu dans l'échantillon CEBHD (Cf. [B.1.2.](#)).

La phase organique a été récupérée dans un tube propre de 2 mL puis, 0,3 mL d'éthanol absolu (Carlo Erba Réactifs, Val de Reuil) pour 1 ml de Trizol y ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été agité par inversion/retournement du tube puis laissé à température ambiante pendant 3 min et centrifugé à 3000 rpm, pendant 5 min à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu, qui contient les protéines, a alors été récupéré dans un nouveau tube et conservé à 4°C.

Le culot d'ADNg obtenu a ensuite été lavé à 2 reprises dans un volume correspondant à 1 mL d'une solution de citrate de sodium (0,1M dans l'éthanol à 10%) pour 1 mL de Trizol. Avant chaque lavage, le tube a été incubé pendant 30 min à température ambiante sous agitation périodique, puis il a été centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min à 4°C et le surnageant éliminé.

Le culot a alors été resuspendu dans un volume correspondant à 1,5 mL d'éthanol à 75% (Carlo Erba Réactifs, Val de Reuil) pour 1 ml de Trizol, puis le tube placé pendant 20 min à température ambiante sous agitation périodique, centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min à 4°C et le surnageant éliminé.

Le culot d'ADNg a alors été séché à froid et sous vide pendant 10 min puis redissous doucement à la pipette dans 300 µL de NaOH 8 mM et centrifugé à 12000 rpm pendant 10 min. Le surnageant, contenant l'ADNg, a alors été transféré dans un nouveau tube et dialysé pendant une nuit contre une solution d'EDTA à 1 mM (pH=8) afin d'ajuster les conditions de pH pour empêcher sa dégradation. 1 U/µL d'inhibiteur de ribonucléases

(RNasin Ribonuclease Inhibitor, Promega, Charbonnière-les-bains) diluée dans sa solution tampon ont également été ajoutés afin d'éliminer toutes traces d'ARN contaminant.

L'ADNg ainsi extrait a ensuite été dosé au spectrophotomètre (BioPhotometer, Eppendorf, Le Pecq) par mesure des DO_{260nm} et DO_{280nm} d'une dilution au 1/50^{ème} de l'ADNg (1 μ L d'ADNg et 49 μ L d'EDFA). La relation suivante : 1 unité de DO_{260nm} mesurée représente 50 μ g d'ADNg a été utilisée pour la quantification. Le calcul du rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} a, quant-à lui, permis d'apprécier la contamination en ARN, en protéines et en phénol de l'ADNg extrait ; il doit être compris entre 1,7 et 2 pour valider la pureté de l'échantillon d'ADNg.

3.2. Dessin des amorces de PCR

Des amorces de PCR spécifiques destinées à amplifier la zone d'ADNg suivante : [chr3:25,355,884-25,357,317], située en amont du transcrit [GenBank:DQ083391] et incluant la région P1' (1434 pb), ont été dessinées à l'aide du logiciel Beacon Designer version 5.1, selon la même méthodologie que celle décrite précédemment.

Deux paires d'amorces de PCR ont été dessinées pour amplifier la région P1' dans son orientation sens (5'-3') et dans son orientation inverse (3'-5'). Afin de cloner les amplicons ainsi générés dans un plasmide reporter d'activité promotrice de type pGL3, les paires d'amorces ont été dessinées de façon à contenir chacune dans sa séquence respective un site de restriction enzymatique de type **MluI** ou **XhoI**.

Les amorces P1' ainsi dessinées pour amplifier la région dans son orientation sens ont les séquences suivantes : 5'-aatg**acgcgt**ccaattcaacgctttctgtacc-3' et 5'-aacgg**ctcgag**gctctgtcaatggcttctcc-3' ; celles dessinées pour amplifier la même région dans son orientation inverse ont pour séquences : 5'-aacgg**ctcgag**ccaattcaacgctttctgtacc-3' et 5'-aatg**acgcgt**gctctgtcaatggcttctcc-3'.

3.3. Amplification par PCR de la région P1'-RAR β

L'ADNg, précédemment extrait de l'échantillon de CEBHD, a dans un premier temps été dilué à une concentration de 200 ng/ μ L dans de l'EDFA et il a ensuite été amplifié par PCR en utilisant les 2 paires d'amorces P1' sens et inverse.

Le volume réactionnel final de PCR est de 20 μ L, il contient :

- 2 μ L de tampon réactionnel 10X (1X)
- 0,6 μ L de MgCl₂ à 50 mM (1,5 mM)
- 2 μ L de dNTPs à 500 μ M (50 μ M)
- 0,5 μ L d'amorces à 10 μ M (250 nM chacune),
- 0,2 μ L de Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Cergy-Pontoise) (1 U),
- 13,2 μ L d'EDFA,
- 1 μ L de la dilution d'ADNg.

Le programme thermique de PCR utilisé est le même que celui décrit précédemment pour l'amplification des transcrits RAR β non validés (Cf. [C.1.2.](#)).

Dix réactions de PCR ont ainsi été réalisées pour chaque paire d'amorces. Les milieux réactionnels ont été analysés par migration sur gel d'agarose à 1% comme indiqué précédemment (Cf. [C.1.2.](#)).

Les bandes visualisées sur le gel, qui contiennent les amplicons générés par PCR, ont alors été découpées à l'aide d'une lame de scalpel, précédemment nettoyée à l'alcool.

3.4. Purification des amplicons P1'-RAR β sens et inverse

Les amplicons P1'-RAR β sens et inverse contenus dans les fragments de gel d'agarose découpés ont été purifiés sur colonne à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Courtaboeuf).

Les fragments ont d'abord été déposés sur du papier absorbant afin de les sécher en éliminant l'excès de tampon TAE. Ils ont alors été pesés puis regroupés, en fonction de leur orientation et par fractions de 400 mg, dans des tubes de 2 mL. 3 volumes de tampon QG pour 100 mg de gel ont alors été ajoutés dans chaque tube. Ils ont ensuite été incubés pendant 10 min à 50°C dans un bain-marie en les vortexant toutes les 3 min afin de mieux dissoudre les fragments de gel d'agarose.

1 volume d'isopropanol pour 100 mg de gel a alors été ajouté dans chaque tube. Les différents mélanges ont été déposés sur des colonnes de purification puis centrifugés 1 min à 13000 rpm et les éluats ont été jetés. Afin d'éliminer toutes traces d'agarose, 500 µL de tampon QG ont alors été ajoutés dans chaque colonne. Elles ont ensuite été centrifugées pendant 1 min à 13000 rpm et les éluats éliminés.

Les colonnes ont ensuite été lavées à 2 reprises par ajout de 750 µL de tampon éthanol PE suivi d'une centrifugation pendant 1 min à 13000 rpm. Les éluats ont été éliminés, puis les colonnes centrifugées « à vide » pendant 2 min afin d'éliminer l'éthanol résiduel.

Les colonnes ont finalement été placées dans des tubes de 1,5 mL et, 30 µL de tampon d'éluion EB (10 mM Tris-HCl, pH=8,5) ont été déposés au centre de chaque membrane. Après 1 min d'absorption, les colonnes ont été centrifugées 2 min à 13000 rpm pour éluer les amplicons.

Les éluats contenant les amplicons P1'-RARβ sens et inverse purifiés ont d'abord été dosés au spectrophotomètre (Eppendorf, Le Pecq) par mesure de la DO_{260nm} d'une dilution au 1/50^{ème} de chaque éluat (1 µL d'éluat + 49 µL de tampon EB) et en utilisant la formule suivante : 1 unité de DO_{260nm} mesurée = 50 µg d'ADN double brin. La purification des amplicons a finalement été contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, comme indiqué précédemment.

3.5. Digestion enzymatique des amplicons P1'-RAR β sens et inverse

Les amplicons P1'-RAR β sens et inverse possèdent de part et d'autre de leurs séquences, à leurs extrémités 5' et 3', des sites de coupure pour les enzymes de restriction MluI et XhoI.

Ils ont été digérés simultanément par ces 2 enzymes afin de produire des inserts possédant des extrémités cohésives « bouts collants » permettant leur clonage par ligation enzymatique dans un plasmide reporter d'activité promotrice de type pGL3, lui-même digéré par ces 2 enzymes, et possédant donc des extrémités cohésives complémentaires.

Les réactifs utilisés pour la digestion enzymatique des amplicons proviennent tous de la compagnie New England Biolab (NEB), Saint-Quentin en Yvelines.

Le volume réactionnel final est de 50 μ L, il contient dans l'ordre :

- 25 μ L de produit de PCR purifié (amplicon sens ou inverse) à environ 60 ng/ μ L (soit 1,5 μ g au total),
- 5 μ L de tampon réactionnel 10X adapté pour l'activité simultanée des 2 enzymes de restriction (Buffer 3, NEB) (1X),
- 0,5 μ L de SérumAlbumine Bovine (BSA) 100X à 10 mg/mL (1X ou 0,1 mg/mL),
- 1 μ L d'enzyme de restriction MluI à 10 U/ μ L (10 U),
- 0,5 μ L d'enzyme de restriction XhoI à 20 U/ μ L (10 U),
- 18 μ L d'EDFA.

La réaction a été réalisée en plaçant les tubes pendant 3 h à 37°C dans un thermocycleur (DNA Engine, Peltier Thermal Cycler PTC200, Bio-Rad, Marne-la-Coquette). Une étape d'inactivation des enzymes par la chaleur est ensuite réalisée pendant 20 min à 65°C.

3.6. Purification des inserts de clonage P1'-RAR β sens et inverse

Les inserts de clonage P1'-RAR β sens et inverse ont été purifiés à l'aide du kit MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Courtaboeuf). 5 volumes de tampon PB ont été ajoutés pour 1 volume de chaque réaction de digestion. Chaque mélange obtenu a ensuite été déposé, goutte à goutte, dans une des colonnes de purification incluses dans le kit.

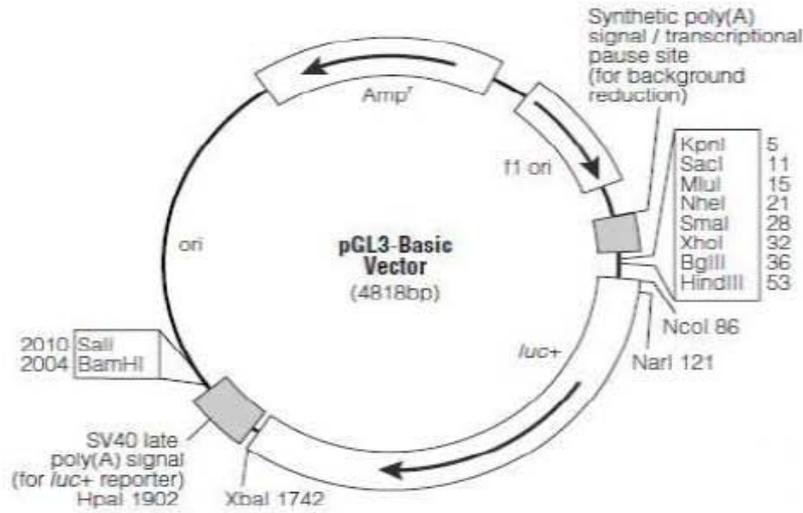
Les colonnes ont alors été centrifugées 1 min à 13000 rpm et les éluats éliminés. Les inserts de clonage ainsi retenus sur les résines des colonnes de purification ont ensuite été lavés par ajout de 750 μ L de tampon éthanol PE suivi d'une centrifugation des colonnes 1 min à 13000 rpm. Les éluats ont alors été éliminés et les colonnes centrifugées une seconde fois « à vide » afin d'éliminer l'éthanol résiduel.

Après 1 min d'adsorption, les inserts de clonage ont finalement été élués dans un volume final de 10 μ L de tampon d'éluion EB (10 mM Tris-HCl, pH=8,5) par centrifugation des colonnes 1 min à 13000 rpm. Les inserts de clonage P1'-RAR β sens et inverse ainsi purifiés ont alors été dosés et contrôlés sur gel d'agarose à 1%, selon la même méthodologie que celle décrite précédemment.

3.7. Description du vecteur de clonage

Le vecteur de clonage utilisé dans cette étude est le plasmide pGL3 Basic Luciferase Reporter Vector (Promega, Charbonnières-les-Bains) ([Figure 36](#)).

Le plasmide contient dans sa séquence une région de clonage multiple comprenant les sites de coupure de nombreuses enzymes de restriction, dont les enzymes MluI et XhoI. La vérification par PCR de l'intégration d'un insert dans le plasmide est rendu possible par la présence de sites de liaison pour les amorces GLprimer2 et RVprimer3 de part et d'autre du site de clonage.



pGL3-Basic Vector Sequence Reference Points:

Promoter	(none)
Enhancer	(none)
Multiple cloning region	1-58
Luciferase gene (<i>luc+</i>)	88-1740
GLprimer2 binding site	89-111
SV40 late poly(A) signal	1772-1993
RVprimer4 binding site	2080-2061
ColE1-derived plasmid replication origin	2318
β -lactamase gene (<i>Amp^r</i>)	3080-3940
f1 origin	4072-4527
upstream poly(A) signal	4658-4811
RVprimer3 binding site	4760-4779

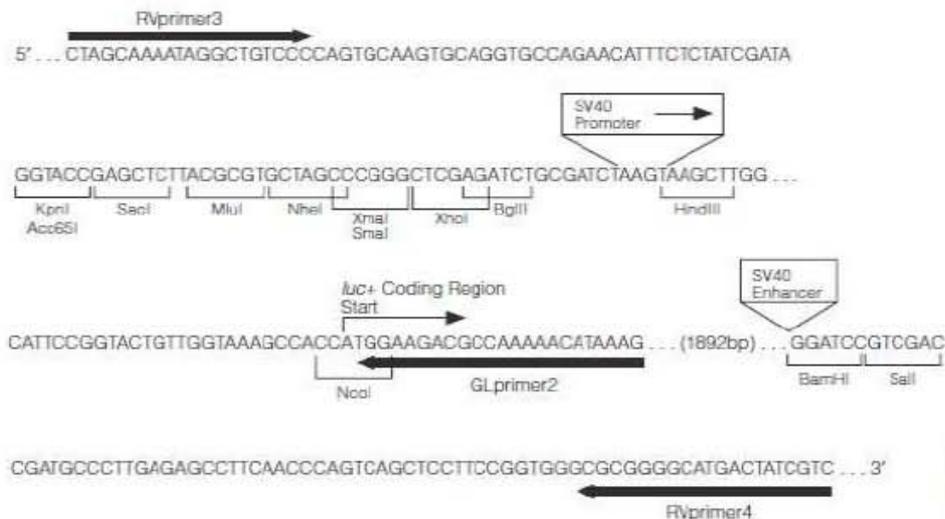


Figure 36. Description du vecteur de clonage : le plasmide pGL3 Basic.

(Source : <http://www.promega.com>)

Le vecteur pGL3 Basic, d'une taille initiale de 4818 pb, est dépourvu de promoteur eucaryote et de séquence à activité régulatrice, permettant ainsi le clonage d'une région promotrice potentielle à l'intérieur de ce plasmide et l'étude *in vitro* de son activité par transfection cellulaire.

L'expression du gène modifié de la firefly luciférase (*luc+*), inclus dans la séquence du plasmide, dépend donc de l'insertion et de la bonne orientation d'une région promotrice fonctionnelle en amont de ce gène. Le plasmide code également pour un gène de résistance à l'ampicilline (*Amp^r*), permettant ainsi de le multiplier dans des bactéries *E. coli* compétentes.

3.8. Digestion enzymatique du vecteur de clonage

La réaction de coupure du plasmide pGL3 Basic par les enzymes de restriction MluI et XhoI a été réalisée dans un volume total de 50 µL contenant :

- 5 µL de plasmide pGL3 Basic à 1 µg/µL (5 µg),
- 5 µL de tampon réactionnel 10X adapté pour l'activité simultanée des 2 enzymes de restriction (Buffer 3, NEB) (1X),
- 0,5 µL de BSA 100X à 10 mg/mL (1X ou 0,1 mg/mL),
- 2,5 µL d'enzyme de restriction MluI à 10 U/µL (25 U),
- 1,25 µL d'enzyme de restriction XhoI à 20 U/µL (25 U),
- 35,75 µL d'EDFA.

La réaction a été conduite en plaçant le tube pendant 3 h à 37°C dans le thermocycleur. Une étape d'inactivation des enzymes par la chaleur est ensuite réalisée pendant 20 min à 65°C. Afin d'éviter que le plasmide ainsi coupé ne se referme, une réaction de déphosphorylation des extrémités cohésives générées par les enzymes de restriction a alors été réalisée en ajoutant 0,25 µL de phosphatase alcaline intestinale de veau (Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP), Invitrogen, Cergy-Pontoise) à 20 U/µL (5 U) et 5 µL du

tampon salin nécessaire à son activité (High Salt Buffer, Invitrogen, Cergy-Pontoise). La réaction de déphosphorylation a été réalisée pendant 45 min à 37°C.

Le plasmide ainsi coupé et déphosphorylé a été purifié dans un volume final de 30 µL à l'aide du kit MinElute PCR Purification (Qiagen, Courtaboeuf), puis dosé, et sa coupure contrôlée sur gel d'agarose à 1%, selon la même méthodologie que celle décrite précédemment pour la purification des inserts de clonage.

3.9. Ligation des inserts P1'-RARβ sens et inverse au vecteur de clonage

L'intégration des inserts P1'-RARβ sens et inverse dans le plasmide pGL3 a été réalisée par réaction de ligation des extrémités cohésives complémentaires générées par les enzymes de restriction MluI et XhoI.

La réaction de ligation a été effectuée pour un rapport quantité d'inserts/quantité de plasmide de 5:1. La quantité d'insert (ng) à rajouter lors de la réaction de ligation a été calculée selon la formule :

$$\text{quantité d'insert à ajouter (ng)} = \frac{\text{quantité de plasmide (ng)} \times \text{taille de l'insert (pb)} \times 5}{\text{taille du plasmide (pb)} \times 1}$$

soit pour une quantité initiale de 100 ng de plasmide pGL3 :

$$\frac{100 \times 1434}{4818} \times \frac{5}{1} = 149,375 \text{ ng d'insert à ajouter.}$$

La réaction de ligation a été conduite, dans un volume final de 20 µL, à l'aide de l'enzyme T4 DNA Ligase (New England Biolab, Saint-Quentin en Yvelines). Le milieu réactionnel utilisé est le suivant :

- 1 µL de vecteur à 100 ng/µL (100 ng),
- 3 µL d'insert P1' sens ou inverse à 50 ng/µL (150 ng),
- 4 µL de tampon réactionnel 5X (1X),
- 11 µL d'EDFA,
- 1 µL de T4 DNA Ligase à 400 U NEB/µL soit 6 U Weiss (1U NEB = 0,015 U Weiss).

Afin de favoriser la ligation, le plasmide et l'insert ont d'abord été mélangés dans l'EDFA puis le mélange a été chauffé pendant 5 min à 65°C avant d'ajouter les autres réactifs. La réaction de ligation a ensuite été conduite en plaçant les tubes pendant 2 h à température ambiante puis pendant une nuit à 16°C dans le thermocycleur. Un contrôle positif de la réaction de ligation, contenant uniquement le vecteur et pas d'insert dans son milieu réactionnel, a été réalisé afin de vérifier l'action de l'enzyme.

3.10. Transformation des bactéries

Les bactéries utilisées pour la transformation sont des bactéries *E.Coli* chimiocompétentes de type DH5 α (One Shot TOP10 Competent Cells, Invitrogen, Cergy-Pontoise).

Les tubes contenant les réactions de ligation ont été centrifugés puis placés sur glace. Un tube de bactéries chimiocompétentes (50 μ L) a été mis à décongeler sur glace pour chaque réaction de ligation. 1,5 μ L de chaque milieu réactionnel de ligation a ensuite été déposé dans un tube de bactéries décongelées.

Un contrôle négatif (tube de bactéries décongelées sans ajout de milieu réactionnel de ligation) et un contrôle positif (ajout d'1 μ L (10 pg) de plasmide contrôle pUC19, inclus dans le kit de transformation) ont également été préparés.

Les différents mélanges ont alors été homogénéisés en tapant très doucement le fond des tubes de transformation sur un support dur. Ils ont ensuite été laissés 30 min sur glace puis déposés pendant 30 s dans un bain-marie préalablement réglé à une température de 42°C, afin de procéder au choc thermique permettant l'entrée du plasmide dans les bactéries.

Les tubes ont alors été replacés pendant 2 min sur glace et 250 μ L de milieu SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression, Invitrogen, Cergy-Pontoise : 2% p/v bactotryptone, 0,5% p/v extrait de levure, 0,05% p/v NaCl, 2,5 mM KCl, pH=7) préchauffé à 37°C ont ensuite été ajoutés en condition stérile, à l'aide de la flamme d'un bec Bunsen.

Les mélanges ont été homogénéisés par inversion/retournement des tubes de transformation puis placés sous agitation dans un incubateur à 225 rpm pendant 1 h à 37°C.

3.11. Sélection des bactéries transformées

30 µL de mélange provenant de chaque tube de transformation ont ensuite été étalés, en conditions stériles, à l'aide d'une pipette Pasteur, sur boîtes de Pétri, préchauffées pendant 1 h à 37°C, et contenant chacune 15 mL de milieu Lysogeny-Broth (LB) solide ou milieu LB-Agar (1% p/v bactotryptone, 0,5% p/v extrait de levure, 1% p/v NaCl, 1,5% p/v agar-agar dans 1 L d'eau déminéralisée ultra-pure, pH=7,5 ; autoclavé pendant 20 min à 120°C).

Avant son dépôt sur boîte de Pétri et sa solidification, 50 µg/mL d'ampicilline ont été ajoutés au milieu LB-Agar autoclavé afin de procéder à la sélection des bactéries transformées par le plasmide pGL3 qui expriment le gène de résistance à l'ampicilline (*Amp^r*).

Après étalement des différents milieux de transformation bactérienne, les boîtes de Pétri obtenues ont été incubées, couvercles vers le bas, pendant 24h à 48h à 37°C.

3.12. Repiquage des bactéries transformées

Après incubation, les colonies bactériennes formées dans les différentes boîtes de Pétri ont été observées. Une colonie bactérienne a l'aspect d'une petite bulle de couleur blanchâtre formée à la surface du milieu LB-Agar.

L'efficacité de la transformation bactérienne a été calculée en dénombrant le nombre de colonies présentes dans la boîte de Pétri servant de contrôle positif, sur laquelle ont été étalées les bactéries transformées par le plasmide pUC19, en utilisant la formule suivante :

		volume total de transformation :		
<u>nbre de colonies</u> 10 pg d'ADN transformé	x $\frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}}$	x $\frac{300 \mu\text{L}}{30 \mu\text{L étalés}}$	=	<u>nbre de transformants (cfu)</u> µg de plasmide

L'efficacité de transformation escomptée pour le plasmide pUC19 est de l'ordre de 1.10⁹ transformants (ou cfu pour « Colony Forming Units ») par µg de plasmide.

Aucune colonie bactérienne n'a été observée dans la boîte de Pétri servant de contrôle négatif, sur laquelle ont été étalées les bactéries n'ayant été transformées par aucun plasmide, signifiant ainsi l'absence de contamination des boîtes de Pétri et l'absence de bactéries non transformées résistantes à l'ampicilline.

Dans les autres boîtes de Pétri, sur lesquelles ont été étalées les bactéries transformées par le plasmide pGL3 ayant intégré l'insert P1'-RAR β sens ou inverse, plusieurs colonies bactériennes (clones) sont observées. Ces colonies se retrouvent généralement à proximité les unes des autres. On choisit de façon préférentielle des colonies isolées pour le repiquage (plus de chances de repiquer un seul et unique clone).

Une fois les colonies adéquates ainsi identifiées, 5 d'entre elles issues de chaque boîte, ont été repiquées en conditions stériles sous la flamme d'un bec Bunsen. Chaque colonie a été prélevée par effleurement de la surface de la boîte de Pétri à l'aide d'un cône de pipette, puis repiquée en trempant le cône dans un tube de culture bactérienne de 15 mL contenant 10 mL de milieu LB liquide (1% p/v bactotryptone, 0,5% p/v extrait de levure, 1% p/v NaCl, 1,5% dans 1 L d'eau déminéralisée ultra-pure, pH=7,5 ; autoclavé pendant 20 min à 120°C), additionnés de 50 μ g/mL d'ampicilline, afin de permettre à chaque colonie bactérienne ainsi prélevée de se développer plus largement.

Une seule colonie a ainsi été repiquée par tube de 5 mL. Les tubes ont ensuite été fermés à l'aide d'un bouchon à vis puis placés sous agitation à 225 rpm dans un incubateur à 37°C. Après 24 h à 48 h d'incubation, la croissance des bactéries dans le milieu LB se caractérise par une coloration trouble du milieu.

3.13. Analyse des bactéries repiquées

Afin de vérifier que les bactéries ainsi repiquées contiennent bien le plasmide pGL3 d'intérêt dans lequel est inclus l'insert P1'-RAR β sens ou inverse, l'ADN extrait des bactéries à d'abord été analysé directement par PCR en utilisant les amorces RVprimer3 et GLprimer2 encadrant le site de clonage du plasmide dans lequel l'insert a été intégré.

50 à 100 μ L de milieu LB ont été prélevés à partir de chaque tube de bactéries et placés dans des tube de 0,2 mL qui ont alors été centrifugés à 8000 rpm pendant 1 min, puis les surnageants ont été éliminés. Les culots de bactéries obtenus ont alors été lavés à 2 reprises dans 30 μ L d'EDFA en centrifugeant les tubes 1 min à 8000 rpm. Les culots ont ensuite été remis en suspension à la pipette dans 5 μ L d'EDFA.

Les culots d'ADN bactérien ainsi obtenus ont été directement analysés par PCR en utilisant les amorces RVprimer3 et GLprimer2, selon le même milieu réactionnel et le même protocole thermique que celui décrit précédemment (Cf. [C.1.2.](#)). Les milieux réactionnels de PCR ont ensuite été analysés par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1% comme indiqué précédemment (Cf. [C.1.2.](#)).

3.14. Purification des plasmides P1'-RAR β sens et inverse (Miniprep)

Après avoir vérifié que les bactéries repiquées contenaient bien les plasmides pGL3 d'intérêt, les plasmides ainsi multipliés ont été extraits des bactéries par miniprep à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Courtaboeuf).

Les tubes de bactéries ont dans un premier temps été centrifugés pendant 10 min à 5000 rpm et les surnageants éliminés. Les culots obtenus ont alors été repris dans 250 μ L de tampon de resuspension P1, préalablement additionné de RNase A afin d'éliminer les ARNs bactériens et du réactif LyseBLue (0,001X), inclus dans le kit, permettant de contrôler visuellement la lyse bactérienne par changement de coloration du milieu d'extraction.

Les mélanges obtenus ont alors été transférés dans des tubes de 1,5 mL et additionnés de 250 μ L de tampon de lyse P2 (NaOH : permettant la dénaturation de l'ADN plasmidique et chromosomique bactérien ainsi que des protéines, SDS : permettant la lyse des bactéries par solubilisation des protéines et des phospholipides membranaires).

Après addition du tampon P2 au tampon P1, la couleur du milieu réactionnel vire au bleu. Les suspensions ont alors été mélangées par retournement des tubes jusqu'à obtention d'une coloration bleue homogène.

350 μ L de tampon de neutralisation N3 (High Salt Binding Conditions : guanidine hydrochloride, acide acétique) ont été ajoutés dans chaque suspension qui a ensuite été immédiatement homogénéisée par retournement du tube. La coloration bleue des suspensions disparaît et des précipités blancs apparaissent, signifiant ainsi la précipitation du SDS contenu dans le tampon de lyse, et entraînant les débris cellulaires, les protéines dénaturées et l'ADN chromosomique bactérien renaturé.

Les tubes ont alors été centrifugés 10 min à 13000 rpm et les surnageants, contenant l'ADN plasmidique, ont été transférés sur les colonnes de purification incluses dans le kit. Les colonnes ont ensuite été centrifugées 1 min à 3000 rpm et les éluats éliminés. Afin d'éliminer toutes traces de nucléases, l'ADN plasmidique, lié à la membrane de chaque colonne grâce au tampon N3, a alors été lavé en déposant 500 μ L de tampon PB puis en centrifugeant les colonnes 1 min à 3000 rpm.

Les éluats ont été éliminés puis l'ADN plasmidique a été lavé par ajout de 750 μ L de tampon éthanol PE puis en centrifugeant les colonnes 1 min à 3000 rpm. Après avoir éliminé les éluats, les colonnes ont été centrifugées une nouvelle fois à vide pendant 1 min afin d'éliminer l'excès d'éthanol résiduel.

Après 1 min d'adsorption, les ADN plasmidiques ont finalement été élués dans 50 μ L de tampon d'éluion EB par centrifugation des colonnes pendant 1 min à 13000 rpm. Les

éluats ont alors été dosés et les ADN plasmidiques extraits contrôlés par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1%, comme indiqué précédemment (Cf. [C.1.2.](#)).

3.15. Séquençage des plasmides P1'-RAR β sens et inverse

Après la purification des plasmides P1'-RAR β sens et inverse, les séquences de ces derniers ont été vérifiées à l'aide d'un appareil de séquençage ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) au service de Biologie Moléculaire du CHU de Brabois (Dr. Nathalie Monhoven).

Les inserts P1'-RAR β ont dans un premier temps été amplifiés par PCR en utilisant l'ADN plasmidique précédemment extrait et les amorces RVprimer3 et GLprimer2 encadrant les inserts ([Figure 36](#)). Le milieu réactionnel et le protocole de PCR utilisés sont les mêmes que ceux décrits précédemment (Cf. [C.1.2.](#)).

Les amplicons contenus dans les milieux réactionnels de PCR ainsi obtenus ont ensuite été purifiés, puis dosés et contrôlés selon la même méthode que celle décrite précédemment (Cf. [C.1.2.](#)).

Les amplicons P1'-RAR β sens et inverse ainsi purifiés ont été utilisés pour produire les amplicons de PCR marqués destinés au séquençage à l'aide du kit BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

L'amplification des produits marqués à séquencer a été réalisée dans un volume final de 20 μ L à raison d'une réaction de PCR par amplicon précédemment purifié.

L'amorce de PCR utilisée pour produire chaque amplicon marqué est l'amorce sens issue du couple d'amorces utilisé précédemment pour l'amplification de chaque insert à partir de l'ADN de CEBHD (Cf. [C.3.2.](#)).

Le milieu réactionnel utilisé est le suivant :

- 3 μL de Sequencing Buffer 5X (1X),
- 2 μL de Terminator Ready Reaction Mix,
- 3,2 pmoles d'amorces (soit 0,32 μL d'amorces à 10 pmol/ μL),
- le volume correspondant à 40 ng d'amplicons de PCR purifiés,
- qsp 20 μl d'EDFA.

Un contrôle positif de la réaction a été réalisé en simultané en utilisant 1 μL du plasmide pGEM@3Zf(+) et 2 μL d'amorces -21 M13 à 0,8 pmol/ μL inclus dans le kit de séquençage.

Les réactifs ont été mélangés à la pipette et les tubes centrifugés puis placés dans un thermocycleur en suivant le protocole thermique suivant :

- 96°C → 1 min
 - 96°C → 10 s
 - 50°C → 5 s
 - 60°C → 4 min
 - 4°C
- } 25 cycles

À la fin des réactions, les différents tubes ont été centrifugés puis les amplicons marqués ainsi générés ont été purifiés par précipitation éthanol/EDTA afin d'éliminer toutes traces de dNTPs marqués non incorporés qui pourraient nuire à la réaction de séquençage.

Pour chaque échantillon à purifier, 5 μL d'une solution d'EDTA à 125 mM, puis 60 μL d'éthanol à 96% ont été successivement ajoutés et mélangés au milieu réactionnel. Les tubes ont alors été fermés et recouverts d'aluminium, afin qu'ils ne soient pas exposés à la lumière (dégradation des dNTPs marqués), puis placés 15 min à température ambiante.

Ils ont ensuite été centrifugés pendant 30 min à 4°C et à 6500 rpm afin de précipiter les amplicons marqués. Les surnageants contenant les dNTPs non incorporés ont été éliminés puis 150 µL d'éthanol à 70% ont été ajoutés dans chaque tube afin de laver le culot obtenu.

Les tubes ont ensuite été centrifugés à 4°C pendant 15 min à 5000 rpm puis les surnageants ont été retirés et les culots d'amplicons marqués présents au fond de chaque tube ont alors été séchés à l'obscurité.

Une fois secs, les tubes ont été transférés, le jour même, au service de Biologie Moléculaire du CHU de Brabois afin de procéder au séquençage des amplicons générés à partir des inserts contenus dans les plasmides.

4. ANALYSE *in vitro* DE L'ACTIVITÉ DE LA RÉGION PROMOTRICE POTENTIELLE P1'-RARβ

4.1. Culture cellulaire

Les cellules utilisées pour la transfection des plasmides pGL3 P1'-RARβ sens et inverse proviennent de la lignée de cellules bronchiques humaines transformées BEAS-2B [CRL-9609] ainsi que de la lignée d'ADC mammaire MDA-MB-231 [HTB-26]. Ces cellules ont été cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (Cf. [A.7](#)).

Arrivées à confluence, les cellules ont d'abord été lavées dans 5 mL de tampon phosphate salin (PBS) 1X, puis elles ont été décollées du fond de leur boîte et remises en suspension par ajout de 3 mL d'une solution de Trypsine-EDTA à 0,25% (Gibco BRL Life Technologies, Cergy-Pontoise).

Les cellules ainsi dissociées ont ensuite été transférées dans des tubes Falcon de 15 mL contenant 7 mL de milieu complet RPMI-1640 afin d'inhiber l'action de la trypsine. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 5 min à 1500 rpm et les surnageants éliminés. Les culots cellulaires ont alors été repris dans 3 mL de milieu RPMI-1640.

Le nombre de cellules viables a ensuite été estimé sous microscope inversé (Nikon, Diaphot), à l'aide d'un hématimètre de Thomas, en diluant 10 μ L de chaque suspension cellulaire dans 10 μ L d'une solution aqueuse (0,1X) de bleu Trypan. Les concentrations cellulaires ont été ajustées à 10^5 cellules/mL par resuspension des culots de cellulaires dans du milieu complet RPMI-1640.

Les cellules ont été repiquées 24 h avant transfection de façon à obtenir une confluence cellulaire optimale de l'ordre de 50-60% le jour de la transfection. Pour cela, les puits d'une plaque de culture à 96 puits (Nunc, Polylabo, Strasbourg) ont étéensemencés à raison de $1,5 \cdot 10^4$ cellules/puits dans 0,15 mL de milieu RPMI-1640.

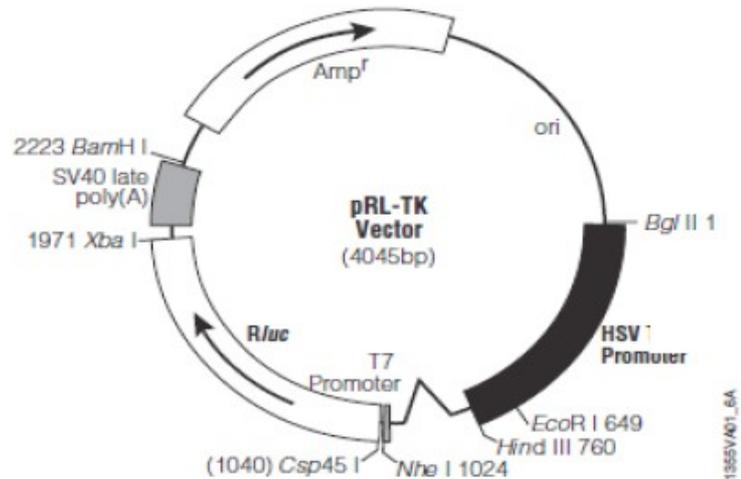
2 plaques de culture à 96 puits ont ainsi été préparées pour chaque lignée de cellules. Les plaques de culture ont ensuite été placées pendant 24 h dans un incubateur à CO₂ avant de procéder à la transfection des plasmides.

4.2. Transfection cellulaire

Les plasmides pGL3 contenant les inserts P1'-RAR β sens et inverse et qui codent pour le gène modifié de la firefly luciférase (*luc+*) ont été co-transfectés avec le plasmide contrôle pRL-TK ([Figure 37](#)).

Ce plasmide, d'une taille de 4045 pb, contient dans sa séquence le gène reporter de la *Renilla* luciférase (*Rluc*) ainsi qu'en amont de ce gène un promoteur de type TK-HSV (promoteur Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase) permettant ainsi une expression constitutive du gène *Rluc* dans les cellules transfectées.

La co-transfection des plasmides pGL3 et pRL-TK dans les cellules permet de normaliser la fluorescence firefly luciférase (*luc+*) observée et ainsi de mesurer l'activité promotrice potentielle de la région P1'-RAR β .



HSV-TK promoter	7-759
Chimeric intron	826-962
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +2)	1006-1024
T7 RNA polymerase transcription initiation site	1023
<i>Rluc</i> reporter gene	1034-1969
SV40 late polyadenylation signal	2011-2212
β -lactamase (Amp^r) coding region	2359-3219

Note: -^-, position of intron; *Rluc*, cDNA encoding the *Renilla* luciferase enzyme; Amp^r , gene conferring ampicillin resistance in *E. coli*; ori, origin of plasmid replication in *E. coli*. Arrows within the *Rluc* and Amp^r gene indicate the direction of transcription.

Figure 37. Description du plasmide contrôle : le plasmide pRL-TK.
(Source : <http://www.promega.com>)

La transfection des plasmides dans les cellules BEAS-2B et MDA-MB-231 est effectuée à l'aide du réactif jetPEI (Polyplus Transfection, Strasbourg).

Ce réactif (Figure 38) est un polymère cationique de polyéthylènimine qui compacte l'ADN en particules chargées positivement capables d'interagir avec les protéoglycanes négatifs de la membrane cellulaire et d'entrer dans le cytoplasme par endocytose.

Le jetPEI tamponne le pH de l'endosome et empêche ainsi la dégradation de l'ADN qu'il contient. Agissant comme une éponge à protons, il induit l'augmentation de la pression osmotique de l'endosome et conduit à sa rupture, permettant ainsi la libération de l'ADN plasmidique dans le cytoplasme des cellules transfectées.

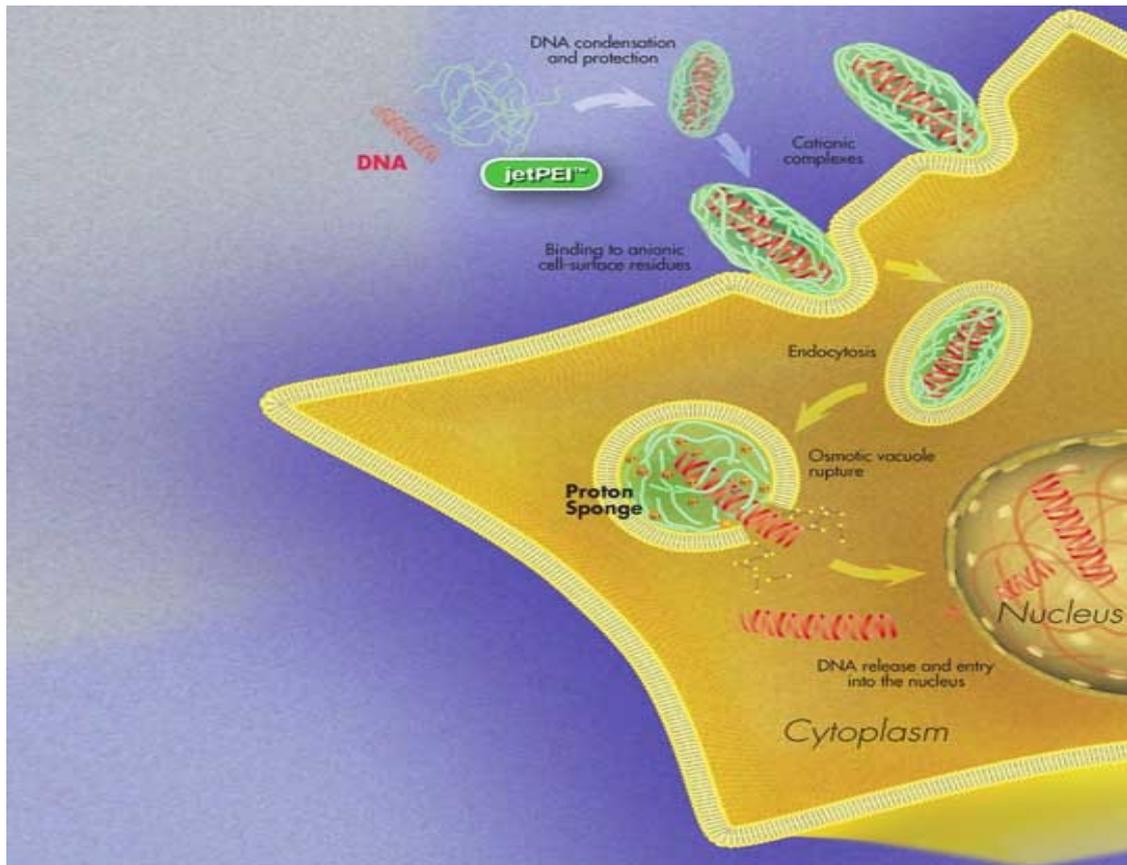


Figure 38. Représentation schématique du mode d'action du réactif de transfection jetPEI.
(Source : <http://www.polyplus-transfection.com>)

Pour les transfections, les quantités de plasmide et de jetPEI ont été ajustées de façon à obtenir un rapport N/P=5 (0,5 µL de jetPEI pour 0,25 µg d'ADN plasmidique transfecté).

Ce rapport quantifie le nombre des résidus azotés (N) contenus dans le jetPEI par rapport au nombre de résidus phosphates (P) de l'ADN et permet d'optimiser les conditions de transfection en fonction du type de cellules et d'acides nucléiques (ADN, plasmides ou siARNs) utilisés.

2 tubes de 0,2 mL ont été préparés en triplicats pour chaque condition de transfection et pour chaque plaque à 96 puits utilisée ([Figure 39](#)) :

- le tube #1 contient l'équivalent de 250 ng d'ADN plasmidique auquel ont été ajoutés 10 µL d'une solution de NaCl à 150 mM,

- le tube #2 contient 0,5 µL de jetPEI auquel ont été ajoutés 10 µL de la solution de NaCl à 150 mM.

Les 2 tubes ont ensuite été centrifugés et vortexés pendant 10 s puis le contenu du tube #2 a été transféré dans le tube #1. Les mélanges ont alors été vortexés 15 s et incubés pendant 30 min à température ambiante. Pendant ce temps, le milieu de culture des cellules a été renouvelé par 0,15 mL de milieu RPMI-1640 frais pour la culture.

Après incubation, les complexes de transfection ainsi formés ont été ajoutés goutte-à-goutte dans chaque puits, les contenus des puits ont été homogénéisés et les plaques de culture ont alors été placées dans l'incubateur.

2 plaques de culture 96 puits ont ainsi été préparées pour chaque lignée cellulaire transfectée : une plaque utilisée pour la transfection des cellules pendant 24 h et l'autre pendant 48 h.

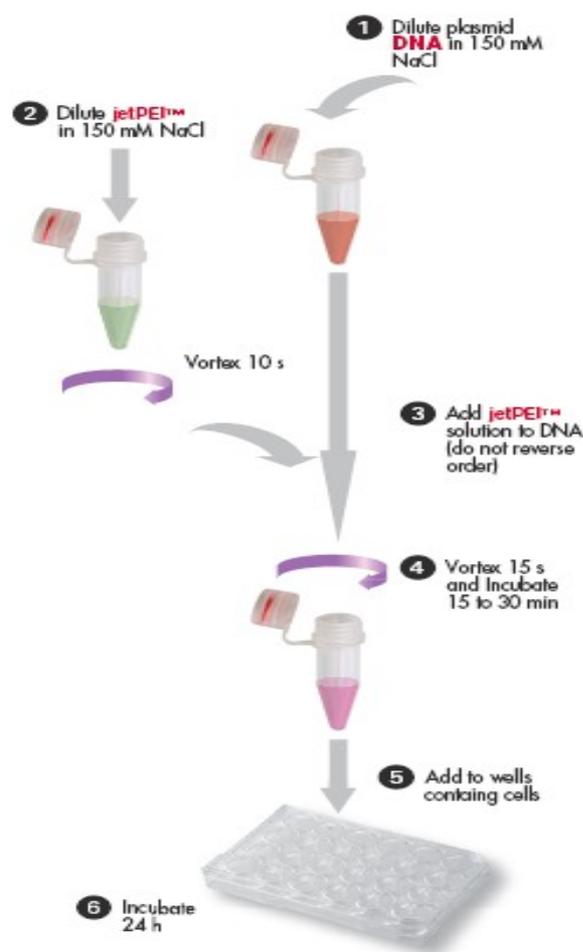


Figure 39. Représentation schématique du protocole expérimental utilisé pour la transfection cellulaire.

(Source : <http://www.polyplus-transfection.com>)

Pour chaque lignée cellulaire, 8 conditions de transfection ont été testées simultanément et en triplicats :

- cellules non transfectées : utilisées pour la mesure des bruits de fond de fluorescence,
- un contrôle négatif : cellules transfectées uniquement avec le réactif de transfection (pas de plasmide) afin de mesurer la toxicité potentielle de l'agent de transfection sur les cellules,
- un contrôle positif pGL3 Basic + pRL-TK 1:1 : cellules co-transfectées par 250 ng d'un mélange des 2 plasmides avec un rapport 1:1 des nombres respectifs de molécules de chaque plasmide,
- un contrôle positif pGL3 Basic + pRL-TK 10:1 : cellules co-transfectées par 250 ng d'un mélange des 2 plasmides avec un rapport 10:1 des nombres respectifs de molécules de chaque plasmide,
- co-transfection de 250 ng d'un mélange du plasmide pGL3+P1'-RAR β sens et du plasmide pRL-TK : avec un rapport 1:1 des nombres respectifs de molécules de chaque plasmide,
- co-transfection de 250 ng d'un mélange du plasmide pGL3+P1'-RAR β sens et du plasmide pRL-TK : avec un rapport 10:1 des nombres respectifs de molécules de chaque plasmide,
- co-transfection de 250 ng d'un mélange du plasmide pGL3+P1'-RAR β inverse et du plasmide pRL-TK : avec un rapport 1:1 des nombres respectifs de molécules de chaque plasmide,
- co-transfection de 250 ng d'un mélange du plasmide pGL3+P1'-RAR β inverse et du plasmide pRL-TK : avec un rapport 10:1 des nombres respectifs de molécules de chaque plasmide.

Les calculs des quantités de plasmides à ajouter ont été réalisés en fonction de leurs tailles et de leurs concentrations. La taille du plasmide pRL-TK est de 4045 pb, celle du plasmide pGL3 Basic est de 4818 pb, et celle des plasmides pGL3 contenant les inserts P1' est de : $4807 + 1424 = 6231$ pb.

Les formules utilisées pour les calculs sont les suivantes :

$\text{taille du plasmide (pb)} \times (325 \text{ Daltons} \times 2 \text{ nucléotides/pb}) = \text{poids du plasmide en Da}$ <p style="text-align: right;">[g/mol]</p>

$\frac{1}{\text{poids du plasmide en Da [g/mol]}} = \text{nombre de moles de plasmide par g d'échantillon d'ADN plasmidique [mol/g]}$

$\frac{\text{nombre d'Avogadro } (=6,022 \cdot 10^{23}) \text{ [molécules/mol]}}{\text{poids du plasmide en Da [g/mol]}} = \text{nombre de molécules de plasmide par g d'échantillon d'ADN [molécules/g]}$
--

$\frac{\text{quantité d'échantillon [ng]} \times 6,022 \cdot 10^{23} \text{ [molécules/mol]}}{\text{taille du plasmide (pb)} \times 650 \text{ [g/mol]} \times 1 \cdot 10^9 \text{ [ng/g]}} = \text{nombre de copies [molécules] de plasmide dans l'échantillon}$

À titre d'exemple, la démarche suivante a été utilisée pour calculer les quantités d'ADN plasmidiques pGL3+P1'-RARβ sens (à 640 ng/μL) et pRL-TK (à 370 ng/μL) à mélanger pour obtenir au final 250 ng d'ADN plasmidique avec un rapport 1:1 des nombres respectifs de molécules de chaque plasmide :

1) Nombre de molécules de plasmide pGL3+P1'-RARβ sens par g d'échantillon d'ADN plasmidique :

$$\frac{6,022 \cdot 10^{23}}{(6231 \text{ pb} \times 650)} = 1,49 \cdot 10^{17} \text{ molécules/g,}$$

2) Nombre de molécules de plasmide pRL-TK par g d'échantillon d'ADN plasmidique :

$$\frac{6,022 \cdot 10^{23}}{(4045 \text{ pb} \times 650)} = 2,29 \cdot 10^{17} \text{ molécules/g,}$$

3) Rapport du nombre de molécules de plasmide pRL-TK par rapport au nombre de molécules de plasmide pGL3+P1'-RARβ sens présentes dans 1 g d'échantillon d'ADN plasmidique :

$$2,29 \cdot 10^{17} / 1,49 \cdot 10^{17} = 1,54$$

→ il faut donc 1,54 g d'ADN plasmidique pGL3+P1'-RARβ sens pour obtenir le même nombre de molécules que dans 1 g d'ADN plasmidique pRL-TK,

4) Pour une quantité finale de 250 ng d'ADN plasmidique on a donc :

$$\text{quantité de plasmide pGL3+P1'-RAR}\beta \text{ sens (x) + quantité de plasmide pRL-TK (y) = 250,}$$

$$\text{avec } x = 1,54y \rightarrow \text{soit : } y + 1,54y = 250, \text{ ou encore } y(1 + 1,54) = 250,$$

d'où $y = 250/2,54 = 98,4$ ng ($2,25 \cdot 10^{10}$ copies) de plasmide pRL-TK à ajouter, soit environ 0,27 μL de solution plasmidique pRL-TK à 370 ng/ μL

et $x = 250 - y = 250 - 98,4 = 151,6$ ng ($2,25 \cdot 10^{10}$ copies) de plasmide pGL3+P1'-RAR β sens à ajouter, soit environ 0,24 μL de solution plasmidique pGL3+P1'-RAR β sens à 640 ng/ μL .

4.3. Analyse de l'activité de la région promotrice potentielle P1'-RAR β

L'analyse de l'activité promotrice de la région P1'-RAR β dans les cellules BEAS-2B et MDA-MB-231 transfectées a été conduite par normalisation des niveaux de fluorescence firefly luciferase (pGL3) par rapport aux niveaux de fluorescence *Renilla* luciferase (pRL-TK) observés dans les différents puits des plaques de culture précédemment préparées.

Les mesures de fluorescence ont été réalisées après 24 h ou 48 h de transfection à l'aide d'un lecteur de plaque Victor³ (PerkinElmer, Courtaboeuf) et en utilisant le réactif Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, Charbonnières-les-bains) ([Figure 40](#)).

Dual-Glo™ Luciferase Assay:

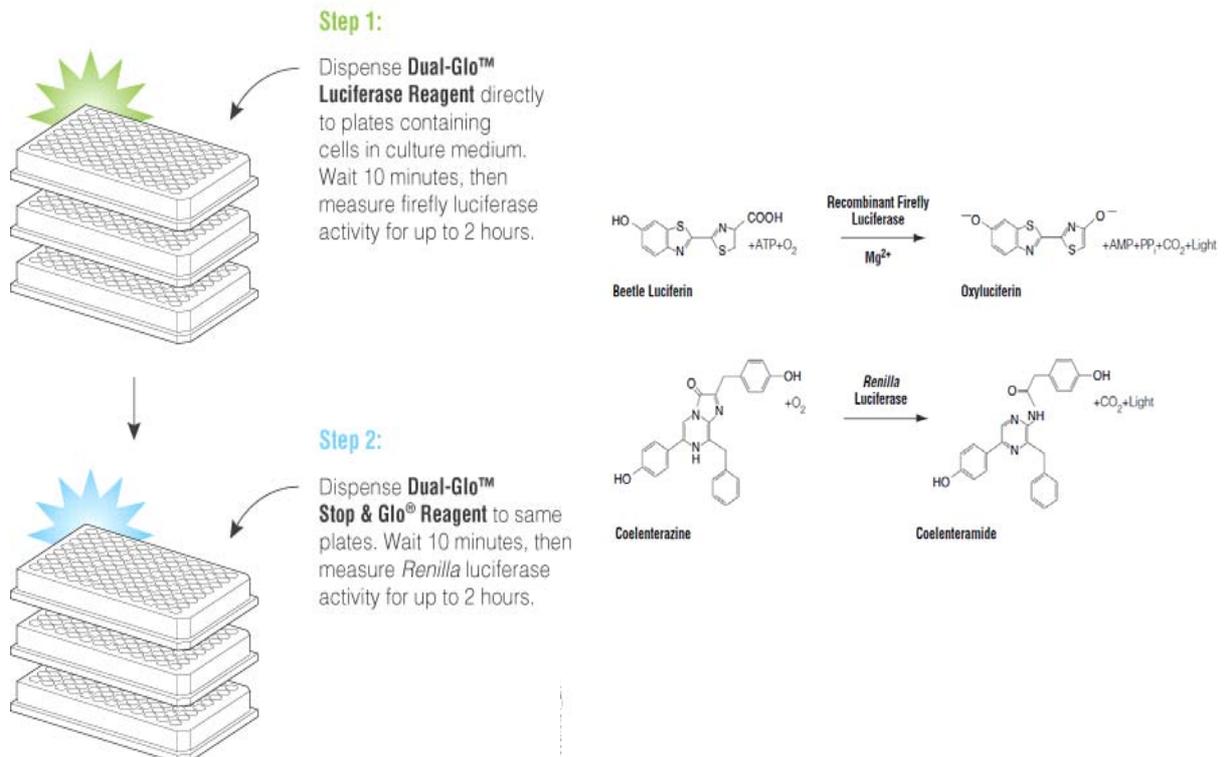


Figure 40. Représentation schématique du protocole expérimental utilisé pour la révélation des fluorescences firefly et *Renilla* luciferase.

(Source : <http://www.promega.com>)

Les plaques de culture à 96 puits ont été sorties de l'incubateur puis 0,15 mL de Dual-Glo Luciferase Reagent, précédemment équilibré à température ambiante, ont été ajoutés et mélangés dans chaque puits de cellules transfectées.

Ce réactif induit la lyse des cellules et il est utilisé comme substrat par la firefly luciférase, produisant ainsi un signal lumineux. Après 20 min à température ambiante, les niveaux de fluorescence firefly luciférase ont été mesurés dans chacun des puits par le lecteur de plaque.

Après cette première mesure de fluorescence, 0,15 mL de Dual-Glo Stop & Glo Reagent ont été ajoutés et mélangés dans chaque puits. L'addition de ce réactif inhibe la fluorescence de la firefly luciférase et contient le substrat de la *Renilla* luciférase, induisant ainsi son signal lumineux spécifique. Après 20 min à température ambiante, les niveaux de fluorescence *Renilla* luciférase ont été mesurés dans chacun des puits à l'aide du lecteur de plaque.

Pour assurer une précision maximale des résultats, les mesures de fluorescence firefly et *Renilla* ainsi réalisées pour chacun des puits ont d'abord été corrigées par soustraction des bruits de fond de fluorescence (« background ») mesurés à partir des triplicats de cellules non transfectées de chaque plaque et traitées avec les mêmes réactifs.

Les ratios de fluorescence firefly luciférase / *Renilla* luciférase ont alors été calculés pour chacun des puits. Les ratios obtenus pour les différentes conditions de transfection des plasmides pGL3+P1'RAR β sens et inverse (quantités de 1:1 ou de 10:1 par rapport au plasmide pRL-TK) ont alors été normalisés par la moyenne des ratios calculés pour les triplicats de puits utilisés comme contrôles positifs (pGL3 Basic + pRL-TK 1:1 ou pGL3 Basic + pRL-TK 10:1).

D. ÉTUDE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE NUCLÉAIRE DE RAR β

Les expériences de Western Blot et d'Immunoprécipitation utilisant le nouvel anticorps RAR β ont été réalisées en collaboration avec Stéphanie Lacomme et Lydia Brochin du Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nancy, sous la direction du Pr. Jean-Michel Vignaud et du Dr. Nadine Martinet.

1. DESSIN DE L'ANTICORPS RAR β

La banque de données UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.expasy.ch/sprot/>) a été consultée afin de récupérer les séquences des différentes protéines encodées par le gène RAR β : RAR β 2 [Swiss-Prot:P10826-2], RAR β 4 [Swiss-Prot:P10826-3] et RAR β 1 [Swiss-Prot:P10826-1].

Les différentes séquences ainsi obtenues ont ensuite été alignées à l'aide du programme ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) afin de retenir une séquence en acides aminés commune à toutes les protéines RAR β . La spécificité de cette séquence commune a été vérifiée par alignement local en interrogeant en ligne les programmes BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) et BLAST (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/blastall/index.html>).

La séquence de 20 acides aminés suivante : GHEPLTPSSSGNTAEHSPSI, correspondant à la région protéique F2, commune à toutes les protéines RAR β , a alors été choisie afin d'immuniser des lapins et de purifier l'anticorps polyclonal ainsi généré par chromatographie d'affinité (Proteogenix, Strasbourg).

2. EXTRACTION DES PROTÉINES NUCLÉAIRES

2.1. Principe

L'extraction différentielle des protéines cytosoliques et nucléaires est réalisée à l'aide de solutions tampon, d'osmolarités différentes, permettant la rupture sélective des membranes cellulaires ou nucléaires. L'utilisation de ces tampons est combinée avec celle d'un homogénéiseur de type Dounce et de pistons de différents diamètres.

Le tampon C est un tampon de lyse de faible osmolarité qui, combiné à l'utilisation du piston de plus petit diamètre, permet de rompre sélectivement les membranes cellulaires en préservant l'intégrité des noyaux. Le recours au tampon N, de plus forte osmolarité, combiné à l'utilisation du piston de plus gros diamètre, permet quant-à lui de procéder à la rupture des membranes nucléaires.

Les différentes protéines RAR β décrites ayant des tailles comprises entre 37 et 52 kDa, une étape de filtration des fractions de protéines nucléaires extraites est réalisée; permettant ainsi d'éliminer les petites protéines (dont la taille est inférieure à 30 kDa) afin de diminuer les bruits de fond observés lors des expériences de western-blot.

2.2. Méthode

L'extraction des protéines nucléaires est réalisée à partir des échantillons de CEBHD et de cellules BEAS-2B. Ces cellules ont été cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² (Nunc EasY Flask, Polylabo, Strasbourg), comme indiqué précédemment (Cf. [A.7.](#)). Arrivées à confluence cellulaire, les milieux de culture ont été retirés et les différentes boîtes de cellules ainsi obtenues ont été conservées à -20°C.

Toutes les manipulations réalisées lors de l'extraction des protéines ont été effectuées sur glace à 4°C. La composition des tampons utilisés est détaillée ci-après.

- Tampon C (tampon low-salt)

Solutions stocks	Concentration finale
Tris-HCl 2M pH8	10 mM
KCl 3M	20 mM
EDTA 0,5M pH8	1,5 mM
Cocktail d'inhibiteurs 500X	1X
PMSF 0,1 M	1 mM
MgCl ₂ 1 M	1 mM
Glycérol 99%	10%
H ₂ O qsp 10 mL	

- Tampon N (tampon high-salt)

Solutions stocks	Concentration finale
Tris HCl 2M pH8	10 mM
KCl 3M	0,5 M
EDTA 0,5M pH8	1,5 mM
Cocktail d'inhibiteurs 500X	1X
PMSF 0,1 M	1 mM
H ₂ O qsp 10 mL	

8 boîtes de culture de 75 cm² ont été utilisées pour chaque type de cellules. Les cellules ont d'abord été lavées à 2 reprises dans 2 mL de tampon PBS 1X froid, puis elles ont été grattées à l'aide d'une spatule en caoutchouc et regroupées par type cellulaire dans des tubes Falcon de 15 mL, contenant chacun 6 mL de tampon C. Les cellules ont ensuite été broyées en utilisant le piston de plus petit diamètre de l'homogénéiseur de Dounce (Dominique Dutscher SAS, Brumath).

Les broyats cellulaires ont ensuite été transférés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL, et placés sur glace pendant 5 min. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 5 min à 4000 rpm et 4°C. Les surnageants obtenus, qui contiennent les protéines cytosoliques, ont alors été regroupés et conservés sur glace.

Les différents culots cellulaires obtenus ont chacun été remis en suspension dans 1 mL de tampon N, puis regroupés et broyés à l'aide du gros piston de l'homogénéiseur de Dounce. Les broyats ont alors été transférés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL, placés sur glace pendant 5 min, puis les tubes centrifugés pendant 30 min à 14000 rpm et 4°C. Les surnageants

obtenus, contenant les protéines nucléaires, ont alors été prélevés, regroupés et placés sur glace à 4°C.

Les solutions de protéines nucléaires CEBHD et BEAS-2B ainsi obtenues ont finalement été filtrées et concentrées à l'aide de colonnes centricon YM30 (Millipore, Dominique Dutscher SAS, Brumath) dont le seuil de coupure (cut-off) est fixé à 30 kDa. Les colonnes ont été centrifugées à 4°C sous 4000 rpm jusqu'à obtention d'un volume final compris entre 50 et 100 µL.

Le dosage des quantités totales de protéines nucléaires ainsi purifiées a été réalisé au spectrophotomètre par mesure de la DO_{280nm} d'une dilution au 1/50^{ème} de chaque solution protéique et selon la relation suivante : 1 unité de DO_{280nm} mesurée représente 50 µg de protéines. Le calcul du rapport DO_{280nm}/DO_{260nm} a quant-à lui permis d'estimer la contamination en acides nucléiques des échantillons.

3. WESTERN-BLOT

3.1. Principes

Le Western-Blot est une technique qui permet de détecter une protéine spécifique contenue dans un échantillon de protéines, précédemment extrait à partir de cellules en culture ou de tissus. Les protéines sont dans un premier temps dénaturées par un détergent anionique, le Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS), qui se fixe en grande quantité sur les protéines et les charges négativement. Elles sont ensuite séparées en fonction de leurs poids moléculaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cette étape est suivie d'un transfert sur membrane et d'une mise en évidence de la protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifiques ([Figure 41](#)).

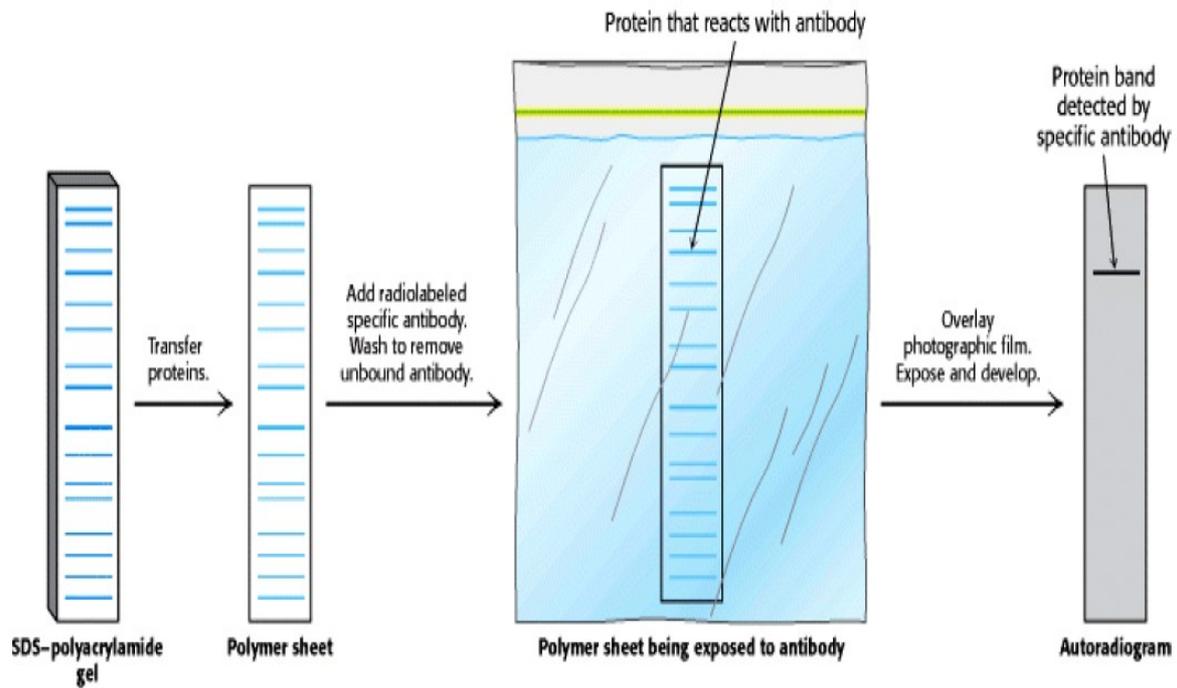


Figure 41. Représentation schématique des différentes étapes d'une expérience de Western-Blot.

(Source : <http://www2.lifl.fr/~touzet/M1/coursCorinneAbbadieM1bioinfopartie3.pdf>)

3.1.1. Préparation des échantillons

Les échantillons de protéines sont dans un premier temps bouillis dans une solution tampon (tampon de Laemmli), contenant un détergent anionique lipophile (SDS), un composant sulfhydryl (beta-mercaptoéthanol ou DTT), du tampon Tris, un colorant et du glycérol. L'ébullition permet de dénaturer les protéines par rupture des liaisons moléculaires à l'origine des structures secondaires, tertiaires et quaternaires.

Ceci permet la fixation du SDS, qui fournit alors un environnement riche en charges négatives (transformation des protéines en anions), permet de solvater les protéines et de prévenir leur précipitation. Le composant sulfhydryl contenu dans le tampon empêche la reformation des ponts disulfure et le glycérol augmente la densité de l'échantillon afin de permettre son dépôt sur gel de polyacrylamide.

3.1.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Elle permet de séparer des protéines selon leur poids moléculaire. La matrice est créée par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide. La grosseur des pores formés est fonction de la concentration en acrylamide. Plus la concentration est élevée, plus les pores seront petits et les molécules les mieux séparées seront celles de petit poids moléculaire.

Dans un gel dénaturant, on retrouve du SDS qui se lie aux protéines selon un ratio constant (1 molécule de SDS pour 2 acides aminés). L'application d'un courant électrique permet la migration des protéines dans la matrice. Comme toutes les protéines possèdent une charge négative, la séparation s'effectue alors uniquement en fonction de leur poids moléculaire.

3.1.3. Transfert sur membrane (immunobuvardage ou immunoblot)

Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps, elles sont transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose ou de PolyFluorure de VinyliDène (PVDF). La membrane est placée face à face avec le gel et un courant électrique est appliqué aux grandes plaques sur l'un des deux côtés. Les protéines chargées migrent alors depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques. Le tampon de transfert utilisé est composé de méthanol, de tampon Tris-glycine concentré, de SDS et d'eau distillée. Il résulte de ce transfert que les protéines sont exposées sur une surface mince, ce qui facilite les étapes de détection ultérieures.

3.1.4. Blocage des sites non spécifiques

La membrane ayant été choisie pour ses propriétés de liaison non-spécifique, et comme les anticorps sont également des protéines, des précautions doivent être prises pour minimiser les interactions entre membrane et anticorps.

Le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps

est réalisé en plongeant la membrane dans une solution diluée de protéines (sérumalbumine bovine (BSA) ou lait sans matières grasses) en présence d'un détergent (Tween 20). Les protéines contenues dans la solution diluée se lient alors à la membrane sur tous les sites non occupés par la protéine cible.

Lorsque les anticorps sont appliqués lors de l'étape suivante, ils ne peuvent donc plus s'attacher à la membrane que sur les sites de liaison de la protéine cible. Ceci permet de réduire le bruit de fond observé sur le produit final du transfert et empêche l'apparition de faux positifs.

3.1.5. Détection

Au cours de l'étape de détection, la protéine d'intérêt, fixée sur la membrane, est recherchée à l'aide d'anticorps spécifiques. L'anticorps secondaire utilisé est en général lié à une enzyme émettant un signal lumineux, colorimétrique, fluorescent ou radioactif.

3.1.5.1. Anticorps primaire

Les anticorps primaires sont générés par inoculation d'un animal (généralement un lapin ou une chèvre) ou par exposition d'une culture de cellules immunitaires à la protéine d'intérêt dans son intégralité ou à l'une de ses fractions (épitope). La réponse immunitaire normale est dans ce cas exploitée afin de générer des anticorps primaires qui sont ensuite utilisés comme des outils de détection possédant à la fois une bonne sensibilité et une bonne spécificité vis-à-vis de la protéine d'intérêt.

Après le blocage, une solution diluée d'anticorps primaire (généralement comprise entre 0,5 et 5 µg/mL) est incubée avec la membrane sous agitation périodique. La solution utilisée est composée d'un tampon salin proche du pH neutre, d'un faible pourcentage de détergent, et de protéines diluées (BSA ou lait). La solution d'anticorps et la membrane sont scellées dans un sachet en plastique et incubées ensemble pour une durée comprise entre 30 min et une nuit.

3.1.5.2. Anticorps secondaire

Après une étape de rinçage de la membrane, permettant d'éliminer les anticorps primaires non liés, celle-ci est exposée à un second anticorps dirigé contre une portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire.

Les anticorps secondaires utilisés (anti-souris, anti-chèvre, anti-lapin, etc) proviennent d'une espèce animale différente de celle de l'anticorps primaire ou de cultures d'hybridomes d'origine animale. Un anticorps secondaire anti-souris est donc capable de se lier à pratiquement tout anticorps primaire d'origine murine.

L'anticorps secondaire est en général marqué par la biotine ou par une enzyme (phosphatase alcaline ou peroxydase de raifort) permettant ainsi la visualisation de la protéine d'intérêt liée à la membrane. Plusieurs anticorps secondaires peuvent se lier sur un seul anticorps primaire, ce qui permet d'amplifier le signal observé.

3.1.5.3. Analyse

Après le rinçage des anticorps secondaires non-liés, la membrane est prête pour la détection de la protéine d'intérêt. Le plus souvent, un anticorps secondaire lié à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase) est utilisé en conjonction avec un agent luminescent (le luminol). Lorsqu'il est dégradé par la peroxydase, l'agent émet une luminescence proportionnelle à la quantité de protéine fixée sur la membrane (détection par chimiluminescence).

Un film photographique hypersensible est placé contre la membrane et, sous l'exposition de la lumière due à la réaction, les protéines apparaissent alors sous forme de bandes sombres sur le film. La taille de la protéine peut être estimée en comparant les bandes observées à un marqueur de taille préalablement chargé durant l'électrophorèse.

On utilise aujourd'hui, en règle général, un appareil de détection contenant une caméra CCD qui restitue une image numérique des résultats. L'image est analysée par densitométrie, qui évalue le taux relatif de marquage de la protéine, et quantifie les résultats en termes de densité optique. Des logiciels permettent une analyse plus poussée des données, comme l'analyse du poids moléculaire si les standards appropriés sont utilisés. Cette méthode appelée détection améliorée de la chimiluminescence (« enhanced chemiluminescent » ou ECL) est considérée comme l'une des méthodes de détection les plus sensibles pour l'analyse des western-blots.

Une autre possibilité est d'utiliser un anticorps secondaire, marqué par une enzyme spécifique, fourni avec une molécule substrat qui sera convertie par l'enzyme afin d'émettre un produit de réaction coloré, visible sur la membrane (détection colorimétrique). La quantité de protéine peut alors être évaluée par densitométrie ou par spectrophotométrie.

Une troisième possibilité consiste à utiliser un anticorps secondaire marqué par une molécule fluorescente (détection par fluorescence). Lorsque cette molécule est excitée par un rayon monochromatique, elle émet un signal fluorescent pouvant être détecté par un capteur, comme par exemple une caméra CCD équipée des filtres d'émission appropriés. Il en résulte une image numérique qui permet une analyse plus fine des résultats (analyse quantitative). La fluorescence est considérée comme d'un niveau à peu près équivalent à la chimiluminescence pour l'analyse des résultats.

Une dernière possibilité consiste à utiliser un marqueur radioactif plutôt qu'une enzyme couplée à l'anticorps secondaire, par exemple en marquant une protéine liant les anticorps, telle que la protéine A du *staphylocoque* avec un isotope radioactif de l'iode (détection par autoradiographie). Cependant, les autres méthodes étant plus sûres, plus rapides et moins chères, cette méthode est plus ou moins tombée en désuétude, mais demeure parfois utilisée dans certaines circonstances.

3.2. Méthode

L'équivalent de 20 µg d'extraits protéiques nucléaires CEBHD et BEAS-2B, ont dans un premier temps été mélangés à un volume égal de tampon de Laemmli 2X (4% SDS, 20% glycérol, 10% 2-mercaptoéthanol, 0,004% Bleu de Bromophénol et 0,125M Tris-HCl, pH 6,8), puis chauffés à 100°C pendant 5 min afin de dénaturer les protéines.

Les extraits nucléaires, ainsi qu'une échelle de poids moléculaire ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide à 10% en conditions dénaturantes (SDS 1%). La migration est effectuée dans un tampon Tris-glycine-SDS, à puissance constante, sous 200 Volts, jusqu'à ce que le marqueur de front de migration sorte du gel.

Les protéines ont alors été transférées pendant 60 min, sous 100 V, sur un filtre de nitrocellulose (Invitrogen, Cergy-Pontoise). Après blocage des sites non spécifiques pendant 2 h, à température ambiante et sous agitation périodique, dans une solution de poudre de lait sans matière grasse diluée à 5% dans du TNT (0,1M Tris-HCl pH 7,5, 0,15M NaCl, et 0,1% Tween 20), les filtres ont été incubés pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps polyclonal anti-RARβ dilué au 1/250^{ème}. Les filtres ont ensuite été lavés, sous agitation pendant 1 h dans du TNT, puis incubés 60 min avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (Jackson Immunoresearch, West Grove, IL, États-Unis) dilué au 1/4000^{ème}.

Après un second lavage d'1 h dans du TNT, les complexes spécifiques ont été révélés par chimiluminescence à l'aide du kit de détection Super Signal West Dura (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, États-Unis), selon le protocole recommandé par le fournisseur.

4. IMMUNOPRECIPITATION

4.1. Principes

L'immunoprécipitation est une méthode qui utilise le principe de la réaction immuno antigène-anticorps afin de purifier une protéine spécifique à partir d'échantillons de lysats cellulaires ou d'extraits de protéines totales (Figure 42). La méthode permet, en outre, de déterminer la quantité de protéine d'intérêt présente dans l'échantillon analysé et d'étudier ses caractéristiques physiques.

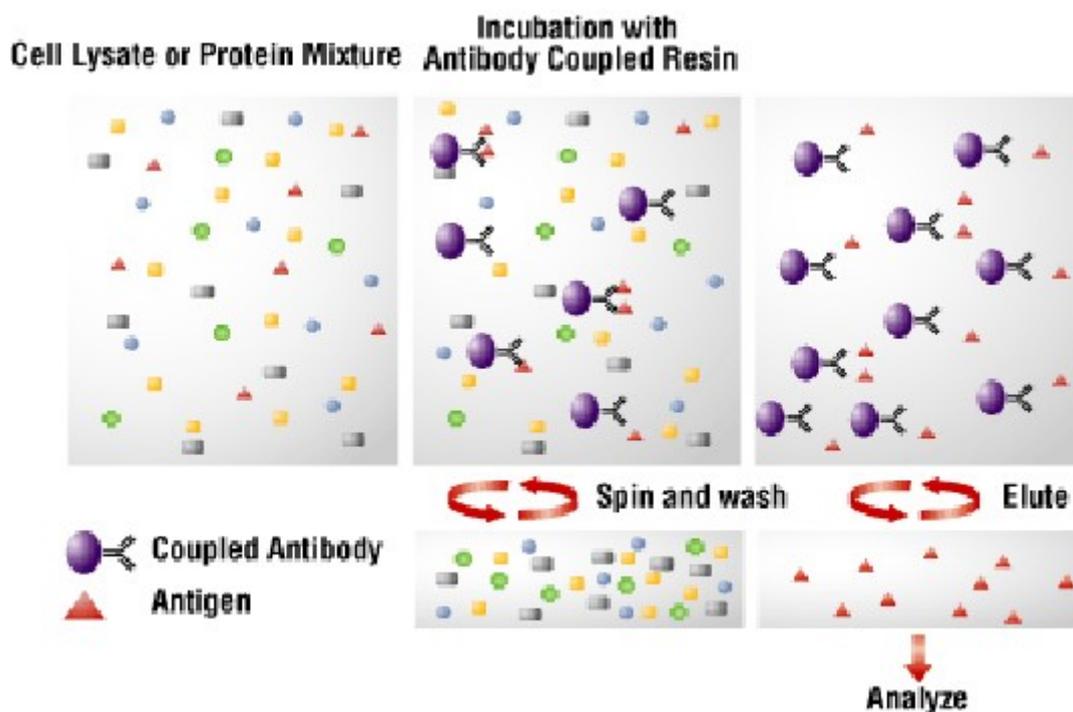


Figure 42. Représentation schématique des différentes étapes d'une expérience d'immunoprécipitation.

(Source: <http://www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=9C471132-0F72-4F39-8DF0-455FB515718F>)

Les protéines d'intérêt contenues dans l'échantillon sont capturées sur un support solide (agarose), sur lequel est immobilisé l'anticorps primaire spécifique, préalablement conjuguées à des protéines A ou G (*Staphylococcus Aureus*) couplées au support d'agarose.

Le processus permettant ainsi la capture des protéines d'intérêt est appelé « précipitation ». Les protéines contenues dans l'échantillon de départ qui n'ont pas été précipitées sont éliminées par lavage du support d'agarose à l'aide d'une solution tampon.

Les protéines d'intérêt précipitées et liées à l'anticorps primaire immobilisé (complexe immun) sont finalement éluées du support puis analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) suivie d'une détection de type western-blot (Cf. [D.3.1.](#)). Ceci permet de vérifier la présence de la protéine d'intérêt dans l'échantillon analysé et de déterminer sa quantité.

4.2. Méthode

Les complexes immuns ont été formés et purifiés sur gel d'agarose par incubation de l'équivalent d'1 mg d'extrait protéique nucléaire BEAS-2B avec l'anticorps RAR β , précédemment conjugué à la protéine A-agarose en utilisant le kit d'immunoprécipitation Seize X Protein A Immunoprecipitation Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, États-Unis) selon le protocole recommandé par le fournisseur. Toutes les étapes de centrifugation ont été réalisées pendant 1 min à 4000 rpm.

4.2.1. Conjugaison de l'anticorps RAR β à la protéine A immobilisée

0,4 mL de solution Immunopure Immobilized Protein A Plus (contenant le gel d'agarose et précédemment diluée à 50% dans de l'eau ultra-pure équilibrée à température ambiante) ont été déposés sur une colonne de purification, placée dans un tube de 1,5 mL. La colonne a été centrifugée et l'éluat éliminé.

La gel d'agarose contenu dans la colonne a ensuite été lavé à 2 reprises par ajout de 0,4 mL de tampon de lavage (0,14M NaCl, 0,008M phosphate de sodium, 0,002M phosphate de potassium, et 0,01M KCl, Ph 7,4), suivi d'une resuspension du gel par inversion/retournement du tube et d'une étape de centrifugation avec élimination de l'éluat.

La colonne a alors été placée dans un nouveau tube de 1,5 mL puis, ont été ajoutés l'équivalent de 250 μ g d'anticorps RAR β purifié, préalablement dilué dans 0,4 mL de tampon de lavage. Le tube a alors été fermé et placé sous agitation douce pendant 15 min afin de

permettre la liaison des anticorps au gel d'agarose via la protéine A. Le tube a ensuite été centrifugé et l'éluat éliminé.

La colonne a alors été placée dans un nouveau tube et 0,5 mL de tampon de lavage ont été ajoutés, le tube inversé 5 à 10 fois, centrifugé et l'éluat éliminé. Cette étape a été répétée à 4 reprises afin d'éliminer l'excès d'anticorps RAR β . La colonne a finalement été placée dans un nouveau tube et 0,4 mL de tampon de lavage y ont été ajoutés.

4.2.2. Liaison covalente de l'anticorps RAR β au gel d'agarose

Cette étape permet de lier l'anticorps RAR β de façon covalente au gel d'agarose, prévenant ainsi son élution avec la protéine d'intérêt lors des étapes de centrifugation ultérieures. Ceci permet ainsi de conserver la colonne et de la réutiliser pour d'autres expériences d'immunoprécipitation. L'agent utilisé pour la liaison covalente est le DiSuccinimidyl Suberate (DSS). Il permet la formation d'un support d'affinité permanent contenant des anticorps orientés correctement.

Le film en cellophane recouvrant un tube de 2 mg de DSS a été percé à l'aide d'un cône de pipette. 80 μ L de DiMéthylSulfOxyde (DMSO) ont été ajoutés et mélangés jusqu'à dissolution complète du DSS puis, 25 μ L de la solution de DSS ont été déposés dans la colonne préparée précédemment. Le tube a alors été placé sous agitation périodique pendant 1 h puis centrifugé et l'éluat éliminé.

500 μ L de tampon d'élution Immunopure (pH 2,8) ont ensuite été ajoutés à la colonne. Le tube a été fermé et inversé/retourné une dizaine de fois puis centrifugé et le surnageant éliminé. Cette étape d'élution a été répétée à 5 reprises afin d'inhiber la réaction et d'éliminer les excès de DSS et d'anticorps non liés. La colonne a finalement été placée dans un nouveau tube et lavée à 2 reprises par ajout de 500 μ L de tampon de lavage.

4.2.3. Immunoprécipitation des protéines RAR β

L'échantillon d'extrait protéique nucléaire BEAS-2B (1 mg) a d'abord été dilué dans un volume équivalent de tampon de lavage. Le gel (couplé à l'anticorps RAR β) contenu dans la colonne de purification a alors été transféré dans le tube contenant les protéines nucléaires diluées. Le tube a ensuite été placé sous agitation douce pendant une nuit à 4°C afin de permettre la formation des complexes immuns antigène-anticorps.

Le mélange obtenu a été déposé, par fractions de 0,5 mL, sur la colonne de purification. La colonne a été centrifugée et l'éluat éliminé pour chaque fraction ainsi ajoutée.

Elle a alors été placée dans un nouveau tube et 0,5 mL de tampon de lavage ont été ajoutés, le tube inversé une dizaine de fois, centrifugé et le surnageant éliminé. Cette étape de lavage a été répétée à 4 reprises afin d'éliminer l'excès de protéines nucléaires résiduelles non liées à l'anticorps.

4.2.4. Éluion des protéines RAR β immunoprécipitées

Afin d'éluier les protéines RAR β immunoprécipitées, 190 μ L de tampon d'éluion Immunopure (pH 2,8) ont été ajoutés à 3 reprises dans la colonne. Le tube a ensuite été fermé, inversé 10 fois puis centrifugé et les éluats, contenant les protéines RAR β , ont été récupérés.

4.2.5 Analyse de l'échantillon

Les protéines RAR β ainsi immunoprécipitées et éluées ont ensuite été prises en charge et mises en évidence par migration sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), suivie d'un transfert sur membrane de nitrocellulose et d'une détection par chimiluminescence, selon le même protocole que celui décrit précédemment pour le western-blot (Cf. [D.3.2.](#)).

RÉSULTATS

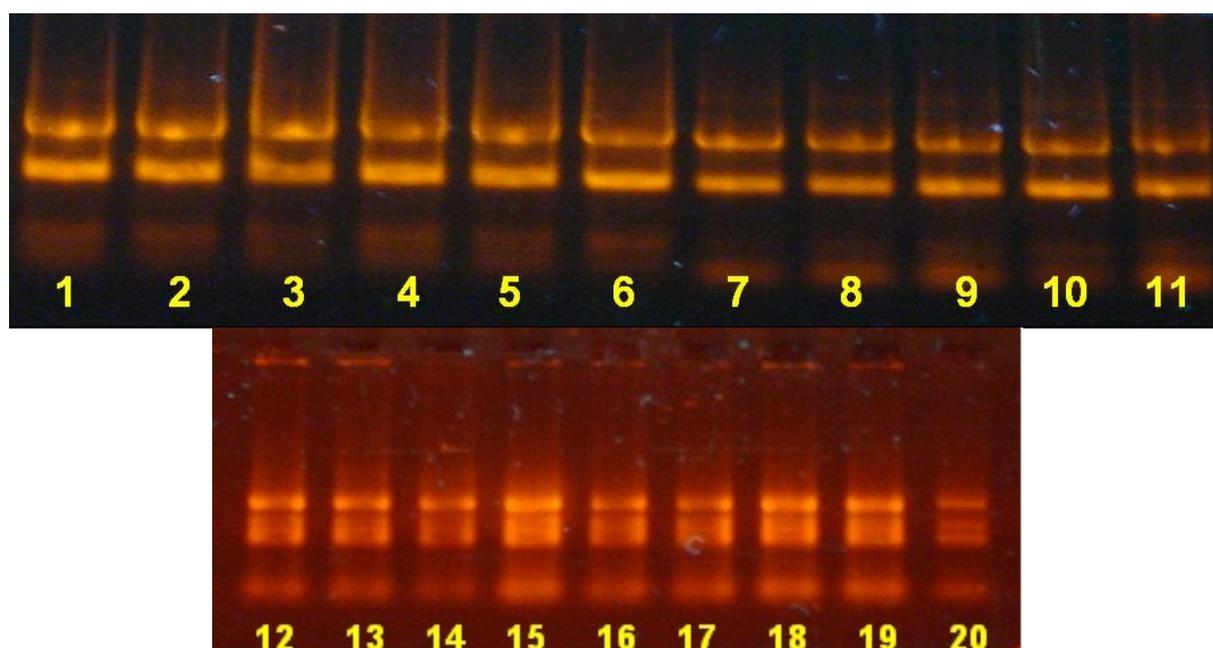


Figure 43. Analyse des différents échantillons d'ARNt extraits sur gel d'agarose à 0,8% p/v. 1: CEBHD, 2 : CEBHND, 3 : BEAS-2B, 4 : H1648, 5 : H2087, 6 : H2342, 7 : A549, 8 : H69, 9 : H513, 10 : cellules de l'épiderme, 11 : CML, 12-20 : échantillons de tumoraux CBCSq.

Tableau 7. Séquences des différentes amorces et sondes Taqman dessinées pour les RRs.

Amorces	GenBank Refseq	Isoforme reconnue	Séquences (5'-3') des amorces Sens (S), Antisens (AS) et des sondes Taqman (T)	Taille de l'amplicon (pb)	Position dans l'ADNc
β -Actine	NM_001101	-	(S) - GCATCCCCCAAAGTTCAC (AS) - GACTGGGCCATTCTCCTT	151	Exon 6
RAR α	NM_000964 NM_001024809	1+2	(S) - GGCATGTCCAAGGAGTCTGTG (AS) - CGTCAGCGTGTAGCTCTCAG (T) - ACTCGGGCTTGGGCACCTCCTTCT	90	Exons 4+5
RAR β	NM_000965 NM_016152	1+2	(S1) - GCAGAGCGTGTAAATTACCTTGAA (AS1) - GTGAGATGCTAGGACTGTGCTCT (S2) - TTCTCAGTGCCATCTGCTTAATCT (AS2) - GGCTTGCTGGGTCGTCTTTTT (T) - ACCGCCAGGACCTTGAGGAACCGA	145 130	Exon 8 Exons 6+7
RAR β 2	NM_000965	1	(S) - GATGTTCTGTCAAGTGTGTC (AS) - ATTCGGTTTGGGTCAATC	118	Exon 1
RAR γ	NM_000966	1	(S) - TAAGGAGCGACTCTTTGC (AS) - GCTCAGCATCTCGAAAGG	118	Exon 3
RXR α	NM_002957	-	(S) - AATCAAGACGTTTCCCCTGTT (AS) - GCTAAAGCTGTCTGCTCCAAA	149	Exon 10
RXR β	NM_021976	-	(S) - CGTGACATGAGGATGGACAAGA (AS) - TTGCAGTAGGTCTCCAGTGATG (T) - CTCCCGCAGGACCTCCACCTCACT	143	Exons 8+9

A. QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DES RÉCEPTEURS AUX RÉTINOÏDES

Les valeurs de référence pour l'expression ARNm des différents RRs dans le tissu bronchique normal ont dans un premier temps été déterminées à partir de l'échantillon CEBHD. Les expressions relatives de chaque ARNm RR par rapport à cet échantillon de référence ont ensuite été déterminées dans les différentes lignées cellulaires ainsi que dans les échantillons de tumeurs bronchiques de type CBCSq. Les résultats obtenus suite aux essais de qRT-PCR Syber Green ont été comparés à ceux obtenus en utilisant le triplex de sondes Taqman ciblant 3 RRs à la fois : RAR α , RAR β et RXR β .

Les ARNt ont été extraits des différents échantillons à l'aide du réactif Trizol. Les résultats obtenus lors de l'analyse de ces ARNt sur gel d'agarose sont présentés sur la [Figure 43](#). Les ARNt extraits présentent deux renflements principaux qui correspondent respectivement aux ARNr 28s et 18s. Le premier renflement possède une intensité double par rapport au second, attestant ainsi de la qualité de l'extraction. Les ARNm apparaissent sous forme d'un léger «étalement lumineux (« smear ») situé entre les deux bandes d'ARNr, signifiant ainsi qu'ils ne sont pas dégradés. Après cette première analyse visuelle, les ARNt ont été rétroconvertis en ADNc puis, des dilutions 1/10^{ème}, 1/50^{ème} et 1/100^{ème} de chaque ADNc ont été préparées afin d'être utilisées dans les expériences de qRT-PCR.

Les séquences des amorces et des sondes Taqman dessinées pour chaque RR sont résumées dans le [Tableau 7](#). La spécificité de chaque paire d'amorces a été vérifiée par la présence d'un seul pic d'amplicons dans les courbes de fusion réalisées au cours des essais de qRT-PCR Syber Green. Les différents amplicons RRs générés possèdent des tailles comprises entre 90 et 151 pb.

Tableau 8. Présentation des données brutes recueillies lors des expériences de qRT-PCR.

Syber Green n=9	β -Actine					RAR α					RAR β					RAR β 2					RAR γ					RXR α					RXR β									
Échantillons	mTOP	\pm SD	mAE	\pm SD	R ²	mTOP	\pm SD	mAE	\pm SD	R ²	mTOP	\pm SD	mAE	\pm SD	R ²	mTOP	\pm SD	mAE	\pm SD	R ²	mTOP	\pm SD	mAE	\pm SD	R ²	mTOP	\pm SD	mAE	\pm SD	R ²	mTOP	\pm SD	mAE	\pm SD	R ²	mTOP	\pm SD	mAE	\pm SD	R ²
CEBHD	15.66	1.92	1.75	0.02	0.999	24.50	2.12	1.74	0.03	0.999	26.03	2.17	1.72	0.03	0.998	24.66	1.75	1.68	0.03	0.999	29.63	2.80	1.56	0.03	0.996	25.77	2.07	1.71	0.03	0.998	27.17	2.02	1.54	0.04	0.999					
CEBHND	13.97	1.57	1.69	0.04	0.982	24.50	2.01	1.71	0.06	0.997	27.77	1.66	1.68	0.03	0.999	28.00	0.98	1.61	0.04	0.985	25.58	2.87	1.55	0.02	0.994	24.31	1.70	1.66	0.03	0.992	26.26	1.79	1.55	0.04	0.996					
BEAS-2B	14.99	1.85	1.68	0.03	0.965	24.47	2.15	1.71	0.05	0.998	31.61	1.89	1.68	0.03	0.973	32.10	1.32	1.62	0.06	0.991	28.28	2.70	1.54	0.02	0.998	26.68	1.93	1.64	0.04	0.995	27.09	2.29	1.52	0.02	0.997					
H1648	15.24	2.25	1.69	0.04	0.988	24.16	2.60	1.68	0.05	0.994	33.11	2.63	1.66	0.04	0.974	35.85	1.24	1.61	0.03	0.986	ND	ND	ND	ND	ND	23.96	2.38	1.63	0.04	0.989	26.74	2.53	1.51	0.03	0.994					
H2087	15.64	1.99	1.71	0.03	0.997	25.97	2.19	1.71	0.04	0.997	31.19	1.99	1.69	0.03	0.990	ND	ND	ND	ND	ND	30.15	2.82	1.55	0.02	0.998	27.13	2.08	1.65	0.02	0.997	28.22	2.37	1.53	0.02	0.995					
H2342	14.65	1.80	1.72	0.03	1.000	25.12	2.15	1.72	0.04	0.997	30.43	1.53	1.68	0.02	0.998	32.70	0.97	1.63	0.04	0.995	28.25	2.59	1.56	0.03	1.000	25.00	2.02	1.67	0.04	0.999	26.27	2.46	1.51	0.02	1.000					
A549	15.26	1.97	1.68	0.03	0.987	25.13	2.20	1.66	0.06	0.991	25.69	2.25	1.65	0.03	0.994	24.86	1.62	1.59	0.03	0.984	28.28	2.49	1.53	0.03	1.000	24.10	1.99	1.63	0.03	0.983	27.34	2.02	1.51	0.03	0.996					
H69	14.94	1.80	1.70	0.02	0.999	25.02	2.09	1.65	0.01	1.000	24.42	2.07	1.66	0.04	0.999	23.73	1.66	1.62	0.04	0.971	31.82	2.47	1.58	0.07	0.984	26.90	1.73	1.65	0.03	0.978	25.17	1.99	1.53	0.03	0.999					
H513	17.09	2.20	1.86	0.07	0.996	26.61	2.61	1.84	0.05	0.997	33.23	2.48	1.80	0.03	0.999	33.50	1.16	1.72	0.02	0.974	27.95	3.03	1.63	0.02	0.997	24.64	2.13	1.81	0.04	0.996	28.78	2.60	1.60	0.01	0.998					
CELL. ÉPID.	15.71	1.49	1.89	0.02	0.984	24.22	1.65	1.85	0.06	0.981	29.13	1.59	1.85	0.03	0.991	29.29	1.03	1.78	0.06	0.972	28.30	2.26	1.65	0.03	0.999	24.38	1.68	1.84	0.04	0.977	28.21	1.95	1.66	0.03	0.987					
CML	15.76	1.94	1.71	0.04	0.999	24.33	2.26	1.70	0.05	0.996	29.29	2.18	1.67	0.04	0.991	28.84	1.76	1.62	0.06	0.985	28.78	2.31	1.54	0.02	0.999	25.96	2.07	1.66	0.04	0.992	27.03	2.32	1.53	0.03	0.991					
Av. mAE	1.74 0.03					1.73 0.05					1.70 0.03					1.65 0.04					1.57 0.03					1.69 0.03					1.54 0.03									

Tagman n=6	RAR α					RAR β					RXR β				
Échantillons	mTOP	\pm SD	mAE	\pm SD	R ²	mTOP	\pm SD	mAE	\pm SD	R ²	mTOP	\pm SD	mAE	\pm SD	R ²
CEBHD	24.33	2.18	1.69	0.08	0.999	25.20	1.90	1.67	0.06	0.996	24.70	2.19	1.72	0.09	0.997
CEBHND	24.82	1.72	1.65	0.06	0.997	27.83	1.92	1.62	0.09	0.994	23.82	1.81	1.62	0.12	1.000
BEAS-2B	24.73	2.03	1.60	0.04	0.999	30.05	2.36	1.57	0.08	0.999	24.25	1.85	1.69	0.04	0.998
H1648	23.52	1.94	1.64	0.07	0.999	ND	ND	ND	ND	ND	23.82	1.81	1.70	0.12	0.998
H2087	25.67	2.05	1.65	0.04	0.998	ND	ND	ND	ND	ND	25.38	2.16	1.62	0.07	0.999
H2342	25.88	2.38	1.78	0.14	0.998	ND	ND	ND	ND	ND	24.23	2.49	1.62	0.05	1.000
A549	24.43	1.88	1.73	0.10	0.995	24.55	1.59	1.64	0.07	0.999	24.50	1.82	1.66	0.08	0.996
H69	26.05	2.15	1.67	0.09	0.998	24.88	1.84	1.64	0.10	0.999	23.73	2.08	1.59	0.08	0.996
H513	26.07	1.97	1.64	0.03	0.998	ND	ND	ND	ND	ND	25.00	1.77	1.69	0.08	0.996
CELL. ÉPID.	25.40	2.21	1.65	0.03	1.000	29.05	2.06	1.64	0.10	0.994	26.17	2.30	1.64	0.13	0.998
CML	24.98	2.16	1.65	0.12	0.998	28.42	2.26	1.59	0.03	0.973	25.12	2.20	1.71	0.06	0.997
Av. mAE	1.67 0.07					1.62 0.08					1.66 0.08				

n : nombre total de réplicats amplifiés pour chaque échantillon, mTOP : moyenne des n valeurs de Take-Off Point définies par le logiciel du Rotorgene, mAE : moyenne des n valeurs d'efficacité d'amplification définies par le logiciel du Rotorgene, SD : Déviation Standard, R² : coefficient de corrélation, Av. mAE : moyenne globale de toutes les valeurs mAE, ND : Non Détectable.

Les valeurs indiquées en caractères gras ont été par la suite introduites dans le logiciel Bestkeeper afin d'analyser la stabilité d'expression de chaque gène au travers des différents échantillons et définir ainsi des gènes de référence stables pour la normalisation des résultats d'expression.

Les amorces de la β -Actine ont été choisies dans la région 3' non traduite de son ARNm (exon 6) afin de procéder au contrôle de l'intégrité des ARNt extraits lors de l'amplification par qRT-PCR. Les amorces RAR β (exon 8) ciblent simultanément les 2 isoformes ARNm P2-RAR β de référence décrites dans les banques de séquences génomiques: [GenBank:NM_000965] et [GenBank:NM_016152] ([Tableau 7](#)). Les amorces RAR β 2 (ciblant l'exon 1) ont quant-à elles été dessinées de façon à être spécifiques de l'ARNm Refseq : [GenBank:NM_000965], qui correspond à la longue isoforme 1 transcrite à partir du promoteur P2-RAR β ([Tableau 7](#)). Les amorces utilisées dans les essais en Syber Green ou dans les essais utilisant le triplex de sondes Taqman sont identiques pour RAR α et RXR β , mais elles ont été définies dans différentes parties de l'extrémité 3' du transcrit RAR β afin de confirmer les résultats obtenus avec les sondes Taqman (amorces S2-AS2 situées à la jonction des exons 6 et 7) et le Syber Green (amorces S1-AS1 situées dans l'exon 8) ([Tableau 7](#)).

Les données brutes de qRT-PCR recueillies pour chaque échantillon analysé sont résumées dans le [Tableau 8](#). Les valeurs mTOP et mAE ainsi que leurs Déviations Standards ont été déterminées en calculant la moyenne des résultats de TOP et d'AE obtenus à partir des différents réplicats de chaque gamme de dilution d'ADNc (dilutions 1/10^{ème}, 1/50^{ème} et 1/100^{ème} réalisées en triplicats pour les essais en Syber Green et en duplicats pour les essais Tamqan). L'efficacité d'amplification globale de chaque paire d'amorce utilisée (Av. mAE : moyenne globale de toutes les mAE) a également été calculée dans chaque cas afin d'être utilisée ultérieurement dans le logiciel Bestkeeper. Les coefficients de corrélation R² ont quant-à eux été déterminés à partir de la courbe standard obtenue pour chaque échantillon d'ADNc analysé. Les valeurs des différents R² sont comprises entre 0,96 et 1, permettant ainsi de valider la qualité des réplicats réalisés pour chaque échantillon. Les valeurs des Déviations Standards associées aux mTOP (SD<15%) et aux mAE (SD<10%) permettent quant-à elles de valider la reproductibilité de chaque essai de qRT-PCR.

Tableau 9. Présentation des résultats de l'analyse des données brutes de qRT-PCR par le logiciel Bestkeeper.

		Gènes de Référence						Gènes Cibles						
		β-Actine		RXRβ		Index Bestkeeper		RARα		RARβ		RARβ2	RARγ	RXRα
DONNÉES mTOP	N	11	11	11	11	11	11	11	11	11	7	10	10	11
	GM [mTOP]	15.34	15.34	27.10	24.60	20.39	19.42	24.90	25.07	29.12	27.06	29.09	28.66	25.32
	AM [mTOP]	15.36	15.36	27.12	24.61	20.40	19.44	24.91	25.08	29.26	27.14	29.35	28.70	25.35
	Min [mTOP]	13.97	13.97	25.17	23.73	19.15	18.24	24.16	23.52	24.42	24.55	23.73	25.58	23.96
	Max [mTOP]	17.09	17.09	28.78	26.17	22.18	20.67	26.61	26.07	33.23	30.05	35.85	31.82	27.13
	SD [±mTOP]	0.56	0.56	0.75	0.60	0.64	0.59	0.60	0.67	2.41	1.94	3.35	1.11	1.04
	CV[%mTOP]	3.65	3.65	2.78	2.45	3.13	3.04	2.40	2.66	8.25	7.14	11.41	3.88	4.09
ANALYSE DE RÉGRESSION (vs Index Bestkeeper)	r	0.956	0.943	0.918	0.838			0.53	0.27	0.458	0.160	0.267	0.055	-0.06
	r ²	0.914	0.889	0.843	0.702			0.28	0.07	0.210	0.734	0.071	0.003	0.00
	p-value	0.001	0.001	0.001	0.001			0.096	0.417	0.156	0.384	0.458	0.877	0.861

Pour chaque gène, le nombre total d'échantillons analysés (N), les Moyennes Géométriques (GM) et les Moyennes Arithmétiques (AM) de toutes les valeurs de mTOP entrées, ainsi que la valeur mTOP maximale (Max) et minimale (Min), sont indiquées avec leurs Déviations Standards (SD [± mTOP]) et leurs Coefficients de Variation (CV [%mTOP]). Les valeurs SD [± mTOP] significatives (< 1) sont indiquées en caractères gras. Les résultats de l'analyse des données brutes de qRT-PCR obtenues avec les sondes Taqman sont surlignés en gris. Les indexes Bestkeeper ont été calculés dans chaque cas en utilisant la combinaison de la β-Actine et de RXRβ comme gènes de référence. Les résultats de l'analyse de la corrélation existant entre l'expression du gène de référence et l'index Bestkeeper correspondant (régression vs index Bestkeeper) sont indiqués pour chaque gène par un coefficient de corrélation (r), un coefficient de détermination (r²) ainsi qu'une probabilité de corrélation (p-value). Les résultats significatifs (p-value<0,05) sont indiqués en caractères gras.

Les données brutes obtenues par qRT-PCR ont ensuite été exportées dans 2 logiciels d'analyse statistique : Bestkeeper et REST-RG ([Pfaffl et al., 2002 et 2004](#)).

Le premier logiciel utilisé est le logiciel Bestkeeper. Il permet, à l'aide d'un test de randomisation statistique, de valider la stabilité d'expression des gènes de référence (gènes endogènes) utilisés pour la normalisation des résultats de qRT-PCR. Le logiciel permet en outre d'établir un index de normalisation (index Bestkeeper) à partir de la combinaison des différents gènes de référence dont les expressions sont établies comme stables et fortement corrélées au travers de l'ensemble des échantillons analysés.

La valeur de mTOP associée à chaque gène pour chaque échantillon ainsi que la valeur moyenne de toutes les mAE calculées pour chaque gène (Av. mAE) ont été introduites dans le logiciel ([Tableau 8](#)). À partir de ces données, la qualité de chaque échantillon d'ARNt a dans un premier temps été validée par le logiciel en calculant un indice de qualité (indice InVar) ([Pfaffl et al., 2004](#)). Les données introduites ont ensuite été analysées par Bestkeeper, les résultats de cette analyse sont présentés dans le [Tableau 9](#).

La déviation standard (SD) des différentes valeurs de mTOP entrées pour chaque gène a été calculée par le logiciel. Chaque gène dont la SD a une valeur inférieure à 1 (signifiant ainsi la stabilité d'expression du gène au travers des différents échantillons analysés) a alors été désigné comme un gène de référence potentiel. Les gènes qui ont ainsi été désignés sont : la β -Actine (SD=0,56 pour les essais en Syber Green), RAR α (SD=0,60 avec le Syber Green et SD=0,67 pour le triplex de sondes Taqman), et RXR β (SD=0,75 en Syber Green et SD=0,60 avec les sondes Taqman).

Bestkeeper a alors testé les corrélations existant entre les niveaux d'expression respectifs de ces 3 gènes de référence potentiels au travers des différents échantillons analysés. Les gènes dont les expressions sont fortement corrélées (coefficient de corrélation

(r) $>0,5$ et probabilité (p) $<0,05$) ont alors été combinés dans un index de normalisation (index Bestkeeper).

Pour les essais en Syber Green, les expressions géniques de la β -Actine et de $RXR\beta$ ont présenté une bonne corrélation au travers des différents échantillons analysés ($r=0,76$ et $p=0,006$). Cependant, bien que le gène $RAR\alpha$ soit exprimé de façon stable au travers des différents échantillons, les valeurs de ses expressions n'ont pas montré une corrélation suffisante avec celles de la β -Actine et de $RXR\beta$ ($r<0,5$ et $p>0,05$) pour pouvoir l'intégrer dans le calcul de l'index de normalisation Bestkeeper. $RAR\alpha$ n'a donc pas été considéré comme un gène de référence dans cette étude.

Après avoir désigné les 2 gènes de référence utilisés pour le calcul de l'index Bestkeeper (β -Actine et $RXR\beta$), le logiciel a alors testé les corrélations existant entre l'index de normalisation ainsi défini et chacun des gènes utilisés pour son calcul. La valeur de la SD associée à l'index Bestkeeper ainsi obtenu pour les essais en Syber Green est de 0,64 ([Tableau 9](#)). De bonnes corrélations ont été trouvées entre l'index Bestkeeper et la β -Actine ($r=0,96$ et $p=0,001$) ainsi qu'avec $RXR\beta$ ($r=0,92$ et $p=0,001$) ([Tableau 9](#)). Ces résultats ont permis de valider l'utilisation de la combinaison β -Actine+ $RXR\beta$ pour la normalisation fiable des valeurs d'expression obtenues pour les RRs dans les essais de qRT-PCR Syber Green.

Pour les essais de qRT-PCR utilisant le triplex de sondes Taqman, étant donné que la valeur de SD calculée pour $RAR\beta$ est supérieure à 1 ([Tableau 9](#)) et que les expressions de $RAR\alpha$ et $RXR\beta$ ne sont pas suffisamment corrélées ($r<0,5$ et $p>0,05$), ces gènes n'ont pas pu être utilisés pour le calcul de l'index de normalisation. Une combinaison des valeurs d'expression associées à la β -Actine dans les essais de Syber Green (gène de référence externe) et de celles associées à la sonde Taqman $RXR\beta$ (gène de référence interne) a alors été testée.

L'index Bestkeeper ainsi obtenu montre une déviation standard de 0,59 ([Tableau 9](#)). Les expressions géniques de la β -Actine en Syber Green et de la sonde Taqman RXR β présentent également une bonne corrélation au travers des différents échantillons analysés ($r=0,61$ et $p=0,046$). De plus, de bonnes corrélations ont également été trouvées entre l'index Bestkeeper calculé et la β -Actine ($r=0,94$ et $p=0,001$) ainsi qu'avec RXR β ($r=0,84$ et $p=0,001$) ([Tableau 9](#)). L'utilisation de cette combinaison de gènes de références a ainsi été validée pour procéder à la normalisation des données d'expression obtenues dans les essais de qRT-PCR utilisant le triplex de sondes Taqman. Par ailleurs, l'utilisation de cette combinaison de gènes de référence a également permis par la suite de comparer les résultats d'expressions relatives obtenus avec les 2 types d'essais de qRT-PCR (Syber Green vs Taqman).

Après avoir défini les gènes de référence utilisés pour la normalisation, les données brutes obtenues par qRT-PCR ont été transformées en ratios d'expression génique (R) à l'aide du logiciel REST-RG ([Pfaffl et al., 2001 et 2002](#)). Dans chaque échantillon, un ratio d'expression relatif a été calculé pour chaque ARNm RR par rapport à l'échantillon de référence CEBHD. L'expression de chaque gène RR a aussi été simultanément normalisée par la combinaison des gènes de référence (β -Actine+RXR β) précédemment définie par le logiciel Bestkeeper (index de normalisation). La significativité des différents ratios d'expression ainsi obtenus ($p<0,05$) a été validée à l'aide d'un test de randomisation statistique intégré dans le logiciel (Pair-Wise Fixed Reallocation Randomisation Test) ([Pfaffl et al., 2002](#)). Les ratios d'expression ARNm ainsi obtenus pour chaque RR sont présentés dans le [Tableau 10](#). Ils sont indiqués associés à leurs erreurs standards (SE).

Les résultats significatifs obtenus en utilisant les paires d'amorces RAR β et RAR β 2 ainsi que la sonde Taqman RAR β sont représentés sous forme graphique sur la [Figure 44](#). Les expressions relatives non significatives obtenus pour RAR α (Syber Green et sonde Taqman), RAR γ et RXR α sont quant-à elles représentées sur la [Figure 45](#).

Tableau 10. Résultats de la transformation des données brutes de qRT-PCR en ratios d'expression relative par le logiciel REST-RG.

Échantillons	RAR α		RAR β			RAR β 2	RAR γ	RXR α	
	R	SE	R	SE	VR(%)	R	SE	R	SE
CEBHND	-0.95 ± 1.04	-1.35 ± 0.78	-2.27 ± 0.37	-2.87 ± 0.19	20.99	-3.35 ± 0.09	1.63 ± 9.09	0.15 ± 0.54	
BEAS-2B	-0.26 ± 0.80	-0.72 ± 1.10	-4.54 ± 0.03	-3.80 ± 0.08	19.57	-5.63 ± 0.01	0.57 ± 3.10	-0.96 ± 1.01	
H1648	-0.02 ± 0.13	0.10 ± 0.45	-5.63 ± 0.01	ND	ND	-8.33 ± 0.00	ND	ND	1.05 ± 5.25
H2087	-0.83 ± 1.22	-0.74 ± 1.16	-3.63 ± 0.10	ND	ND	ND	-0.01 ± 0.05	-0.71 ± 1.15	
H2342	-1.19 ± 1.05	-1.80 ± 0.73	-4.06 ± 0.06	ND	ND	-6.57 ± 0.00	0.20 ± 1.10	-0.07 ± 0.27	
A549	-0.59 ± 1.18	-0.31 ± 0.86	0.16 ± 0.72	0.24 ± 0.88	-	-0.24 ± 0.61	0.74 ± 3.88	1.14 ± 4.72	
H69	-1.30 ± 0.92	-1.92 ± 0.59	0.32 ± 1.37	-0.40 ± 0.84	-	-0.23 ± 0.57	-2.32 ± 0.49	-1.75 ± 0.59	
H513	-0.64 ± 1.57	-0.55 ± 1.22	-4.68 ± 0.04	ND	ND	-5.64 ± 0.01	2.27 ± 15.14	2.05 ± 10.37	
CELL. ÉPID.	0.61 ± 2.46	-0.22 ± 0.70	-2.20 ± 0.42	-2.21 ± 0.39	0.46	-3.29 ± 0.11	1.29 ± 6.58	1.53 ± 6.00	
CML	0.13 ± 0.61	-0.28 ± 0.85	-2.48 ± 0.36	-2.06 ± 0.50	20.24	-3.03 ± 0.16	0.53 ± 2.70	-0.14 ± 0.51	

Pour chaque gène RR, les ratios d'expression relative (R) ont été calculés par REST-RG, associés à leurs erreurs standards (SE). Les ratios d'expression calculés pour chaque RR ont été définis par la normalisation des valeurs brutes de qRT-PCR obtenues dans chaque échantillon analysé par rapport à celles obtenues pour l'échantillon de référence CEBHD. Une normalisation simultanée des données brutes de chaque RR a été réalisée en utilisant la combinaison de gènes de référence β -Actine+RXR β (index de normalisation) précédemment définie par le logiciel Bestkeeper. Les résultats significatifs (p-value<0,05) sont indiqués en caractères gras. Les résultats calculés pour les sondes Taqman sont surlignés en gris. Lorsque les ratios sont à la fois significatifs pour les essais en Syber Green et pour ceux utilisant les sondes Taqman, un taux de variation (VR) a été calculé afin de comparer les résultats obtenus à partir des 2 types d'essais de qRT-PCR. (ND = Non Détectable).

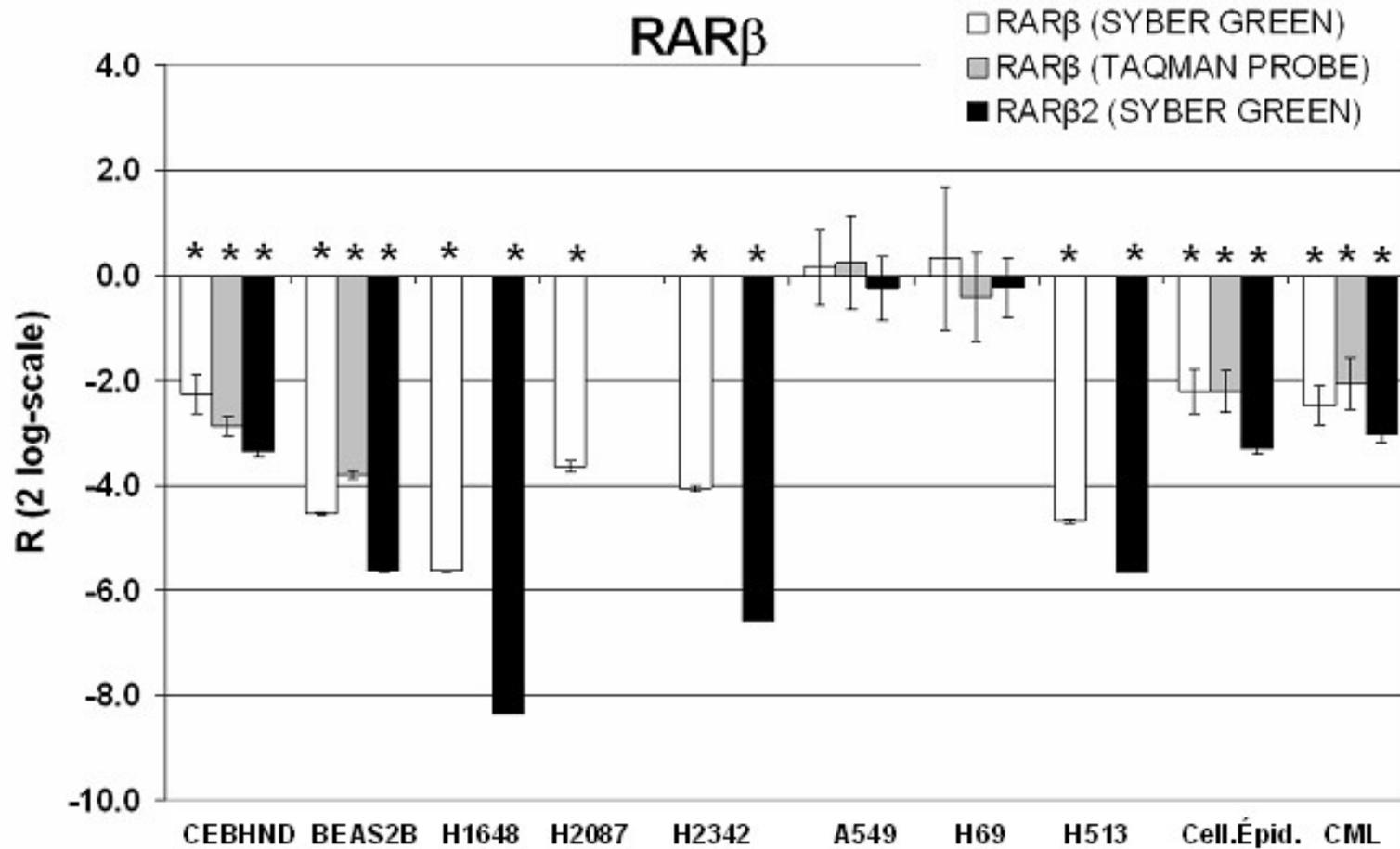


Figure 44. Représentation graphique des ratios relatifs d'expression génique obtenus pour RAR β dans les différents échantillons.

Les ratios d'expression (R) ont été calculés à l'aide du logiciel REST-RG, ils sont associés à leurs erreurs standards (SE). Les ratios ont été calculés pour chaque échantillon relativement à l'échantillon contrôle de référence CEBHD, avec une normalisation simultanée des données par la combinaison des gènes de référence (β -Actine et RXR β) précédemment définie par le logiciel Bestkeeper (index de normalisation). Les expressions significativement différentes de celles observées dans le tissu de référence CEBHD ($p < 0,05$) sont indiqués par des astérisques.

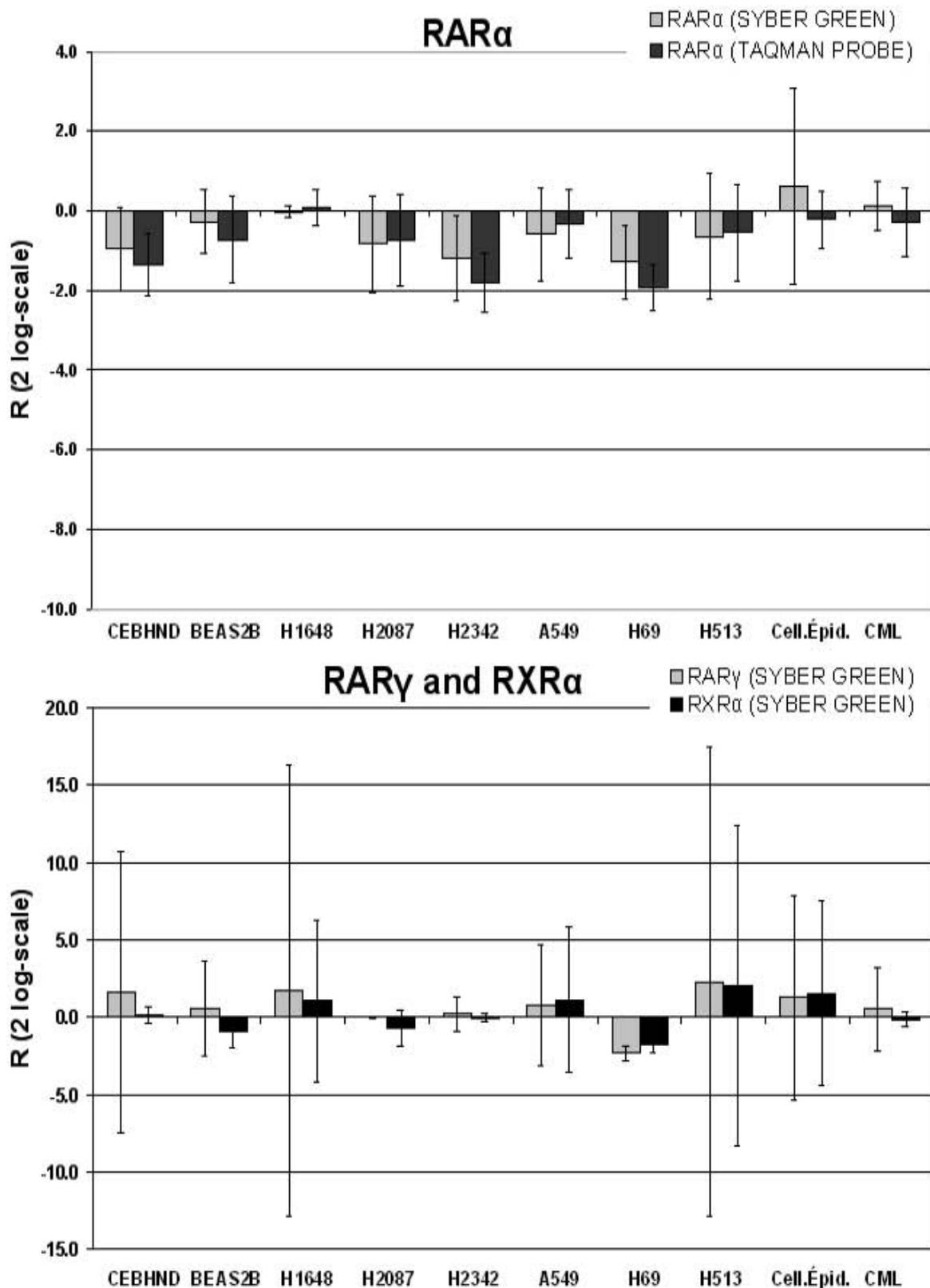


Figure 45. Représentation graphique des ratios relatifs d'expression génique obtenus pour RAR α , RAR γ et RXR α dans les différents échantillons.

Les ratios d'expression (R) ont été calculés à l'aide du logiciel REST-RG, ils sont associés à leurs erreurs standards (SE). Les ratios ont été calculés pour chaque échantillon relativement à l'échantillon contrôle de référence CEBHD, avec une normalisation simultanée des données par la combinaison des gènes de référence (β -Actine et RXR β) précédemment définie par le logiciel Bestkeeper (index de normalisation).

Dans les essais de qRT-PCR Syber Green, les ratios d'expression relative obtenus en utilisant les amorces RAR β sont classées dans l'ordre suivant : H69(0.32) > A549(0.16) > épiderme*(-2.20) > CEBHND*(-2.27) > CML*(-2.48) > H2087*(-3.63) > H2342*(-4.06) > BEAS-2B*(-4.54) > H513*(-4.68) > H1648*(-5.63) (Figure 44). Les niveaux d'expressions obtenus avec les amorces RAR β 2 varient quant-à eux classés de la façon suivante : A549(-0.24) > H69(-0.23) > CML*(-3.03) > épiderme*(-3.29) > CEBHND*(-3.35) > BEAS-2B*(-5.63) > H513*(-5.64) > H2342*(-6.57) > H1648*(-8.33) (Figure 44). Pour la lignée cellulaire H2087, le niveau d'amplicons RAR β 2 est tellement bas qu'ils n'ont pas pu être détectés correctement (absence de courbes d'amplification interprétables).

Les ratios d'expression calculés pour RAR α varient de cette façon : épiderme(0.61) > CML(0.13) > H1648(-0.02) > BEAS-2B(-0.26) > A549(-0.59) > H513(-0.64) > H2087(-0.83) > CEBHND(-0.95) > H2342(-1.19) > H69(-1.30) (Figure 45), alors que ceux calculés pour RAR γ sont classés dans l'ordre suivant : H513(2.27) > CEBHND(1.63) > épiderme(1.29) > A549(0.74) > BEAS-2B(0.57) > CML(0.53) > H2342(0.20) > H2087(-0.01) > H69(-2.32) (Figure 45). Pour la lignée H1648, le niveau d'amplicons RAR γ est tellement bas qu'ils n'ont pas été détectés (absence de courbes interprétables). Les niveaux d'expression observés pour RXR α varient quant-à eux de la manière suivante : H513(2.05) > épiderme(1.53) > A549(1.14) > H1648(1.05) > CEBHND(0.15) > H2342(-0.07) > CML(-0.14) > H2087(-0.71) > BEAS-2B(-0.96) > H69(-1.75) (Figure 45).

Dans les essais utilisant le triplex de sondes Taqman, les ratios d'expression calculés en utilisant la sonde Taqman RAR β sont classés dans l'ordre suivant : A549(0.24) > H69(-0.40) > CML*(-2.06) > épiderme*(-2.21) > CEBHND*(-2.87) > BEAS-2B*(-3.8) (Figure 44). Les résultats obtenus avec la sonde Taqman RAR α sont classés comme cela : H1648(0.10) > épiderme(-0.22) > CML(-0.28) > A549(-0.31)

> H513(-0.55) > BEAS-2B(-0.72) > H2087(-0.74) > CEBHND(-1.35) > H2342(-1.80)
> H69(-1.92) ([Figure 45](#)).

Afin de comparer les résultats obtenus avec la sonde Taqman RAR β à ceux des essais de qRT-PCR Syber Green utilisant les amorces RAR β , un taux de variation spécifique (VR) a été calculé dans chaque tissu pour lequel les ratios d'expression RAR β obtenus sont significatifs dans les 2 types d'essais de qRT-PCR. Les valeurs des taux de variation ainsi calculées sont toutes inférieures à 25% ([Tableau 10](#)), confirmant ainsi que les ratios significatifs obtenus pour RAR β dans les 2 types d'essais de qRT-PCR sont cohérents.

Les ARNt extraits à partir des 12 échantillons de tumeurs bronchiques épidermoïdes (CBCSq) ont été analysés par qRT-PCR, selon la même méthodologie que celle décrite précédemment, en utilisant les amorces de la β -Actine pour les essais en Syber Green et le triplex de sondes Taqman. Les données brutes obtenues lors des essais de qRT-PCR sont présentées dans le [Tableau 11](#). Les valeurs R², comprises entre 0,96 et 0,99, permettent de valider la qualité des réplicats réalisés pour la gamme de dilution d'ADNc réalisée pour chaque échantillon tumoral. Les valeurs de déviations standards associées aux mTOP (SD<15%) et aux mAE (SD<10%) permettent quant-à elles de valider la reproductibilité de chaque essai de qRT-PCR.

Les amplicons de la β -Actine dans les essais en Syber Green ainsi que les amplicons de RAR α dans les essais utilisant le triplex de sondes Taqman ont été détectés dans tous les échantillons analysés. Les données brutes obtenues ont été exportées dans le logiciel Bestkeeper et, comme précédemment, la qualité des échantillons d'ARNt tumoraux a dans un premier été validée par le calcul de l'indice de qualité (InVar). Les résultats de l'analyse des données par Bestkeeper sont présentés dans le [Tableau 12](#). Les valeurs de SD inférieures à 1 obtenues pour la β -Actine (SD=0,89) et RAR α (SD=0,86) indiquent la stabilité d'expression de ces 2 gènes au travers des différents échantillons tumoraux analysés.

Tableau 11. Présentation des données brutes recueillies lors des expériences de qRT-PCR utilisant les échantillons de tumeurs CBCSq.

Patients	Sybr Green (n=9)					Taqman (n=6)														
	β-Actine					RARα					RARβ					RXRβ				
	mTOP	±SD	mAE	±SD	R ²	mTOP	±SD	mAE	±SD	R ²	mTOP	±SD	mAE	±SD	R ²	mTOP	±SD	mAE	±SD	R ²
1	18.10	2.20	1.76	0.04	0.997	27.00	4.00	1.60	0.06	0.993	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	16.60	1.70	1.66	0.04	0.996	24.20	2.00	1.66	0.09	0.997	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	17.10	1.90	1.81	0.03	0.996	24.10	1.80	1.66	0.12	0.998	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	17.70	3.20	1.69	0.03	0.993	25.80	4.60	1.64	0.09	0.962	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	17.70	2.90	1.69	0.03	0.995	25.10	3.50	1.60	0.03	0.980	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	17.20	2.90	1.68	0.03	0.970	25.80	4.60	1.60	0.04	0.980	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	20.20	1.60	1.84	0.03	1.000	27.60	2.90	1.70	0.09	0.994	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	17.70	2.30	1.69	0.03	0.998	26.20	3.70	1.60	0.13	0.989	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	17.50	1.60	1.67	0.03	0.990	25.20	2.50	1.57	0.05	0.986	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	15.80	1.80	1.80	0.05	0.997	23.80	1.80	1.62	0.11	0.997	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	19.30	1.30	1.69	0.04	0.987	25.60	2.10	1.58	0.07	0.994	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	19.10	1.80	1.68	0.02	0.999	25.80	2.20	1.64	0.04	0.997	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Av. mAE		1.72	0.03				1.62	0.08												

n : nombre total de réplicats amplifiés pour chaque échantillon, mTOP : moyenne des n valeurs de Take-Off Point définies par le logiciel du Rotorgene, mAE : moyenne des n valeurs d'efficacité d'amplification définies par le logiciel du Rotorgene, SD : Déviation Standard, R² : coefficient de corrélation, Av. mAE : moyenne globale de toutes les valeurs mAE, ND : Non Détectable. Les valeurs indiquées en caractères gras ont été utilisées par la suite dans le logiciel Bestkeeper pour analyser la stabilité d'expression et définir des gènes de référence.

Tableau 12. Présentation des résultats de l'analyse par Bestkeeper des données brutes de qRT-PCR obtenues pour les échantillons de tumeurs CBCSq.

		Gènes de référence		
		β-Actine	RARα	Index Bestkeeper
DONNÉES mTOP	N	12	12	12
	GM [mTOP]	17.80	25.49	21.30
	AM [mTOP]	17.83	25.52	21.33
	Min [mTOP]	15.80	23.80	19.39
	Max [mTOP]	20.20	27.60	23.61
	SD [±mTOP]	0.89	0.86	0.85
	CV[%mTOP]	5.02	3.39	3.97
ANALYSE DE RÉGRESSION (vs Index Bestkeeper)	r	0.965	0.917	
	r ²	0.931	0.841	
	p-value	0.001	0.001	

Pour chaque gène, le nombre d'échantillons analysés (N), les Moyennes Géométriques (GM) et les Moyennes Arithmétiques (AM) de toutes les valeurs de mTOP entrées, ainsi que les valeurs mTOP maximales (Max) et minimales (Min) sont indiquées avec leurs Déviations Standards (SD [± mTOP]) et leurs Coefficients de Variation (CV [%mTOP]). Les valeurs SD [± mTOP] significatives (< 1) sont indiquées en caractères gras. Les résultats obtenus pour l'analyse des données brutes de qRT-PCR obtenues avec les sondes Taqman sont surlignés en gris. L'index Bestkeeper a été calculé en utilisant la combinaison de la β-Actine et RARα comme gènes de référence. Pour chacun de ces deux gènes, les résultats de l'analyse de régression vs l'index Bestkeeper sont indiqués par un coefficient de corrélation (r), un coefficient de détermination (r²) ainsi qu'une probabilité de corrélation (p-values). Les résultats significatifs (p-value<0,05) sont indiqués en caractères gras.

L'index Bestkeeper calculé à partir de la combinaison des 2 gènes montre une SD de 0,89. Les expressions de la β -Actine et de RAR α présentent une bonne corrélation ($r=0,78$ et $p=0,003$). Une corrélation satisfaisante est également trouvée entre l'indice Bestkeeper et chaque gène utilisé pour son calcul ($r=0,96$ et $p=0,001$ pour la β -Actine; $r=0,92$ et $p=0,001$ pour RAR α) ([Tableau 12](#)). Les 2 gènes sont donc considérés comme des gènes de référence stables dans les échantillons tumoraux et leurs expressions pourraient être combinées afin de normaliser les résultats obtenus pour les autres gènes RR. Cependant, de façon intéressante, les amplicons correspondant à RAR β et RXR β n'ont été détectés dans aucun des échantillons analysés avec le triplex de sondes Taqman ([Tableau 11](#)).

B. ÉTUDE DE LA RÉGION GÉNOMIQUE RAR β

1. TRANSCRITS NON VALIDÉS SITUÉS DANS LA RÉGION GÉNOMIQUE RAR β

Les navigateurs génomiques de l'UCSC et d'Ensembl ont été consultés afin de représenter *in silico* une version mise à jour de la région génomique humaine de RAR β . Tous les transcrits répertoriés dans les banques ont été indexés, et les caractéristiques d'une éventuelle région promotrice RAR β additionnelle ont été recherchées.

Deux transcrits RAR β de références (Refseq), [GenBank:NM_000965] et [GenBank:NM_016152], sont répertoriés sur le brin + du chromosome 3 ([Figure 46](#)). Ces deux transcrits validés correspondent respectivement à l'isoforme 1 (longue) et à l'isoforme 2 (courte) de l'ARNm encodé par le promoteur P2-RAR β ; le promoteur de référence validé pour le gène RAR β . L'alignement des séquences associées aux deux transcrits permet d'observer que l'isoforme 2 est issue de l'épissage alternatif de l'isoforme 1 au niveau de son 3^{ème} exon. La protéine RAR β 2 [Swiss-Prot: P10826-2] est traduite à partir de l'isoforme 1 du transcrit RAR β , alors que l'isoforme 2 est à l'origine de la protéine RAR β 4 [Swiss-Prot: P10826-3].

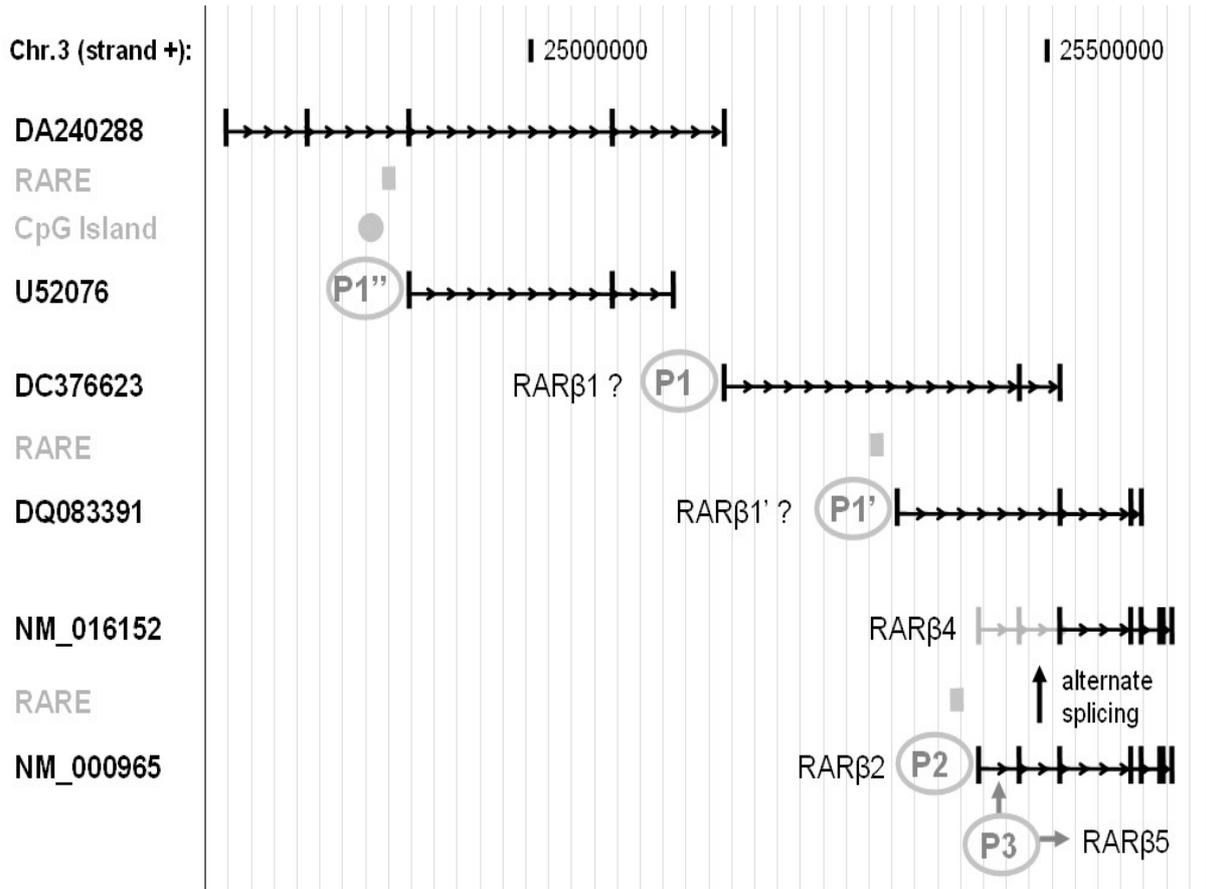


Figure 46. Représentation schématique de la région génomique humaine RAR β .

Les flèches noires représentent les introns associés aux différents transcrits alors que les blocs noirs représentent leurs exons. Les flèches et blocs en gris représentent les régions épissées non transcrites. Les régions promotrices étudiées sont entourées en gris. Les gros blocs gris indiquent des motifs de type RARE DR5 et le rond gris indique un îlot CpG.

NM_000965 et NM_016152 sont les transcrits RAR β de référence (Refseq) indiqués par la banque de séquence GenBank du NCBI. Ils correspondent respectivement aux isoformes de transcrits RAR β 1 (longue) et 2 (courte). NM_000965 encode la protéine RAR β 2 alors que NM_016152, qui résulte de l'épissage alternatif de NM_000965 au niveau de son exon 3, encode la protéine RAR β 4. DA240288 et DC376623 sont des ESTs. U52076 et DQ083391 sont des entrées ARNm GenBank. DC376623 et DQ083391 possèdent des premiers exons spécifiques et partagent les autres exons de leurs séquences respectives avec NM_000965.

Quatre autres transcrits, non validés, sont répertoriés dans la région génomique située en amont du promoteur P2-RAR β ([Figure 46](#)). [GenBank:DA240288] et [GenBank:DC376623] correspondent à des « Expressed Sequence Tags (ESTs) » alors que [GenBank:U52076] et [GenBank:DQ083391] sont des entrées ARNm référencées dans la banque de séquences Genbank du NCBI.

Deux de ces transcrits non validés : [GenBank:DC376623] et [GenBank:DQ083391], apparaissent particulièrement intéressants car chacun possède, dans sa séquence respective, un premier exon qui lui est spécifique. De plus, les autres exons inclus dans les séquences de ces 2 transcrits sont identiques à ceux appartenant à la séquence du transcrit de référence [GenBank:NM_000965] ([Figure 46](#)).

Des paires d'amorces de PCR spécifiques ont été dessinées pour chacun des transcrits non validés situés en amont de P2-RAR β . Leurs séquences sont indiquées dans le [Tableau 13](#). Les amorces ont été utilisées dans des expériences de PCR destinées à mettre en évidence la présence de ces transcrits dans différents échantillons d'ARNt précédemment extraits. Cependant, lors de l'analyse des produits de PCR obtenus sur gel d'agarose à 1%, aucun amplicon correspondant n'a pu être mis en évidence dans les échantillons d'ARNt testés : CEBHD, CEBHND, CML, A549, H2087, H2342, et BEAS-2B.

Tableau 13. Séquences des différentes amorces de PCR utilisées pour amplifier les transcrits situés en amont de P2-RAR β .

Amorces	GenBank Refseq	Isoforme reconnue	Séquences (5'-3') des amorces Sens (S) et Antisens (AS)	Taille de l'amplicon (pb)	Position dans l'ADNc
DA240288	-	-	(S) - GGAATGTCTCAAACAGTGG (AS) - ACAGGAAGGATGCTTTTCG	403	Exons 2+6
U52076	-	-	(S) - TCATCTGGAGGACTGTTC (AS) - AGTATGAAGTGGTTGAACTG	130	Exons 1+3
DC376623	-	-	(S) - GACACATGACTCACTATCC (AS) - ACATTCCTCACTCAAAGC	417	Exons 1+3
DQ083391	-	-	(S) - TGAGTAGAATTGCCTTTCC (AS) - GTACCCTGATGATTTGTCC	137	Exons 1+2

2. ANALYSE *in silico* DES RÉGIONS PROMOTRICES POTENTIELLES SITUÉES EN AMONT DES TRANSCRITS NON VALIDÉS

Les séquences des régions P1, P1' et P1'' ([Figure 46](#)), situées en amont des transcrits non validés (régions -1500/-50) ont été criblées *in silico* afin d'y déceler les éventuelles caractéristiques d'une région à activité promotrice (TATA Box, sites de liaisons de facteurs de transcriptions, etc). Aucune structure promotrice canonique n'a été décelée dans ces régions, mais des motifs de type RARE DR5 ont néanmoins été détectés dans les régions P1'' et P1', situées en amont des premiers exons respectifs associés aux transcrits [GenBank:U52076] et [GenBank:DQ083391] ([Figure 46](#)). De plus, un îlot CpG a également été mis en évidence dans la région P1'' ([Figure 46](#)).

Les analyses de génomique comparative *in silico* ont indiqué une conservation orthologue entre les séquences de la région promotrice murine P1-RAR β et celle de la région P1 située en amont de [GenBank:DC376623] ([Figure 46](#)). Cependant, aucun motif de type RARE et aucun îlot CpG n'ont été mis en évidence dans cette région. Une autre conservation orthologue intéressante a été découverte entre la séquence de la région P1' située en amont de [GenBank:DQ083391] ([Figure 46](#)), qui renferme un motif de type RARE, et celles des promoteurs RAR β du chimpanzé (*Pan troglodytes*) [Genomatix:GXP_1213141] (99% d'identité) et du singe rhésus (*Macaca mulatta*) [Genomatix CompGen promoter] (95% d'identité).

3. CLONAGE DE LA RÉGION CONSERVÉE P1'-RAR β

La région chromosomique suivante : [chr3:25,355,884-25,357,317], incluant la région conservée P1'-RAR β , a été amplifiée par PCR à partir de l'ADNg précédemment extrait de l'échantillon CEBHD. Les amorces de PCR dessinées ont été utilisées afin d'amplifier la région chromosomique dans son orientation sens (5'-3') et dans son orientation inverse (3'-5'). Ces amorces contiennent les sites de restriction enzymatiques MluI ou XhoI

permettant le clonage de l'amplicon dans un plasmide reporter d'activité promotrice de type pGL3.

Les amplicons P1'-RAR β sens et inverse (d'une taille initiale de 1434 pb) générés par PCR ([Figure 47](#)) ont d'abord été concentrés et purifiés sur colonne ([Figure 48](#)). Les extrémités 5' et 3' de ces amplicons ont ensuite été coupées à l'aide des enzymes de restriction MluI et XhoI afin de générer des inserts de clonage présentant des extrémités cohésives de type « bouts collants ». Le plasmide pGL3 étant également coupé par les 2 mêmes enzymes de restriction, il possède donc des extrémités cohésives complémentaires aux inserts de clonage; permettant ainsi de les intégrer au plasmide par ligation enzymatique.

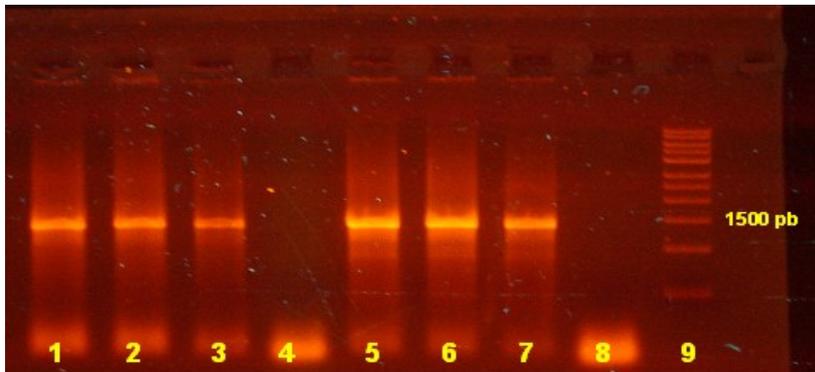


Figure 47. Visualisation des amplicons P1'-RAR β sens et inverse sur gel d'agarose à 1%.
1 à 3 : amplicons P1'-RAR β sens,
5 à 7 : amplicons P1'-RAR β inverse,
4 et 8 : blancs réactionnels,
9 : marqueur de taille.

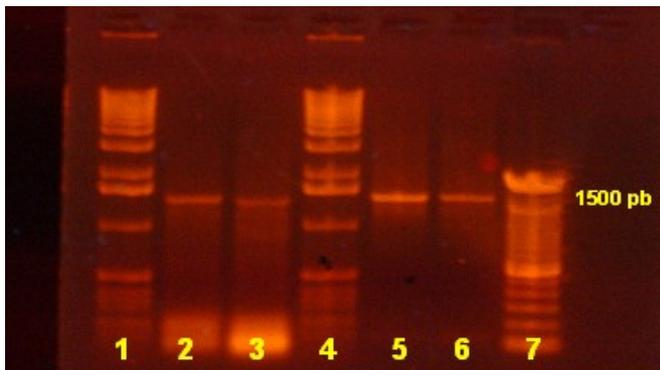


Figure 48. Visualisation sur gel d'agarose à 1% des amplicons P1'-RAR β sens et inverse avant et après purification sur colonne.
2 et 5 : amplicons P1'-RAR β sens avant et après purification sur colonne,
3 et 6 : amplicons P1'-RAR β inverse avant et après purification sur colonne,
1 et 7 : marqueurs de taille.

Les inserts P1'-RAR β sens et inverse (d'une taille de 1424 pb) ainsi que les plasmides pGL3 (d'une taille de 4807 pb) obtenus après coupure enzymatique ont alors été concentrés et purifiés sur colonne ([Figure 49](#)) avant de procéder à la réaction de ligation enzymatique.

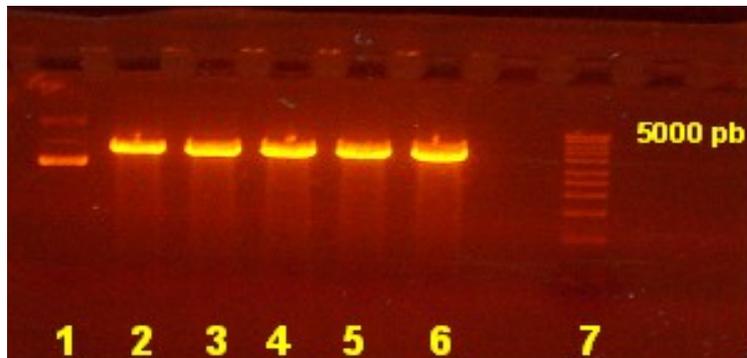


Figure 49. Visualisation sur gel d'agarose à 1% du plasmide pGL3 avant et après coupure enzymatique et purification.

1 : plasmide pGL3 basic.

2 à 6 : plasmide pGL3 après coupure par les enzymes de restriction MluI et XhoI

7 : marqueur de taille.

Les plasmides pGL3+P1'-RAR β sens et inverse (d'une taille de 6231 pb) générés après ligation des inserts ont ensuite été multipliés dans des bactéries *E.Coli* chimiocompétentes. Les contrôles réalisés lors de la transformation bactérienne ont permis de calculer une efficacité de transformation de l'ordre de 50% ($5 \cdot 10^8$ transformants par μg de plasmides) et aussi de confirmer l'absence de contamination des boîtes de Pétri ainsi que l'absence de bactéries non transformées résistantes à l'ampicilline.

Afin de vérifier que les bactéries repiquées contiennent bien le plasmide pGL3 d'intérêt, dans lequel est inclus l'insert P1'-RAR β sens ou inverse, l'ADN extrait des clones de bactéries repiquées a d'abord été analysé directement par PCR en utilisant les amorces RVprimer3 et GLprimer2 encadrant le site de clonage du plasmide dans lequel l'insert a été intégré ([Figure 50](#)).

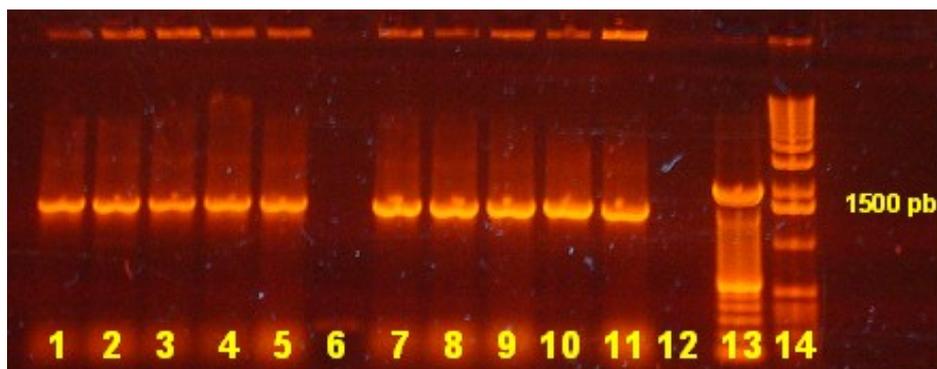


Figure 50. Visualisation sur gel d'agarose à 1% des amplicons P1'-RAR β sens et inverse obtenus à partir de l'ADN extrait des bactéries transformées.

1 à 5 : amplicons P1'-RAR β sens.

7 à 11 : amplicons P1'-RAR β inverse.

6 et 12 : blancs réactionnels.

13 et 14 : marqueurs de taille.

Les plasmides pGL3+P1'-RAR β d'intérêt ont finalement été purifiés des bactéries par miniprep. La taille des plasmides extraits a ensuite été contrôlée sur gel d'agarose par comparaison avec la taille du plasmide pGL3 basic ne contenant pas l'insert P1'-RAR β ([Figure 51](#)). Une réaction de coupure enzymatique des plasmides obtenus à l'aide des enzymes de restriction MluI et Xho I a également été réalisée afin de visualiser la taille de l'insert intégré dans chaque plasmide ([Figure 52](#)). Les séquences des inserts ainsi intégrés dans chaque plasmide ont finalement été vérifiées par séquençage.

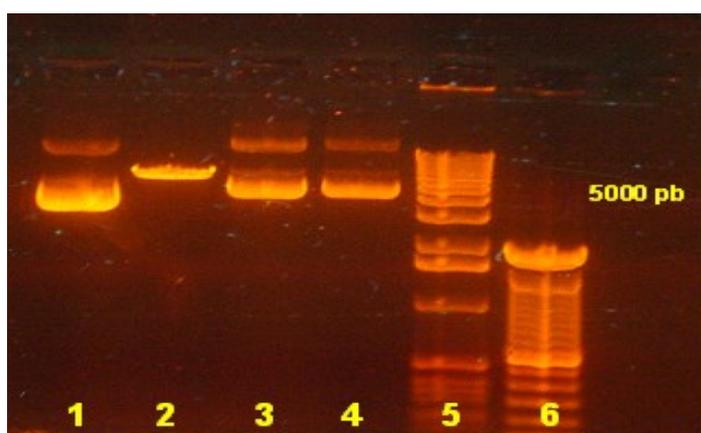


Figure 51. Visualisation sur gel d'agarose à 1% des plasmides extraits des bactéries par miniprep.

1 : plasmide pGL3 basic,

2 : plasmide pGL3 après coupure enzymatique Mlu I et Xho I,

3 : plasmide pGL3+P1'-RAR β sens,

4 : plasmide pGL3+P1'-RAR β inverse,

5 et 6 : marqueurs de taille.

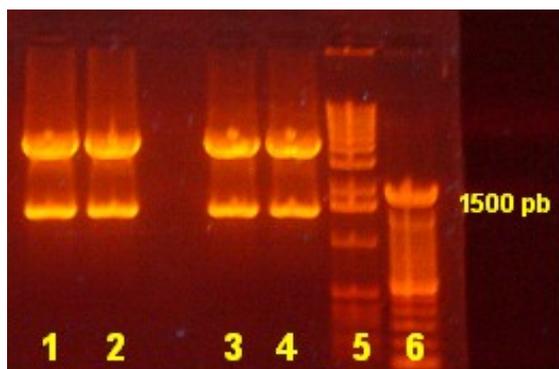


Figure 52. Visualisation sur gel d'agarose à 1% des fragments de restriction obtenus suite à la coupure des plasmides pGL3+P1'-RAR β sens et inverse par les enzymes de restriction Mlu I et Xho I.

1 et 2 : fragments de restrictions obtenus après coupure enzymatique du plasmide pGL3+P1'-RAR β sens par Mlu I et Xho I,

3 et 4 : fragments de restrictions obtenus après coupure enzymatique du plasmide pGL3+P1'-RAR β inverse par Mlu I et Xho I,

5 et 6 : marqueurs de taille.

4. ANALYSE *in vitro* DE L'ACTIVITÉ DE LA RÉGION PROMOTRICE POTENTIELLE P1'-RAR β

Afin de vérifier *in vitro* l'activité promotrice potentielle de la région conservée P1'-RAR β , les plasmides pGL3+P1'-RAR β sens et inverse ont été co-transfectés avec le plasmide contrôle pRL-TK dans les cellules BEAS-2B et MDA-MB-231.

8 conditions de transfection ont été testées simultanément et en triplicats dans chaque plaque de culture cellulaire. Deux plaques de culture identiques ont été réalisées pour chaque lignée cellulaire transfectée : une plaque a été utilisée pour la transfection des cellules pendant 24 h et l'autre pendant 48 h. Après la transfection des cellules, l'activité de la région promotrice P1'-RAR β a été quantifiée dans chaque puits par mesures successives des niveaux de fluorescence firefly luciférase (pGL3) et *Renilla* luciférase (pRL-TK).

Pour assurer une précision maximale des résultats, les mesures de fluorescence firefly et *Renilla* réalisées pour chacun des puits ont d'abord été corrigées par soustraction des bruits de fond de fluorescence (« background ») mesurés à partir des triplicats de cellules non transfectées de chaque plaque et traitées avec les mêmes réactifs. Les puits utilisés comme

contrôles négatifs (cellules transfectées uniquement avec le réactif de transfection) ont quant-à eux permis de démontrer l'absence de toxicité de l'agent de transfection. Les ratios de fluorescence firefly luciferase / *Renilla* luciferase ont alors été calculés pour chacun des puits.

Les ratios obtenus pour les différentes conditions de transfection des plasmides pGL3+P1'-RAR β sens et inverse (quantités de 1:1 ou de 10:1 par rapport au plasmide pRL-TK) ont ensuite été normalisés par la moyenne des ratios calculés pour les triplicats de puits utilisés comme contrôles positifs (pGL3 Basic + pRL-TK 1:1 ou pGL3 Basic + pRL-TK 10:1). Quels que soient le type cellulaire transfecté, le temps de transfection appliqué, ou le ratio de plasmides utilisé, aucune augmentation significative de la fluorescence firefly n'a été observée par rapport aux contrôles ([Tableau 14](#)) et aucune activité promotrice n'a donc pu être démontrée pour la région P1'-RAR β .

Tableau 14. Résultats des ratios de fluorescence firefly luciferase / *Renilla* luciferase obtenus suite à la transfection des cellules BEAS-2B et MDA-MB-231 par les plasmide pGL3+P1'-RAR β sens et inverse.

	BEAS-2B			
	p GL3+P1'-RAR β sens		p GL3+P1'-RAR β inverse	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Bruit de fond	0.12	0.09	0.15	0.11
Contrôle positif p GL3 Basic + pRL- TK 1:1	1.06	1.16	1.05	0.94
Contrôle positif p GL3 Basic + pRL- TK 10:1	1.10	1.20	0.98	0.92
p GL3+P1'-RARβ + pRL- TK 1:1	0.96	1.05	1.12	1.13
p GL3+P1'-RARβ + pRL- TK 10:1	1.07	1.20	1.15	1.06
p GL3+P1'-RARβ + pRL- TK 1:1 normalisé	0.91	0.91	1.07	1.20
p GL3+P1'-RARβ + pRL- TK 10:1 normalisé	0.97	1.00	1.17	1.15

	MDA-MB-231			
	p GL3+P1'-RAR β sens		p GL3+P1'-RAR β inverse	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Bruit de fond	0.14	0.15	0.07	0.17
Contrôle positif p GL3 Basic + pRL- TK 1:1	0.99	0.99	1.05	1.12
Contrôle positif p GL3 Basic + pRL- TK 10:1	0.95	1.04	1.09	1.13
p GL3+P1'-RARβ + pRL- TK 1:1	1.03	1.10	1.15	1.07
p GL3+P1'-RARβ + pRL- TK 10:1	1.07	1.13	1.17	1.15
p GL3+P1'-RARβ + pRL- TK 1:1 normalisé	1.04	1.11	1.10	0.96
p GL3+P1'-RARβ + pRL- TK 10:1 normalisé	1.13	1.09	1.07	1.02

Les résultats présentés sont les moyennes des ratios de fluorescence firefly luciferase / *Renilla* luciferase obtenus à partir des triplicats de puits réalisés pour chaque condition de transfection. Les mesures de fluorescence ont d'abord été corrigés par soustraction des bruits de fond de fluorescence. Les ratios obtenus pour les différentes conditions de transfection des plasmides pGL3+P1'-RAR β sens et inverse (quantités 1:1 ou 10:1 par rapport pRL-TK) ont ensuite été normalisés par la moyenne des ratios calculés pour les triplicats de puits utilisés comme contrôles positifs (pGL3 Basic + pRL-TK 1:1 ou pGL3 Basic + pRL-TK 10:1).

C. ÉTUDE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE NUCLÉAIRE DE RAR β

Afin de déterminer quelles sont les isoformes protéiques nucléaires RAR β exprimées dans les CEBHD et dans les cellules BEAS-2B, un nouvel anticorps anti-RAR β a été dessiné. Cet anticorps a pour cible spécifique la région protéique F2, commune à toutes les isoformes RAR β décrites dans les banques de séquences protéiques.

Les protéines nucléaires CEBHD et BEAS-2B ont été extraites et purifiées afin d'être analysées dans des expériences de western-blot et d'immunoprécipitation utilisant l'anticorps RAR β . Les résultats obtenus lors de ces expériences sont présentés dans la [Figure 53](#). Une seule bande est observée dans chaque cas. Par comparaison au marqueur de taille, cette bande possède un poids moléculaire d'environ 52 kDa, ce qui correspond à la masse décrite pour la protéine RAR β 2 [Swiss-Prot: P10826-2].

La spécificité de l'anticorps RAR β a été vérifiée par le séquençage des bandes obtenues. La séquence protéique résultant du séquençage est la suivante : SSADHRVRLDLG. Cette séquence, traduite à partir de l'exon 5 du transcrit Refseq [GenBank:NM_000965], est incluse dans le région protéique E, commune à toutes les protéines RAR β décrites, attestant ainsi de la spécificité de l'anticorps.

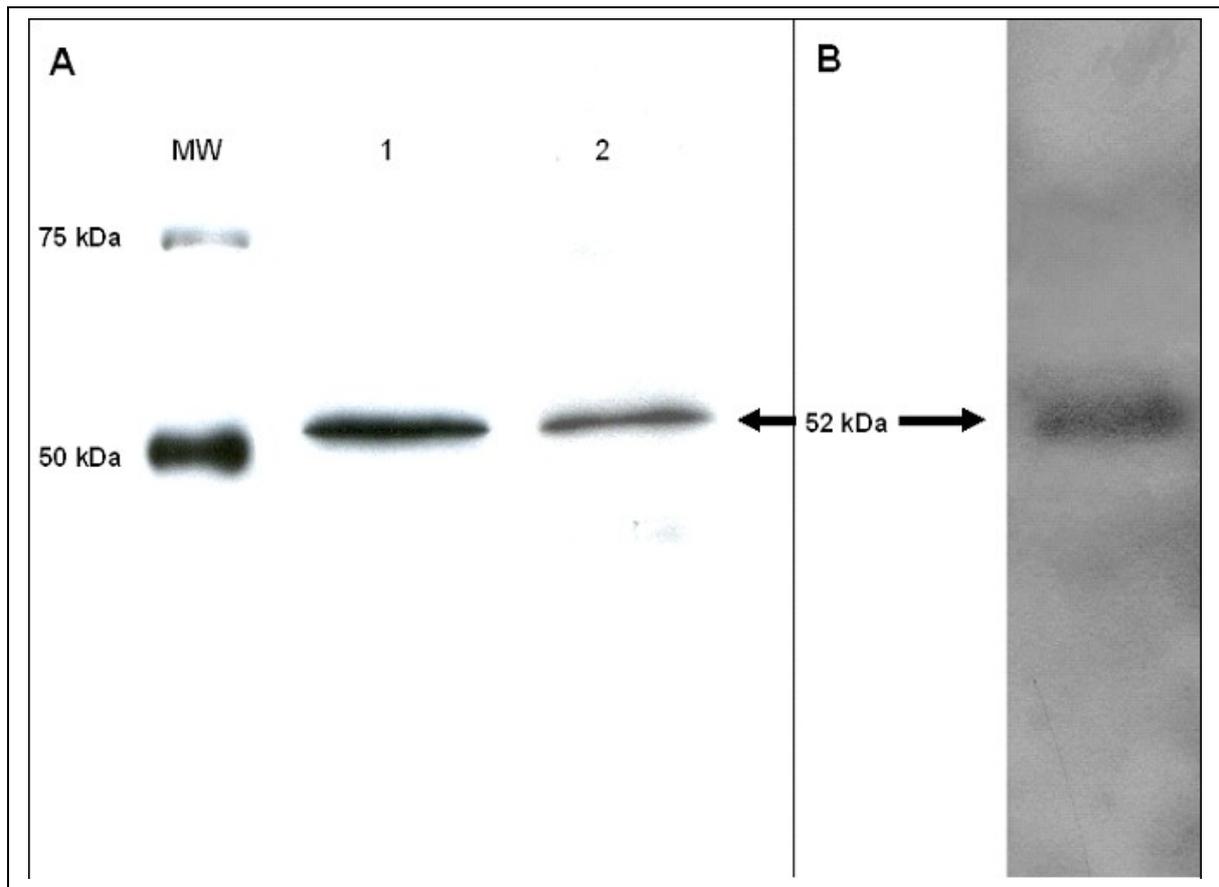


Figure 53. Résultats de l'analyse des extraits protéiques nucléaires BEAS-2B et CEBHD par western-blot et immunoprécipitation en utilisant le nouvel anticorps RAR β .

MW : marqueur de taille.

A : western-blot des extraits protéiques nucléaires BEAS-2B (ligne 1) et CEBHD (ligne 2).

B : immunoprécipitation des extraits protéiques nucléaires BEAS-2B.

DISCUSSION

Les différentes isoformes de transcrits et protéines encodées par le gène RAR β ont d'abord été décrites chez la souris. Deux promoteurs murins ont été caractérisés : P1-RAR β , qui encode les protéines RAR β 1 et RAR β 3, et P2-RAR β , encodant les protéines RAR β 2 et RAR β 4 ([Zelent et al., 1991](#); [Mollard et al., 2000](#)). Chez l'homme, ont ensuite été mises en évidence la protéine RAR β 2 [Swiss-Prot:P10826-2], encodée par le promoteur P2-RAR β , qui inclut un motif de type RARE DR5, et la protéine RAR β 4 [Swiss-Prot:P10826-3], issue de l'épissage alternatif de l'ARNm de RAR β 2 au niveau de son exon 3 ([Nagpal et al., 1992](#); [Chambon 1996](#)) ([Figure 46](#)).

Une isoforme humaine fœtale RAR β 1 [Swiss-Prot:P10826-1], aussi exprimée dans certains CBPCs, et dont l'ARNm possède une extrémité 5' spécifique, a également été décrite ([Houle et al., 1994](#)). Cependant, les équivalents du promoteur P1 murin et du transcrit murin RAR β 3 n'ont pas été caractérisés dans les cellules humaines.

L'isoforme RAR β 1', dont la séquence protéique n'est pas décrite, possède un premier exon spécifique dans sa séquence ARNm. Son expression a été rapportée dans les cellules bronchiques humaines normales et dans les cellules BEAS-2B normales sensibles à l'AR, mais elle est supprimée dans les cellules BEAS-2B résistantes à l'AR, dans certaines lignées cellulaires cancéreuses bronchiques et dans les tumeurs bronchiques ([Petty et al., 2005](#)). Une région promotrice distincte a été étudiée pour cette isoforme, elle correspond à la région P1'' indiquée sur la [Figure 46](#).

Une isoforme protéique RAR β 5 a également été mise en évidence dans les cellules mammaires normales et malignes, elle contribuerait à la résistance de ces dernières aux rétinoïdes ([Peng et al., 2004](#)). Cette isoforme RAR β 5 est encodée par le promoteur cryptique P3-RAR β , situé dans le premier intron du transcrit encodant la protéine RAR β 2 ([Peng et al., 2004](#)) ([Figure 46](#)).

Partant de ces descriptions, nous avons interrogé les navigateurs génomiques afin de rassembler les dernières données mises à jour concernant le gène RAR β et reconstituer ainsi *in silico* l'organisation de sa région chromosomique étendue ([Figure 46](#)). Tous les transcrits connus de la région ont été indexés et les caractéristiques d'une éventuelle région promotrice RAR β additionnelle ont également été recherchées.

Deux transcrits de référence (transcrits Refseq) : [GenBank:NM_000965] et [GenBank:NM_016152], sont répertoriés pour RAR β sur le brin + du chromosome 3. Ils correspondent respectivement à la longue isoforme 1, encodant la protéine RAR β 2 [Swiss-Prot:P10826-2], et à l'isoforme 2 courte encodant la protéine RAR β 4 [Swiss-Prot:P10826-3]. Ces isoformes sont toutes les deux transcrites à partir du promoteur P2-RAR β , précédemment décrit et caractérisé ([de Thé et al., 1990](#)). Elles ont été détectées dans tous les échantillons testés à l'aide de nos paires d'amorces spécifiques RAR β et RAR β 2 dans les essais de qRT-PCR utilisant le Syber Green ([Tableau 7](#), [Figure 46](#)).

Dans les banques de séquences génomiques, aucun transcrit de référence n'est associé aux isoformes RAR β 1, RAR β 1' ou RAR β 5. Cependant, 2 transcrits non validés situés dans la région génomique en amont de P2-RAR β , [GenBank:DC376623] et [GenBank:DQ083391], sont apparus particulièrement intéressants car chacun possède dans sa séquence respective un premier exon qui lui est spécifique. Les autres exons inclus dans les séquences de chacun de ces transcrits sont par ailleurs identiques à ceux décrits pour le transcrit de référence [GenBank:NM_000965] ([Figure 46](#)).

[GenBank:DQ083391] est présenté dans les banques de séquences comme un ARNm contenant la séquence codante partielle de RAR β 1'. De façon intéressante, les amorces de qRT-PCR, utilisés précédemment par [Petty et al.](#) en 2005 pour mettre en évidence l'isoforme RAR β 1' dans les cellules BEAS-2B et dans les cellules bronchiques humaines normales, sont localisées dans les exons 1 et 2 de ce transcrit.

Cependant, en utilisant les amorces spécifiques de qRT-PCR que nous avons dessinées pour chaque transcrit non validé situé en amont de P2-RAR β ([Tableau 13](#)), aucun amplicon correspondant n'a pu être mis en évidence dans les cellules testées : CEBHD, CEBHND, CML, A549, H2087, H2342 et BEAS-2B. Ceci est apparu particulièrement surprenant dans le cas de [GenBank:DQ083391] car les amorces de qRT-PCR que nous avons dessinées sont localisées à la jonction des exons 1 et 2 de ce transcrit et chevauchent celles utilisées précédemment pour amplifier RAR β 1' ([Petty et al., 2005](#)).

Les séquences situées en amont de chacun des transcrits non validés ont été analysées à l'aide d'outils bioinformatiques disponibles en ligne sur Internet. Aucune structure promotrice canonique n'a été mise en évidence mais des motifs dégénérés de type RARE DR5 ont été détectés dans les séquences situées en amont de [GenBank:U52076] et [GenBank:DQ083391], à proximité de leurs premiers exons respectifs. Un îlot CpG a également été mis en évidence dans la séquence en amont de [GenBank:U52076]. Cette dernière région, indiquée P1'' sur la [Figure 46](#), correspond à celle précédemment explorée par [Petty et al.](#) (2005) et n'a pas été réétudiée *in vitro* dans cette étude. Cependant, nous avons recherché d'autres régions promotrices RAR β alternatives.

Les analyses de génomique comparative réalisées *in silico* ont indiqué une conservation orthologue entre la région promotrice murine P1-RAR β et la région située en amont de [GenBank:DC376623]. Cette région, indiquée P1 sur la [Figure 46](#), correspond à la région précédemment amplifiée par [Houle et al.](#) en 1994 lorsqu'ils ont cloné l'extrémité 5' de l'ADNc correspondant à RAR β 1. Une autre conservation orthologue intéressante a été mise en évidence entre la région située en amont de [GenBank:DQ083391], indiquée P1' sur la [Figure 46](#), avec les régions promotrices RAR β du chimpanzé (*Pan troglodytes*) [Genomatix:GXP_1213141] (99% d'identité) et du singe rhésus (*Macaca mulatta*) [Genomatix CompGen promoter] (95% d'identité).

Cette potentielle région promotrice conservée P1'-RAR β , qui renferme également un motif de type RARE DR5, a été étudiée *in vitro* par clonage et transfection dans les lignées cellulaires BEAS-2B et MDA-MB-231. Aucune activité promotrice n'a cependant pu être démontrée expérimentalement. Ceci pourrait être dû à la faible activité de la région promotrice P1'-RAR β , empêchant ainsi sa mise en évidence dans des conditions expérimentales classiques, utilisant des procédures standards. Une stimulation des cellules transfectées par ajout de quantités conséquentes d'AR dans le milieu de culture, ainsi que l'utilisation d'outils de détection de la fluorescence plus sensibles, pourraient en ce sens contribuer à améliorer les conditions expérimentales permettant la mise en évidence de l'activité promotrice de cette région P1'. Par ailleurs, il apparaîtrait également intéressant d'étudier cette région à l'aide d'un plasmide d'expression contenant dans sa séquence un promoteur de type eucaryote. Le clonage de la région P1'-RAR β en amont de ce promoteur permettrait de déterminer *in vitro* si cette région contient des éléments régulateurs de l'expression génique.

Dans cette étude, nous avons également procédé à la quantification relative des différents ARNm RRs dans les tissus bronchiques normaux et tumoraux, ainsi que dans plusieurs lignées cellulaires de cancers bronchiques. Les résultats obtenus dans les essais de qRT-PCR Syber Green ont été comparés à ceux obtenus dans les essais utilisant un triplex de sondes Taqman, conçu pour économiser les échantillons d'ARN rares et précieux, et ciblant 3 RRs en une seule réaction : RAR α , RAR β et RXR β .

La qRT-PCR est une méthode de choix pour la quantification des transcrits ARNm. Lorsque toutes les étapes de cette technique sont strictement contrôlées, celle-ci offre, en effet, une grande sensibilité de détection, une bonne reproductibilité dans les expériences, ainsi qu'une large gamme de quantification ([Nolan et al., 2006](#)). Tout débute par le recueil et

la prise en charge des échantillons, se poursuit par le choix des amorces et des sondes utilisées et se termine par une analyse performante des données obtenues.

Nous avons choisi la méthode décrite par [Pfaffl et al.](#) en 2001 afin de déterminer les expressions relatives des différents ARNm RRs. Cette méthode permet de procéder à une normalisation fiable des données brutes de qRT-PCR. Celles-ci sont simultanément normalisées par plusieurs gènes de référence (réunis dans un index de normalisation) ([Pfaffl et al., 2004](#)) et par un échantillon de référence utilisé comme contrôle. De telles normalisations sont, en effet, très importantes, en particulier lorsque les niveaux d'expression de différents gènes sont comparés entre plusieurs échantillons.

Dans la méthode décrite par [Pfaffl et al.](#), le calcul de chaque ratio d'expression est basé sur la différence entre les valeurs de cycle seuil (ΔC_t ou $\Delta mTOP$) obtenue entre l'échantillon analysé et l'échantillon de référence ([Pfaffl et al., 2002](#)). De plus, les efficacités de qRT-PCR (E ou mAE) sont prises en compte et intégrées dans le calcul des ratios d'expression, ce qui n'est pas le cas pour d'autres méthodes de quantification relative comme la méthode des deux courbes standard ou la méthode $\Delta\Delta C_t$ ([Bustin, 2000](#); [Rasmussen, 2001](#)). La prise en compte de ces efficacités est effectivement très importante, étant donné les variabilités qui existent, d'une part, entre les efficacités d'amplification des différentes paires d'amorces et, d'autre part, au niveau de la qualité des différents échantillons d'ARN analysés.

Dans tous les échantillons testés en qRT-PCR Syber Green, la quantité relative d'amplicons trouvée pour RAR β a toujours été plus importante que la quantité relative d'amplicons RAR β 2 ([Figure 44](#)). Ceci est cohérent avec le fait que les amorces RAR β 2 dessinées ont pour cible spécifique l'isoforme 1 longue du transcrit P2-RAR β alors que les amorces RAR β ciblent simultanément toutes les isoformes ARNm RAR β présentes dans l'échantillon.

Les niveaux relatifs d'amplicons RAR β et RAR β 2 observés dans chaque échantillon analysé, ont toujours été trouvés moins abondants par rapport à l'échantillon contrôle de référence CEBHD ([Figure 44](#)). Ceci, en particulier dans le cas de l'échantillon CEBHND, signifiant ainsi qu'une augmentation de l'expression du gène RAR β accompagne le processus normal de différenciation de l'épithélium bronchique.

Par ailleurs, les niveaux relatifs d'amplicons RAR β et RAR β 2 calculés dans les cellules différenciées de l'épiderme et dans les CML sont proches de ceux observés dans les CEBHND, et ils sont aussi significativement inférieurs aux niveaux d'amplicons contenus dans l'échantillon de référence CEBHD ([Figure 44](#)), soulignant ainsi l'importance de RAR β dans les cellules bronchiques.

D'importantes sous-expressions significatives de RAR β ont été observées dans le lignées cellulaires cancéreuses bronchiques H1648, H2087 et H2342, en utilisant les amorces RAR β et RAR β 2 ([Figure 44](#)). Ceci confirme l'existence d'une dérégulation génique de RAR β dans les CBNPCs ([Picard et al., 1999](#); [Khuri et al., 2000](#); [Chang et al., 2004](#); [Xu, 2007](#)). De telles sous-expressions n'ont cependant pas été observées dans les lignées cellulaires H69 (CBPC) et A549 (ADC), dans lesquelles les niveaux d'amplicons RAR β et RAR β 2 quantifiés correspondent à ceux observés dans les CEBHD.

Dans les lignées H1648, H2087, H2342 et H513 la diminution du nombre d'amplicons RAR β et RAR β 2 a pu être quantifiée dans les essais de qRT-PCR Syber Green mais pas dans les essais utilisant le triplex de sondes Taqman (absence de courbes d'amplification interprétables) ([Figure 33](#)).

Il est en effet difficile de dessiner un modèle de Taqman multiplex incluant à la fois une sonde spécifique pour un gène de ménage comme la β -Actine et des sondes spécifiques de gènes peu exprimés comme le sont les RRs. L'écart d'expression existant entre ces 2 types de gènes est tellement grand que dans les dilutions d'ADNc pour lesquelles les RRs

deviennent détectables, les quantités de β -Actine sont encore tellement importantes que la réaction de qRT-PCR destinée à amplifier ce gène s'en trouve inhibée.

L'essai de Taqman triplex a été conçu initialement afin d'économiser les échantillons d'ARN rares et précieux en amplifiant simultanément 3 gènes RRs dans une seule réaction de qRT-PCR. Étant donné que les réactions de qRT-PCR Syber Green consomment une quantité 2 fois plus importantes de cDNA pour amplifier un seul gène RR, alors que le triplex de Taqman en amplifie 3 à la fois, la sensibilité des essais de qRT-PCR utilisant les sondes Taqman est de ce fait au moins 2 fois plus importante que celle des essais réalisés en Syber Green.

Les ratios d'expression calculés pour les gènes $RAR\alpha$, $RAR\gamma$ et $RXR\alpha$ dans les différents échantillons analysés sont tous associés à de fortes erreurs standards ([Tableau 10](#), [Figure 45](#)). Les niveaux d'expression obtenus pour ces gènes n'ont donc pas pu être considérés significativement différents de ceux observés dans l'échantillon de référence CEBHD. L'importance des erreurs standards obtenues est principalement due au mode de calcul utilisé par le logiciel, qui est basé sur la variance des valeurs de mTOP entrées pour chaque gène, et non sur l'écart-type de ces valeurs, ce qui a pour effet d'amplifier les erreurs. La significativité des résultats obtenus pour le gène $RAR\beta$ se trouve cependant renforcée par le biais de cette méthode de calcul. D'autres logiciels de quantification sont disponibles gratuitement sur internet, comme par exemple le logiciel Genorm ([Vandesompele et al., 2002](#)), mais nous avons choisi d'utiliser le logiciel REST-RG ([Pfaffl et al., 2002](#)) car il est tout particulièrement adapté pour l'analyse des résultats bruts de qRT-PCR (TOP et AE) obtenus avec le Rotorgene 6000.

Malgré l'absence de significativité due à leurs erreurs standards, les niveaux d'expression de $RAR\alpha$ observés au travers des différents échantillons sont néanmoins très peu variables et proches de ceux observés dans l'échantillon de référence ([Tableau 10](#),

[Figure 45](#)). Ceci confirme les faibles valeurs de SD précédemment trouvées pour ce gène lors de l'utilisation du logiciel Bestkeeper ([Pfaffl et al., 2004](#)) ([Tableau 9](#)). Les valeurs des ratios d'expression RAR α obtenues pour les lignées où ce gène est trouvé faiblement sous-exprimé (H69, H2342, CEBHND, H2087, H513, A549 et BEAS-2B) dans les essais en Syber Green sont, par ailleurs, cohérentes avec celles obtenues pour les mêmes lignées en utilisant le triplex de sondes Taqman ([Tableau 10](#), [Figure 45](#)). Dans les cellules de l'épiderme, les CML et la lignée H1648, les niveaux d'amplicons RAR α obtenus sont proches de ceux observés dans l'échantillon contrôle CEBHD mais les ratios d'expression calculés varient cependant entre les 2 types d'essais de qRT-PCR ([Tableau 10](#), [Figure 45](#)).

Les gènes RAR α , RAR γ et RXR α ont tous été trouvés sur-exprimés dans les cellules de l'épiderme par rapport aux autres échantillons. D'importants niveaux d'expressions protéiques associés à ces 3 RRs ont aussi été décrits dans le même type de tissu ([Xu et al., 2001](#)).

Des sous-expressions significatives des ARNm RXRs ont été précédemment décrites dans des échantillons de tumeurs bronchiques par comparaison aux niveaux d'expression correspondants observés dans les tissus normaux appariés à ces tumeurs ([Brabender et al., 2002](#)). Le gène RXR β a ainsi été décrit comme un biomarqueur d'agressivité pour les cancers bronchiques non à petites cellules ([Brabender et al., 2005](#)). Même s'il est à noter que les séquences des amorces et des sondes publiées dans ces études n'ont pas été retrouvées dans les séquences des ARNm RRs correspondants lors de l'alignement, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans cette étude lors de l'analyse des 12 échantillons de tumeurs bronchiques épidermoïdes à cellules squameuses (CBCSq). En effet, de façon intéressante, bien que les ARNm de la β -Actine et de RAR α aient été détectés dans tous les échantillons analysés, aucun signal n'a été détecté pour les gènes RAR β et RXR β dans ces mêmes

échantillons avec le triplex de sondes Taqman. Ceci suggère une importante sous-expression concomitante de ces 2 gènes dans les tumeurs bronchiques épidermoïdes étudiées.

Par ailleurs, dans toutes les lignées cellulaires analysées dans cette étude, les niveaux d'expression des ARNm RXR α et RXR β n'ont jamais été trouvés significativement différents de ceux observés dans les cellules normales de l'échantillon contrôle CEBHD. L'expression ARNm du gène RXR β a même été démontrée stable au travers des différents échantillons analysés à l'aide du logiciel Bestkeeper, et ceci pour les 2 types d'essais de qRT-PCR. Dans ce contexte, le gène RXR β a donc été considéré comme un gène de référence fiable pour la normalisation des données de qRT-PCR obtenues lors de l'analyse des différentes lignées cellulaires étudiées.

Des résultats contradictoires ont été obtenus dans les expériences de western-blot utilisant différents anticorps commerciaux RAR β réalisées au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nancy, avec apparition dans certains cas de bandes additionnelles attribuées à la phosphorylation ou à la dégradation des protéines RAR β . Un nouvel anticorps RAR β a donc été dessiné et validé expérimentalement. Cet anticorps a pour cible spécifique la région protéique F2, commune à toutes les isoformes protéiques RAR β . Ce nouvel anticorps a été utilisé dans des expériences de western-blot et d'immunoprécipitation réalisées à partir d'extraits protéiques nucléaires de CEBHD et de cellules BEAS-2B ([Figure 53](#)).

Une seule bande protéique a été observée dans chaque cas. D'une taille de 52 kDa, cette bande correspond à la taille précédemment décrite pour la protéine RAR β 2, traduite à partir de la longue isoforme 1 du transcrit P2-RAR β ([Nagpal et al., 1992](#)). De plus, dans les banques de données protéiques, RAR β 2 est indiquée comme une isoforme à localisation exclusivement nucléaire. La protéine RAR β 4, traduite à partir de l'isoforme 2 du transcrit P2-RAR β , et dont la taille a été précédemment décrite à 37 kDa ([Nagpal et al., 1992](#)), est

quant-à elle indiquée comme une isoforme cytoplasmique de RAR β dans les cellules normales ([Sommer et al., 1999](#)).

En accord avec ces descriptions, la protéine RAR β 4 n'a pas été détectée par l'anticorps RAR β dans les extraits protéiques nucléaires CEBHD et BEAS-2B analysés. La protéine RAR β 1' a, quant-à elle, été précédemment caractérisée à partir d'extraits de protéines totales issus de cellules BEAS-2B ([Petty et al., 2005](#)). Cette isoforme a été décrite avec une taille d'environ 47 kDa. Cependant, la séquence spécifique de RAR β 1' n'a pas été décrite et aucune référence correspondant à cette isoforme n'est indiquée dans les banques de données protéiques. Par ailleurs, l'isoforme RAR β 1' n'a également pas été détectée par l'anticorps RAR β dans les extraits protéiques nucléaires CEBHD et BEAS-2B.

Ces résultats suggèrent que, si l'isoforme protéique RAR β 1' est effectivement exprimée dans les cellules bronchiques normales et dans les cellules BEAS-2B, celle-ci serait localisée dans le compartiment cytoplasmique de ces cellules.

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons montré la conception et la validation de différents outils moléculaires destinés à l'étude de l'expression des RRs afin d'accroître les connaissances de base sur les rétinoïdes et ainsi mieux comprendre les mécanismes fondamentaux à l'origine de leur signalisation dans les cellules bronchiques. Ceci constitue, en effet, un préalable nécessaire avant de procéder à de nouveaux essais cliniques de chimioprévention des cancers bronchiques utilisant les rétinoïdes.

Nous avons établi les valeurs de référence pour l'expression ARNm des RRs dans les cellules bronchiques normales et nous avons quantifié leurs expressions relatives dans les cellules tumorales ainsi que dans différentes lignées de cellules cancéreuses bronchiques. Les résultats obtenus dans les expériences de qRT-PCR réalisées en Syber Green ont été comparés à ceux obtenus avec un triplex de sondes Taqman, permettant ainsi sa validation. Cet outil a été conçu afin d'économiser les échantillons d'ARN rares et précieux stockés dans les banques de tissus en amplifiant 3 gènes RRs dans une seule réaction de qRT-PCR.

Le gène $RAR\beta$ est le seul gène RR dont l'expression ARNm a été démontrée significativement différente entre les cellules bronchiques normales différenciées et les cellules bronchiques tumorales. Les deux transcrits de référence décrits pour $RAR\beta$ ont été détectés dans tous les échantillons analysés, l'isoforme longue du transcrit P2- $RAR\beta$ étant l'isoforme majeure exprimée dans les cellules bronchiques. Les plus hauts niveaux d'amplicons $RAR\beta$ ont été observés dans les cellules bronchiques différenciées, soulignant ainsi l'importance du gène dans le métabolisme de ces cellules et signifiant qu'une augmentation de l'expression de $RAR\beta$ accompagne la différenciation normale de l'épithélium bronchique.

La sous-régulation de $RAR\beta$ est un événement connu du processus de cancérisation des cellules bronchiques qui a déjà été décrit précédemment. La sous-expression concomitante de ce gène avec $RXR\beta$, que nous avons montrée dans les échantillons de

tumeurs bronchiques épidermoïdes à cellules squameuses, suggère le possible rôle de ce RR en tant que partenaire d'hétérodimérisation pour RAR β dans les cellules épithéliales bronchiques. Une telle sous-expression concomitante n'a cependant pas été observée dans les lignées cellulaires cancéreuses étudiées, dans lesquelles l'expression de RXR β a même été démontrée stable et comparable à celle observée dans les cellules bronchiques normales. Ces résultats posent une interrogation concernant l'utilisation de lignées cellulaires modifiées en tant que modèle d'étude *in vitro*.

Les banques de données génomiques ont été interrogées afin de rassembler les dernières données mises à jour concernant le gène RAR β et reconstituer ainsi *in silico* l'organisation de sa région chromosomique étendue. À partir de ces données, nous avons recherché l'existence d'isoformes ARNm RAR β supplémentaires dans différents échantillons et nous avons aussi étudié *in vitro* l'activité d'une potentielle région promotrice conservée additionnelle pour RAR β . Aucune preuve tangible de l'existence de tels transcrits additionnels ou de l'activité de la région promotrice étudiée n'ont néanmoins pu être démontrées expérimentalement.

Les résultats obtenus sont apparus particulièrement contradictoires concernant l'isoforme RAR β 1', qui a été décrite à partir des mêmes types d'échantillons cellulaires que ceux qui ont été analysés dans cette étude. Cette contradiction a été renforcée par les résultats obtenus dans les expériences de western-blot et d'immunoprécipitation utilisant un nouvel anticorps RAR β , conçu afin de reconnaître spécifiquement et simultanément toutes les isoformes protéiques RAR β décrites dans les banques de séquences protéiques. Seule la protéine RAR β 2 a été détectée par l'anticorps dans les extraits protéiques nucléaires analysés. Des expériences complémentaires utilisant le même anticorps devront être réalisées afin de déterminer la présence éventuelle d'autres isoformes protéiques (RAR β 4 ou RAR β 1') dans le compartiment cytoplasmique de ces cellules.

Des isoformes tronquées de la protéine RAR β , possédant une « activité tumorigénique » ont, de façon intéressante, été décrites sur-exprimées dans les cellules malignes ([Swift et al., 2006](#)). Ces isoformes tronquées entreraient en compétition avec RAR β 2 dans le compartiment nucléaire des cellules cancéreuses, inhibant ainsi les fonctions cellulaires essentielles attribuées au gène RAR β . Ceci aurait pour conséquences d'induire la prolifération cellulaire et de contribuer à la résistance des cellules cancéreuses au traitement par les rétinoïdes.

De futurs travaux, utilisant les outils validés dans cette étude, et focalisés sur les niveaux d'expression et les localisations subcellulaires des différentes isoformes de RRs pourraient être conduits afin de renforcer nos connaissances sur les mécanismes moléculaires à l'origine du processus de cancérisation des cellules bronchiques. La recherche de micro-ARNs spécifiques de chaque transcrit RR ainsi que des expériences d'interférence ARN visant à inhiber l'expression de ces différents transcrits dans des cellules bronchiques, ou encore des expériences visant à sur-exprimer *in vitro* des versions normales ou tronquées de protéines RRs, seraient en ce sens également informatives et d'un grand intérêt.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A :

* Abu-Abed S, Dollé P, Metzger D, et al. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* 2001;15:226-40.

* Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Apports nutritionnels conseillés pour la population Française, 3^e édition, Ed. Tec&Doc.

- B :

* Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 2004;328:1-16.

* Benbrook D, Lernhardt E, Pfahl M. A new retinoic acid receptor identified from a hepato cellular carcinoma. *Nature* 1988;333:669-72.

* Bérard J, Laboune F, Mukuna M, et al. Lung tumors in mice expressing an antisense RARbeta2 transgene. *FASEB J* 1996;10:1091-7.

* Berg J, Aase S, Soland TH, et al. The value of cytology in the diagnostics of lung cancer. *APMIS*. 2005;113(3):208-12.

* Bilello KS, Murin S, Matthay RA. Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. *Clin Chest Med*. 2002;23(1):1-25.

* Blaner WS, Olson JA. Retinol and Retinoic Acide Metabolism. In: *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medecine*, 2nd Edition. Raven Press, 1994:229-255.

* Boissan M, Poupon MF, Lacombe ML. NM23 et les gènes suppresseurs de métastases. *Med Sci*. 2007; 23(12).

* Boisvieux-Ulrich E, Le Pechon-Vallée C, Million K, et al. Differential effects of several retinoid receptor-selective ligands on squamous differentiation and apoptosis in airway epithelial cells. *Cell Tissue Res* 2000;300:67-81.

* Borel P, Drai J, Faure H, et al. Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids. *Ann Biol Clin (Paris)* 2005;63:165-77.

* Bowman R, Clarke B, Duhig E, et al. Re: Effects of N-(4-hydroxy-phenyl)retinamide on hTERT expression in the bronchial epithelium of cigarette smokers. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:949-50.

* Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, et al. The role of retinoid X receptor messenger RNA expression in curatively resected non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:438-43.

* Brabender J, Metzger R, Salonga D, et al. Comprehensive expression analysis of retinoic acid receptors and retinoid X receptors in non-small cell lung cancer: implications for tumor development and prognosis. *Carcinogenesis* 2005;26:525-30.

* Brand N, Petkovich A, Krust A, et al. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* 1988;332:850-53.

* Brambilla E, Travis WD, Colby TV, et al. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J*. 2001;18(6):1059-68.

* Brooks DE, Ausin JH, Heelan RT, et al. Influence of type cigarette on peripheral versus central lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(3):576-81.

* Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-93.

- C :

* Ceci JD, Kingsley DM, Silan CM, Copeland NG, Jenkins NA. A molecular genetic backcross linkage map of the proximal half of mouse chromosome 14. *Genomics* 1990, 6 : 373-378.

* Cerosimo BJ. Lung cancer: a review. *Am J Health Syst Pharm*. 2002;59(7):611-42.

* Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996;10:940-54.

* Chang YS, Chung JH, Shin DH, et al. Retinoic acid receptor-beta expression in stage I non-small cell lung cancer and adjacent normal appearing bronchial epithelium. *Yonsei Med J* 2004;45:435-42.

* Chen LI, Sommer KM, Swisshelm K. Downstream codons in the retinoic acid receptor beta -2 and beta -4 mRNAs initiate translation of a protein isoform that disrupts retinoid-activated transcription. *J Biol Chem* 2002;277:35411-21.

* Cooper DA, Eldridge AL, Peters JC. Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: a review of recent research. *Nut Rev* 1999;57:201-14.

* Côté S, Sinnett D, Momparler RL. Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 1998;9:743-50.

- D :

* Dasgupta P, Kinkade R, Joshi B, et al. Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and surviving. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(16):6332-7.

* Dawson MI. The importance of vitamin A in nutrition. *Curr Pharm Des* 2000;6:311-25.

* Doll R. Mortality from lung cancer in asbestos workers. *Br J Ind Med*. 1955;12(2):81-6.

* Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung: preliminary report. *Br Med J*. 1950;2(4682):739-48.

* Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 2000;267:4315-24.

* Dupé V, Ghyselinck NB, Wendling O, et al. Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development* 1999;126:5051-9.

- F :

* Farias EF, Arapshian A, Bleiweiss IJ, et al. Retinoic acid receptor alpha2 is a growth suppressor epigenetically silenced in MCF-7 human breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 2002;13:335-41.

* Fleischhauer K, Park JH, di Santo JP, et al. Isolation of a full-length cDNA clone encoding a N-terminally variant form of the human retinoid X receptor β . *Nucleic Acid Res* 1992;20:1801.

* Fong KM, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*. 2002;23(1):83-101.

* Formelli F, Barua AB, Olson JA. Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl beta-glucuronide. *FASEB J* 1996;10:1014-24.

* Friedrich U, Lenke J. Improved enumeration of lactic acid bacteria in mesophilic dairy starter cultures by using multiplex quantitative real-time PCR and flow cytometry-fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:4163-71.

* Furukawa K, Kato H, Konaka C, et al. Locally recurrent central-type early stage lung cancer <1.0 cm in diameter after complete remission by photodynamic therapy. *Chest*. 2005;128(5):3269-75.

- G :

* Ghyselinck NB, Bavik C, Sapin V, et al. Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J* 1999;18:4903-14.

* Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Immunologie, le cours de Janis Kuby*. New York: W.H. Freeman, 2000, 660 p.

* Gottesman ME, Quadro L, Blaner WS. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 2001;23:409-19.

* Gouveia J, Mathe G, Hercend T, et al. Degree of bronchial metaplasia in heavy smokers and its regression after treatment with a retinoid. *Lancet* 1982;1:710-2.

* Gouyer V, Conti M, Devos P, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase I is an independant predictor of prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent. *Cancer*. 2005;103(8):1676-84.

* Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:950-64.

* Giguère V, Ong S, Segui P, et al. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 1987;330:624-29.

- H :

* Hamada K, Gleason SL, Levi BZ, et al. H-2RIIBP, a member of of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86 : 8289-8293.

* Hastürk S, Kemp B, Kalapurakal SK. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in bronchial epithelium and nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2002;94(4):1023-31.

* Haugen BR, Larson LL, Pugazhenth U, et al. Retinoic acid and retinoid X receptors are differentially expressed in thyroid cancer and thyroid carcinoma cell lines and predict response to treatment with retinoids. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:272-80.

- * Hayashi K, Goodison S, Urquidi V, et al. Differential effects of retinoic acid on the growth of isogenic metastatic and non-metastatic breast cancer cell lines and their association with distinct expression of retinoic acid receptor beta isoforms 2 and 4. *Int J Oncol* 2003;22:623-9.
- * Hayashi K, Yokozaki H, Goodison S, et al. Inactivation of retinoic acid receptor beta by promoter CpG hypermethylation in gastric cancer. *Differentiation* 2001;68:13-21.
- * Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol* 2002;3:461-9.
- * Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;334:1145-9.
- * Heron JF. Cancérologie générale. Pr Heron JF de l'université de Caen, 13/08/2005.
<http://www.oncoprof.net/Generale2000/index.html>
- * Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992;10:413-17.
- * Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993;11:1026-30.
- * Hind M, Maden M. Retinoic acid induces alveolar regeneration in the adult mouse lung. *Eur Respir J* 2004;23:20-7.
- * Hirao T, Nelson HH, Ashok TD, et al. Tobacco smoke-induced DNA damage and an early age of smoking initiation induce chromosome loss at 3p21 in lung cancer. *Cancer Res.* 2001;61(2):612-5.
- * Hofmann C, Eichele G. Retinoids in development. In: Sporn M, Roberts AB, Goodman M, editors. *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine* (2nd ed.), New York: Plenum Press, 1994:387-441.
- * Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung Cancer. *Lancet.* 2000;355(9202):479-85.
- * Hoopes CW, Taketo M, Ozato K, et al. Mapping of the mouse Rxr loci encoding nuclear retinoid X receptors RXR alpha, RXR beta, and RXR gamma. *Genomics* 1992;14:611-17.
- * Hong WK, Lippman SM, Itri LM, et al. Prevention of second primary tumours with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1990;323:795-01.

* Houle B, Leduc F, Bradley WE. Implication of RARB in epidermoid (Squamous) lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1991;3:358-66.

* Houle B, Pelletier M, Wu J, et al. Fetal isoform of human retinoic acid receptor beta expressed in small cell lung cancer lines. *Cancer Res* 1994;54:365-9.

* Huang J, Powell WC, Khodavirdi AC, et al. Prostatic intraepithelial neoplasia in mice with conditional disruption of the retinoid X receptor alpha allele in the prostate epithelium. *Cancer Res* 2002;62:4812-9.

- I :

* INVS. Mortalité par cancer du poumon en France métropolitaine. Analyse de tendance et projection de 1975 à 2014. Institut de Veille Sanitaire (INVS), Octobre 2005.

http://www.invs.sante.fr/publications/2005/cancer_poumon/

* Ishikawa T, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Aburatani H, Stanger BZ, Shibasaki Y, et al. A functional retinoic acid receptor encoded by the gene on human chromosome 12. *Mol Endocrinol* 1990, 4 : 837-844.

- K :

* Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, et al. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 1997;124:313-26.

* Khuri FR, Lotan R, Kemp BL, et al. Retinoic acid receptor-beta as a prognostic indicator in stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2000;18:2798-804.

* Kim SY, Adachi H, Koo JS, et al. Induction of the cytochrome P450 gene CYP26 during mucous cell differentiation of normal human tracheobronchial epithelial cells. *Mol Pharmacol* 2000;58:483-90.

* Klaassen I, Brakenhoff RH, Smeets SJ, et al. Expression of retinoic acid receptor gamma correlates with retinoic acid sensitivity and metabolism in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2001;92:661-5.

* Klein N, Vignaud JM, Sadmi M, et al. Squamous metaplasia expression of proto-oncogenes and P 53 in lung cancer patients. *Lab Invest* 1993;68:26-32.

* Kok K, Naylor SL, Buys CH. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv Cancer Res* 1997;71:27-92.

* Kreuzer M, Gerken M, Kreienbrock L, et al. Lung cancer in lifetime nonsmoking men – results of a case-control study in Germany. *Br J Cancer*. 2001;84(1):134-140.

* Krust A, Kastner P, Petkovich M., et al. A third human retinoic acid receptor, hRAR γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86 : 5310-5314.

- L :

* Lampron C, Rochette-Egly C, Gorry P, et al. Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* 1995;121:539-48.

* LaNutrition.fr, dossier Vitamine A.

[http://www.lanutrition.fr/Vitamine-A-\(R%E9tinol\)-a-165-45.html](http://www.lanutrition.fr/Vitamine-A-(R%E9tinol)-a-165-45.html)

* Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, et al. TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancer in relation to tobacco smoke: distinct pattern in never, former and current smokers. *Cancer Res*. 2005;65(12):5076-83.

* Lee JS, Lippman SM, Benner SE, et al. Randomized placebo-controlled trial of isotretinoin in chemoprevention of bronchial squamous metaplasia. *J Clin Oncol* 1994;12:937-45.

* Leid M., Kastner P., Chambon P. Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *TIBS* 1992, 17 : 427-433.

* Leid M, Kastner P, Lyons R, Nakshari H, Saunders M, Zacharewski T, et al. Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 1992, 68 : 377-395

* Li M, Indra AK, Warot X, et al. Skin abnormalities generated by temporally controlled RXR α mutations in mouse epidermis. *Nature* 2000;407:633-6.

* Lidén M, Tryggvason K, Eriksson U. Structure and function of retinol dehydrogenases of the short chain dehydrogenase/reductase family. *Mol Aspects Med* 2003;24:403-9.

* Linke T, Dawson H, Harrison EH. Isolation and characterization of a microsomal acid retinyl ester hydrolase. *J Biol Chem* 2005;280:23287-94.

* Lotan R, Xu XC, Lippman SM, et al. Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *New Engl J Med* 1995;332:1405-10.

* Lotan Y, Xu XC, Shalev M, et al. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal and malignant prostates. *J Clin Oncol* 2000;18:116-21.

- M :

* MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF. Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays*. 2002;24(10):885-93.

* Maden M. The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development. *Proc Nutr Soc* 2000;59:65-73.

* Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990, 345 : 224-229.

* Mangelsdorf DJ, Umesono K, Kliewer SA, Borgmeyer U, Ong ES, Evans RM. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell*. 1991 ; 66 : 555-561.

* Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, et al. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis-retinoic acid. *Genes Dev* 1992, 6: 329-344.

* Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;83:841–850.

* Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily : the second decade. *Cell*. 1995 ; 83 : 835-839.

* Martinet N, Alla F, Farré G, et al. Retinoic acid receptor and retinoid X receptor alterations in lung cancer precursor lesions. *Cancer Res* 2000;60:2869-75.

* Martinet Y, Brambilla E, Martin JP, et al. Les bases biologiques de la prévention du cancer du poumon. *Médecine Sciences*. 1997;13 :1465-71.

* Matakidou A, Eisen T, Fleischmann C, et al. Evaluation of xeroderma pigmentosum XPA, XPC, XPD, XPF, XPB, XPG and DDB2 genes in familial early-onset lung cancer predisposition. *Int J Cancer*. 2006.

* Mattei M.G., De Thé H., Mattei J.F., Marchio A., Tiollais P., Dejean A. Assignment of the human hap retinoic acid receptor RAR β gene to the p24 band of hromosome 3. *Hum Genet* 1988, 80 : 189-190.

* Mattei MG, Petkovich M, Mattei JF, Chambon P. Mapping of the human retinoic acid receptor to the q21 band of chromosome 17. *Hum Genet* 1988, 80 : 186-189.

- * Mattei MG, Riviere M, Krust A, Ingvarsson S, Vennström B, Islam MQ, et al. Chromosomal assignment of retinoic acid receptor (RAR) genes in the human, mouse, and rat genomes. *Genomics* 1991, 10 : 1061-1069.
- * McLoud TC. Imaging techniques for diagnosis and staging of lung cancer. *Clin Chest Med.* 2002;23(1):123-36.
- * Mendelsohn C, Lohnes D, Décimo D, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 1994;120:2749-71.
- * Merrill RM, Lyon JL. Cancer incidence among Mormons and non-Mormons in Utah (United States) 1995-1999. *Prev Med.* 2005;40(5):535-41.
- * Milleron B. Cancer bronchique. Paris : Laboratoire Sandoz, 1995, 258p.
- * Minna JD. Nicotine exposure and bronchial epithelial cell nicotinic acetylcholine receptor expression in the pathogenesis of lung cancer. *J Clin Invest.* 2003;111(1):31-3.
- * Misset JL, Mathé G, Santelli G, et al. Regression of bronchial epidermoid metaplasia in heavy smokers with etretinate treatment. *Cancer Detect Prev* 1986;9:167-70.
- * Moise AR, Von Lintig J, Palczewski K. Related enzymes solve evolutionarily recurrent problems in the metabolism of carotenoids. *Trends Plant Sci* 2005;10:178-86.
- * Mollard R, Ghyselinck NB, Wendling O, et al. Stage-dependent responses of the developing lung to retinoic acid signaling. *Int J Dev Biol* 2000;44:457-62.
- * Mollard R, Viville S, Ward SJ, et al. Tissue-specific expression of retinoic acid receptor isoform transcripts in the mouse embryo. *Mech Dev* 2000;94:223-32.
- * Mountain CF. Staging classification of lung cancer. A critical evaluation. *Clin Chest Med.* 2002;23(1):103-21.

- N :

- * Nagpal S, Zelent A, Chambon P. RAR-beta 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR-beta 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2718-22.
- * Nakamura A, Saji H, Ogata A, et al. Correlations between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2003;103(1):61-6.

* Netter FH. Respiratory system. In: Divertie MB, editor. The Ciba Collection of Medical Illustrations, Vol.7. New Jersey: CIBA, 1980:28-30.

* Nguyen DX, Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 2007 ; 8 : 341-52.

* Niederreither K, Subbarayan V, Dollé P, et al. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 1999;21:444-8.

* No authors listed. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1994;330:1029-35.

* Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006;1:1559-82.

- O :

* Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, et al. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1550-9.

* Osada H, Takahashi T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene*. 2002;21(48):7421-34.

- P :

* Pandolfi PP. Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Hum Mol Genet* 2001;10:769-75.

* Panigrahy D, Singer S, Shen LQ, et al. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest*. 2002;110(7):923-32.

* Pauk N, Kubik A, Zatloukal P, Krejci E. Lung cancer in women. *Lung Cancer*. 2005;48(1):1-9.

* Peng X, Maruo T, Cao Y, et al. A novel RARbeta isoform directed by a distinct promoter P3 and mediated by retinoic acid in breast cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:8911-8.

* Penning TM. AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clin Cancer Res* 2005;11:1687-90.

- * Peters U, Leitzmann MF, Chatterjee N, et al. Serum lycopene, other carotenoids, and prostate cancer risk: a nested case-control study in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:962-8.
- * Petkovich M, Brand N.J, Krust A, et al. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987;330:444-50.
- * Peto R, Lopez AD, Boreham J, et al. Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet* 1992;339:1268-78.
- * Petty WJ, Li N, Biddle A, et al. A novel retinoic acid receptor beta isoform and retinoid resistance in lung carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1645-51.
- * Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- * Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e36.
- * Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004;26:509-15.
- * Picard E. Caractérisation de l'expression des récepteurs des acides rétinoïques dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules. Th. de Doctorat Nancy I, 1999:p.57.
- * Picard E, Seguin C, Monhoven N, et al. Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1059-66.
- * Poitras E., Houde A. La PCR en temps réel : principes et application. *Reviews in Biology and Biotechnology By the Moroccan Society of Biology in Canada.* 2002;2(2):2-11.
- * Ponnampertuma RM, Shimizu Y, Kirchlof SM, et al. beta-Carotene fails to act as a tumor promoter, induces RAR expression, and prevents carcinoma formation in a two-stage model of skin carcinogenesis in male Sencar mice. *Nutr Cancer* 2000;37:82-8.
- * Poulain S, Evenou F, Carre MC, et al. Vitamin A/retinoids signalling in the human lung. *Lung Cancer*, 2009.
- * PNNS. Programme National Nutrition Santé 2001-2005.
http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/34_010131.htm

- Q :

* Qiu H, Zhang W, El-Naggar AK, et al. Loss of retinoic acid receptor-beta expression is an early event during esophageal carcinogenesis. *Am J Pathol* 1999;155:1519-23.

- R :

* Rasmussen R. Quantification on the Lightcycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, editors. *Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications*, Heidelberg: Springer Press, 2001:21-34.

* Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, et al. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res* 1988;48:1904-9.

* Rinker-Schaeffer CW, O'Keefe JP, Welch DR, Theodorescu D. Metastasis suppressor proteins: discovery, molecular mechanisms, and clinical application. *Clin Cancer Res* 2006 ; 12 : 3882-9.

* Rioux N. Etudes précliniques de prévention de la carcinogénèse pulmonaire par les anti-inflammatoires non-stéroïdiens et les inhibiteurs de lipooxygénases. Th. Pharmacie Nancy I, 2000:p.242.

* Rossan L, Rossan-Lumbroso J. Dossier cancer du poumon.

http://www.doctissimo.fr/html/dossiers/cancer_poumon.htm

* Roth AD, Abele R, Alberto P. 13-cis-retinoic acid plus interferon-alpha: a phase II clinical study in squamous cell carcinoma of the lung and the head and neck. *Oncology* 1994;51:84-6.

* Ruano-Ravina A, Figueiras A, Barreiro-Carracedo MA, Barros-Dios J. Occupation and smoking as risk factors for lung cancer: a population-based case-control study. *Am J Ind Med*. 2003;43(2):149-55.

- S :

* Saffiotti U, Montesano R, Sellakumar AR, et al. Experimental cancer of the lung. Inhibition by vitamin A of the induction of tracheobronchial squamous metaplasia and squamous cell tumors. *Cancer* 1967;20:857-64.

* Saurin JC, Nemoz-Gaillard E, Ratineau C, et al. Le neuropeptide bombésine module la prolifération et l'invasion tumorale. *MS Médecine Sciences* 2000;16(8-9):929-35.

* Schneider R, Schmitt F, Frochot C, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem*. 2005;13(8):2799-808.

* Schwartz RF, Bataller R, Brenner DA. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am J Physiol Crit Care Med.* 2006;173(1):16-22.

* Seldin MF. Encyclopedia of mouse genome II. Mouse Chromosome 1. *Mammalian Genome* 1992;3:S1-S19.

* Sommer KM, Chen LI, Treuting PM, et al. Elevated retinoic acid receptor beta(4) protein in human breast tumor cells with nuclear and cytoplasmic localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8651-6.

* Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, et al. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 1976;35:1332-8.

* Stabile LP, Davis AL, Gubish CT, et al. Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both oestrogen receptor alpha and beta and show biological responses to estrogen. *Cancer Res.* 2002;62(7):2141-50.

* Sun SY, Yue P, Malo L, et al. Identification of receptor-selective retinoids that are potent inhibitors of the growth of human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:1563-73.

* Swift ME, Wallden B, Wayner EA, et al. Truncated RAR beta isoform enhances proliferation and retinoid resistance. *J Cell Physiol* 2006;209:718-25.

- T :

* Tanoue LT. Cigarette smoking and women's respiratory health. *Clin Chest Med.* 2000;21(1):47-65.

* Tarrade A, Rochette-Egly C, Guibourdenche J, et al. The expression of nuclear retinoid receptors in human implantation. *Placenta* 2000;21:703-10.

* de Thé H, Vivanco-Ruiz MM, Tiollais P, et al. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* 1990;343:177-80.

* Toma S, Raffo P, Isnardi L, et al. Retinoids in lung cancer prevention and treatment. *An Oncol* 1999;10:95-02.

* Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med.* 2002;23(1):65-81.

- V :

* Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034.

* van Zandwijk N, Dalesio O, Pastorino U, et al. EUROSCAN, a randomized trial of vitamin A and N-acetylcysteine in patients with head and neck cancer or lung cancer. For the European Organization for Research and Treatment of Cancer Head and Neck and Lung Cancer Cooperative Groups. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:977-86.

* Vignaud JM, Marie B, Picard E, et al. *Clinical and biological basis of lung cancer prevention*. Basel : Birkhäuser Verlag Editions, 1998.

* Virmani AK, Rathi A, Zöchbauer-Müller S, et al. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1303-7.

* Vlastos F, Lacomme S, Wild P, et al.: Do evolving managing practices improve survival in operated lung cancer patients? The “Nancy Centre of Biological Resources” lung cancer cohort survey. *J Thorac Oncol*. 2009 Apr;4(4):505-11.

- W :

* Wang DL, Marko M, Dahl AR, et al. Topical delivery of 13-cis-retinoic acid by inhalation up-regulates expression of rodent lung but not liver retinoic acid receptors. *Clin Cancer Res* 2000;6:3636-45.

* Warrel RP Jr, Frankel SR, Miller WH Jr. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid). *N Engl J Med* 1991;324:1385-93.

* Wei S, Episkopou V, Piantedosi R, et al. Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *J Biol Chem* 1995;270: 866-70.

* Wendling O, Chambon P, Mark M. Retinoid X receptors are essential for early mouse development and placentogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:547-51.

* Wheater PR, Burkitt GH, Daniels VG. *Histologie fonctionelle*, 2nd Edition. Paris: Medsi/McGraw-Hill Editions, 1987, 351 p.

* Williams MD, Sandler AB. The epidemiology of lung cancer. *Cancer Treat Res*. 2001;105:31-52.

* World Health Organization (WHO). *Tobacco Alert Special Issue: the Tobacco Epidemic: a Global Public Health Emergency*. Geneva: WHO;1996b.

<http://www.who.int>

* World Health Organization (WHO). *The millenium development goals and tobacco control*, 2004.

http://www.who.int/tobacco/publications/mdg_final_for_web.pdf

* World Health Organization (WHO). Le tabac : mortel sous toutes ses formes. Journée mondiale sans tabac 2006.

http://www.who.int/tobacco/communications/events/wntd/2006/WNTD_REPORT_FR_v5.pdf

- X :

* Xu XC. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer. *Cancer Lett* 2007;253:14-24.

* Xu XC, Ro JY, Lee JS, et al. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant, and malignant head and neck tissues. *Cancer Res* 1994;54:3580-7.

* Xu XC, Sozzi G, Lee JS, et al. Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:624-9.

* Xu XC, Wong WY, Goldberg L, et al. Progressive decreases in nuclear retinoid receptors during skin squamous carcinogenesis. *Cancer Res* 2001;61:4306-10.

- Y :

* Yokota J, Kohno T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.* 2004;95(3):197-204.

* Yoshino I, Fukuyama S, Kameyama T, et al. Detection of loss of heterozygosity by high-resolution fluorescent system in non-small cell lung cancer: association of loss of heterozygosity with smoking and tumor progression. *Chest.* 2003;123(2):545-50.

- Z :

* Zelent A., Krust A., Petkovich M., Kastner P., Chambon P. Cloning of murine α and β retinoic acid receptors and a novel receptor γ predominantly expressed in skin. *Nature* 1989, 339 : 714-717.

* Zelent A, Mendelsohn C, Kastner P, et al. Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J* 1991;10:71-81.

* Zolfaghari R, Ross AC. Cloning, gene organization and identification of an alternative splicing process in lecithin:retinol acyltransferase cDNA from human liver. *Gene* 2004;341:181-8.

COMMUNICATION SCIENTIFIQUE

PUBLICATIONS SOUS PRESSE



Contents lists available at ScienceDirect

Lung Cancer

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lungcan



Review

Vitamin A/retinoids signalling in the human lung

Stéphane Poulain^{a,*}, Fanny Evenou^b, Marie-Christiane Carré^b, Serge Corbel^b,
Jean-Michel Vignaud^a, Nadine Martinet^a

^a Centre de Ressources Biologiques, CHU de Nancy - Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition (LPCMN), INSERM U724, Faculté de Médecine, 9, Avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505, Vandoeuvre-Lès-Nancy, France

^b École Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy (ENSIC) - Département de Chimie-Physique des Réactions (DCPR), UMR 7630 CNRS-INPL-Nancy Universités, 1 Rue Grandville, BP 20451, 54001, Nancy Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2008
Received in revised form 18 December 2008
Accepted 6 March 2009

Keywords:

Vitamin A
Retinoid receptor
Lung cancer
Retinoic acid
Metabolism
Chemoprevention

ABSTRACT

Vitamin A is used as a generic term for all vitamin A derivatives with retinol-like biological activity. Retinol is the main parent compound for vitamin A. It derives from carotenoids (provitamin A) and also directly from the pre-formed vitamin A contained in the diet. The term “retinoid” is a generic descriptor of compounds structurally related to vitamin A and the synthetic analogues of retinol with or without biological activity. Retinoic acid is the active cellular catabolite. Vitamin A/retinoids have been given cancer-preventive functions and subsequently used in clinical trials to reduce lung cancer incidence in high-risk individuals. The results obtained have been in contradiction with both *in vivo* and *in vitro* promising studies. It seems therefore necessary to develop a better understanding of the vitamin A/retinoids signalling pathways in the lung. With this aim, we summarise the relevant knowledge focussed on the lung.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Despite tobacco smoking prevention, lung cancer remains the number 1 cause of cancer-related deaths in developed countries [1]. In the absence of early diagnosis tools, the prognosis is poor. However, epidemiological observations and positive laboratory findings had generated hope for the use of vitamin A/retinoids (Vit A) in lung cancer chemoprevention for high-risk individuals.

Indeed, (A) there is a consistent inverse association between the intake of fruits and vegetables containing pro-Vit A (carotenoids) and the risk of lung cancer [2]. (B) There is also a similarity between the bronchial lesions found in carcinogen-treated animals (squamous metaplasia) and the histological changes affecting the bronchial epithelia of humans or animals deficient in Vit A.

Abbreviations: ADC, adenocarcinoma; AKR, aldo-keto reductase; ALDH, aldehyde dehydrogenase; at-RA, all-*trans* retinoic acid; at-retinol, all-*trans* retinol; CRABP, cellular retinoic acid-binding protein; CRBP, cellular retinol-binding protein; DBD, DNA-binding domain; IHC, immuno-histochemistry; ISH, *in situ* hybridization; LBD, ligand-binding domain; LRAT, lecithine:retinol acyltransferase; NSCLC, non-small cell lung cancer; RA, retinoic acid; RALDH, retinal dehydrogenase; RAR, retinoic acid receptor; RARE, retinoic acid response element; RBP, retinol-binding protein; RDH, retinol dehydrogenase; REH, retinyl ester hydrolase; RXR, retinoid X receptor; SCLC, small cell lung cancer; SDR, short-chain dehydrogenase reductase; SQCLC, squamous cell lung cancer; TTR, transthyretin; Vit A, vitamin A.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 34 12; fax: +33 3 83 68 34 19.

E-mail address: Stephane.Poulain@nancy.inserm.fr (S. Poulain).

Restoration to a normal histological aspect occurs after Vit A repletion, which also confers protection against pro-carcinogens like benzo[*a*]pyrene in experimental models [3]. (C) In addition, smokers present more squamous metaplasia than non-smokers [4] and the multistep process leading to squamous cell lung carcinoma (SQCLC) also begins by squamous metaplasia [5]. (D) Early studies have shown that retinoids decreased the incidence of overall second primaries in patients with head and neck cancers [6]. All-*trans* retinoic acid (at-RA) was efficient to reverse pre-neoplastic oral lesions and to enhance the regression of cervical intraepithelial neoplasia [7].

In this promising context, in the middle 1980s, lung cancer chemoprevention trials with Vit A/retinoids began. Etretnate was found able, in small uncontrolled studies, to reverse bronchial squamous metaplasia in chronic smokers [4] but controlled trials in the 1990s, failed to confirm these results [8]. In the mean time, large primary prevention trials against smoking-related tumors began. Four have now been completed and have reported striking increases in lung cancer incidence, pointing even to β -carotene as a potent human carcinogen: see the α -tocopherol, β -carotene trial with or without β -carotene in the retinol efficacy trial, the physician's health study with or without β -carotene and recently the EUROSCAN trial results after retinyl palmitate and/or N-acetyl cystein supplementation in high-risk individuals [9–13].

The relative simple chemical structure of Vit A/retinoids had allowed for the development of numerous synthetic retinoids and as early as 1976, M. Sporn group used Vit A-deprived hamster

tracheal rings in culture as a simple model of bronchial squamous metaplasia to test Vit A and its synthetic derivatives in their ability to restore a normal bronchial epithelium [14]. A body of other studies have shown that Vit A/retinoids play a major role in the growth, death and differentiation of embryonic and adult normal or abnormal tissues. The most dramatic anti-tumor effect was shown by at-RA in acute promyelocytic leukaemia [15]. Consequently, some derivatives have been tested *in vivo* to treat advanced lung tumors as alternative approaches to intensive cytotoxic chemotherapy. Overall, few objective responses have been reported in metastatic non-small cell lung cancers (NSCLCs) pre-treated with chemo and/or radiotherapy when combining α -interferon and at-RA [16].

The discovery of nuclear receptors for retinoids: the retinoic acid receptors (RARs) and the retinoid X receptors (RXRs) greatly enhanced our understanding of retinoid signalling [17]. Specific knock-out mice have been generated to dissect the role of each gene during embryogenesis [18] and synthetic retinoids specific for a given RAR or a given RXR as well as novel retinoids able to overcome RA resistance in several NSCLC cell lines have been synthesised [19]. RARs selective retinoids are generally more active to slow cell growth than RXRs selective retinoids. However, at sub-optimal concentrations, RAR agonists synergise with RXR agonists to inhibit malignant cell proliferation. In rabbit tracheal epithelial cells primary cultures: RAR α and β agonists or RAR panagonists were required to inhibit squamous metaplasia but RAR γ agonists only induced growth arrest and apoptosis of basal proliferative cells [20]. In human bronchial epithelial cells, RA and RARs selective retinoids but not RXRs, inhibited squamous differentiation and induced CYP26 mRNA whose defective regulation could explain inadequate RA catabolism [21].

Evidences have accumulated pointing to the prominent role of the RAR β gene in lung cancer and will be reviewed. Future research

for lung cancer chemoprevention could use the new retinoids, but without a better scientific understanding of the basic biological mechanisms of Vit A/retinoids signalling in the lung it would be unethical. With this purpose, we review what is known about Vit A/retinoids signalling, restricting our scope mainly to the human lung, adopting simplifications for an easy reading by all concerned physicians and listing only key references, which contain further relevant references.

2. Vitamin A/retinoids

Chemical compounds belonging to the Vit A family, as defined by the International Union of Pure and Applied Chemistry/International Union of Biology Joint Commission on Biochemical Nomenclature, have a structure based on four isoprenoid units joined in a head-to-tail manner to produce a monocyclic parent having five carbon-carbon double bonds and a functional group at the acyclic terminus [22]. The typical parent compound is all-*trans* retinol (at-retinol).

Both plants and animals are dietary sources of Vit A for humans (Fig. 1). At-retinol and its esters making most of the pre-formed Vit A are first hydrolysed in the small intestine to form free retinol which is next incorporated into lipid micelles in the gut. These are taken up by enterocytes of the small intestine and maybe by a yet to define transporter. Retinol is then complexed with cellular retinol-binding protein II (CRBP II), re-esterified and incorporated into chylomicrons for release in the lymph. Carotene/carotenoids, which are used by plants as free-radical scavengers and antioxidants, represent for humans, who cannot synthesise them, the major precursors of Vit A or pro-Vit A. More than 600 have been described but after ingestion, only 10, including β -carotene, undergo symmetric oxidative cleavage (beta-carotene oxygenases) to give retinal

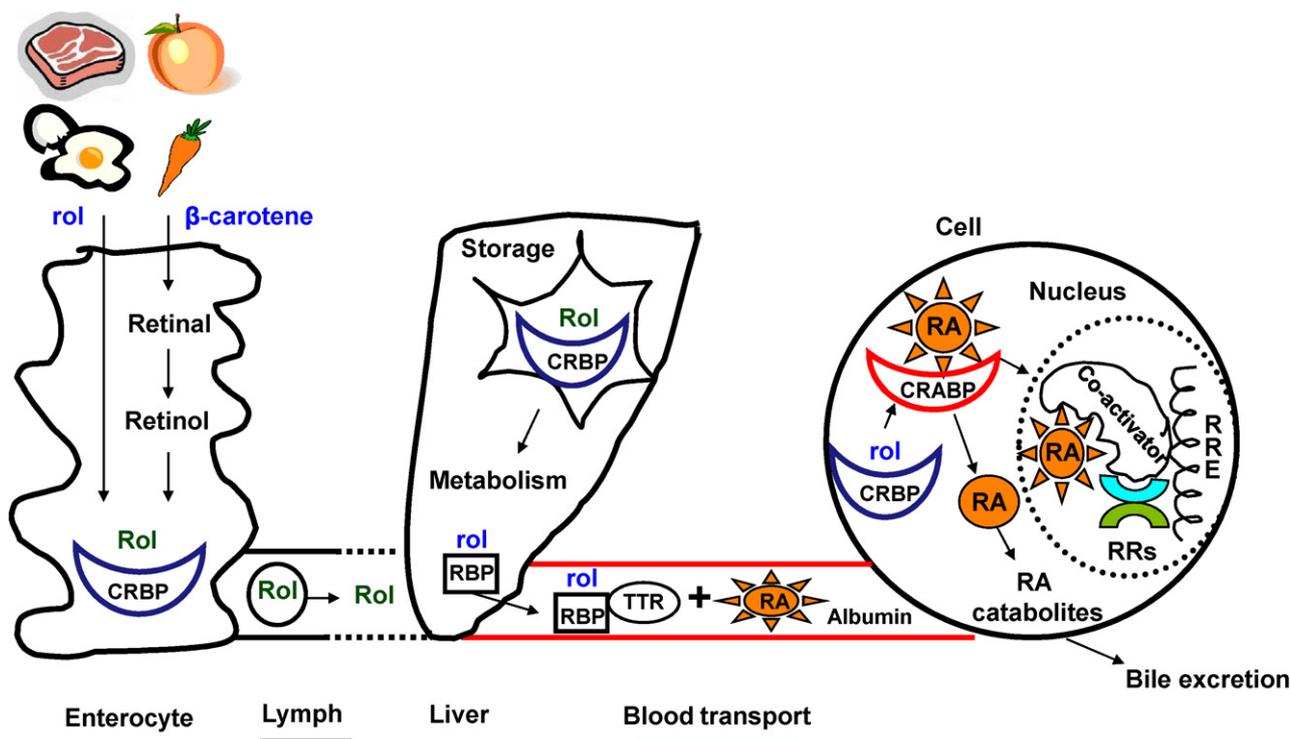


Fig. 1. Schematic vitamin A/carotenoids metabolism. Carotenoids and retinol (rol) are converted in enterocytes to retinyl esters (Rol) which are transported by chylomicrons via the lymphatic vessels for storage in the liver, mainly in Ito cells. Rol are converted back to rol that binds the retinol-binding protein (RBP) for peripheral tissue distribution. RBP-rol complexes are bound to transthyretin (TTR) during plasmatic transport. Later, rol enters the target cells and binds to cellular retinol-binding proteins (CRBPs) for cytoplasmic transport. In the cell, rol is irreversibly oxidised into all-*trans* retinoic acid (at-RA) which complexes to cellular retinoic acid-binding proteins (CRABPs) before entering the nucleus. There, RA serves as a ligand for retinoid receptors (RRs) dimers bound to DNA through specific retinoid response elements (RREs) located in the target genes promoters. Then, RRs dimers bind co-activators and initiate the expression of target genes by activating the transcriptional machinery.

and then retinol in the enterocytes. After re-esterification, it is as before incorporated into chylomicrons for release in the lymph. The conversion depends on the nature and digestibility of associated intakes and is also possible in the liver and other organs. Small amounts of carotenoids are also chemically or enzymatically oxidised. Unmetabolised carotenoids are, in addition, complexed to lipids or lipoproteins in the plasma, adipose tissues, liver, adrenal glands, muscles and ovaries as α -carotene, lycopene, lutein and cryptoxanthin [23]. β -Carotene may also undergo asymmetric oxidative cleavage to yield apo-carotenals whose functions remain poorly known.

All intestinal-derived retinol esters reaching the lymph as chylomicrons, are carried unbound to the liver for storage mainly as retinyl esters by lecithine:retinol acyltransferase (LRAT) [24] or directed towards RA synthesis when retinyl esters are first hydrolysed to at-retinol by retinyl ester hydrolases (REHs) [25]. Retinol enters the blood for further transport and final distribution to specialised cells. As a hydrophobic molecule, like RA, it is bound by chaperon proteins to ensure proper transport and metabolism.

In plasma, at-retinol is transported by the liver-synthesised retinol-binding protein (RBP) as an holo-RBP complex whose level is regulated by several means including a feedback mechanism involving RA level. Formelli et al. have reported in 1996 [26] that N-(4-hydroxy-phenyl)retinamide lowers plasma retinol by inhibiting the release of holo-RBP from liver. This compound was recently tested in heavy smokers and found to decrease the telomerase activity in their bronchial mucosa [27]. The gene encoding RBP lays at 10q23–24, the protein is mainly synthesised in the hepatocytes and in small amounts within stellate cells, kidney, lung, spleen, muscle and adipose tissues.

At-retinol bound to RBP complexes with plasma transthyretin (TTR) regulating thereby the level of plasma free retinol and preventing unscheduled filtration in the kidney. TTR null mice are normally developed even with a low-plasma retinol level but a high-at-RA level [28]. The plasma concentration of retinol increases with age and in adults is about $2 \mu\text{mol/L}$. There is also about $0.2 \mu\text{mol/L}$ of retinyl esters in chylomicra remnants and in low-density lipoproteins whereas RA is complexed with albumin. Lipoprotein lipase hydrolyses triglycerides present in chylomicra to

convert them to chylomicra remnants, containing the retinyl esters, which are finally removed from the circulation mainly by the liver cells which present specific receptors. Other forms of Vit A are found in the plasma for approximately 2–20 nmol/L: 13-*cis* RA, at-RA, etc. In human plasma, where it is also bound to serum albumin, at-RA is usually at a concentration 150-fold lower than that of retinol.

After delivery to the cell plasma membrane by a still unclear mechanism (specific receptors?), RBP-retinol is passively transported across the membrane before binding to the cellular retinol-binding proteins I and II (CRBP) which transport retinol and retinal within cells [29]. Both protect them from unscheduled oxidation in the liver by unspecific dehydrogenases, which recognise free retinol. The CRBPs are carrier of substrates for retinol ester synthesis in the enterocytes. In humans, CRBP I is mainly expressed in the liver although small amounts are found in the kidney and the testis. The genes encoding CRBP I and II lay on chromosome 3q21–22. CRBP II is mostly found in the mature enterocytes and in small quantities in plasma, colon, liver and eyes. Disruption of the CRBP I gene produces almost normal mice if they are fed a Vit A-rich diet, indicating that CRBP I is not essential for RA synthesis.

In vertebrates multiple oxido-reductases, like microsomal retinol dehydrogenases (RDHs) [30] (Fig. 2), are involved in reversible retinol/retinal interconversion. They are ubiquitous, overlapping and redundant. Medium-chain dehydrogenase/reductases (like alcohol dehydrogenases), and short-chain dehydrogenase/reductases (SDRs) enzymes families [31,32] have dual retinol/sterol substrate specificity, while aldo-keto reductases (AKRs) [33] catalyze the conversion of retinal to retinol. The retinal dehydrogenases (RALDHs), convert retinal to at-RA in specialised cells using at-RA and 9-*cis* RA as ligands for retinoids receptors (RRs). RALDH1 converts 11-*cis* retinal to 11-*cis* retinal used in the pigment of the visual system (excluded from this review). Gene disruption of RALDH2 in mouse demonstrated that at-RA produced by the embryo is essential for its own survival and morphogenesis, all defects being rescued by maternal at-RA administration [34].

For RR signalling, retinal is metabolised mainly in at-RA and 9-*cis* RA, and also but not exclusively in 13,14-dihydro-RA (RetSaturase). The cellular at-RA-binding proteins I and II (CRABP) transport only at-RA which has a higher affinity for CRABP I [35]. CRABPs protect

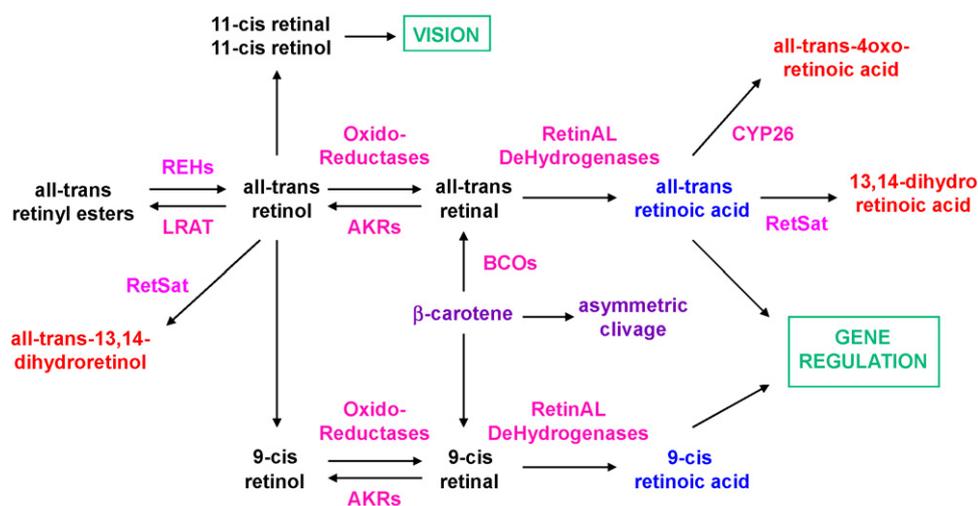


Fig. 2. Main enzymes involved in the metabolism of retinoids. Inside the cell, retinyl esters are hydrolysed to all-*trans* retinol (at-retinol) by different retinyl ester hydrolases (REHs). On the opposite, lecithine:retinol acyltransferase (LRAT) catalyses the esterification of retinol to retinyl esters. All-*trans* and 9-*cis* retinol are oxidised respectively to all-*trans* and 9-*cis* retinal by oxido-reductases belonging to the alcohol dehydrogenase (ADH) and the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) families, while aldo-keto reductases (AKRs) catalyse the reduction of retinal to retinol. β -Carotene can also be converted to all-*trans* and 9-*cis* retinal by different beta-carotene oxygenases (BCO-I and BCO-II). Another family of enzymes, the retinal dehydrogenases (RALDHs) will then oxidise all-*trans* and 9-*cis* retinal respectively to all-*trans* and 9-*cis* retinoic acid, which are the retinoid receptors ligands. At-RA is metabolised by different cytochromes P450 (CYP26) to all-*trans*-4-oxo-retinoic acid, or by the all-*trans*-13,14-dihydroretinol saturase (RetSat) to 13,14-dihydroretinoic acid. This last enzyme also metabolises at-retinol to all-*trans*-13,14-dihydroretinol which is suspected to be involved in gene regulation as well by a still unknown pathway.

at-RA from unscheduled metabolism and function as carrier substrates for the catabolism of at-RA into more polar active or inactive catabolites, which are further conjugated to glucuronic acid on their way to be excreted in the bile. The CYP26 (A1, B1 and C1) [36], and probably the CYP1A1 and CYP3A are the cytochromes P450 thought to break down at-RA to 4-oxo RA and a variety of catabolites whose biological activities remain unknown. However, 4-oxo-RA is the retinoid specifying the head-to-tail axis of the *Xenopus* embryo [37]. CRABP I is present in tissues containing small amounts of at-RA such as testis, ovaries, uterus, brain and eyes. CRABP II is highly expressed during embryogenesis in skin. The CRABP I gene is located on chromosome 3p11 and the CRABP II gene is on chromosome 1q21. Their expressions are regulated at the transcriptional and post-transcriptional levels and both are inducible by at-RA. Tissues distributions in rodents and in humans are different. Mice deficient in CRABP II or in both CRABP I and II are essentially normal [35]. At-RA and 9-*cis* RA are the ligands of RARs/RXRs into the cell nucleus where they function as transcription factors. But it is likely that other natural ligands do exist.

3. Retinoids receptors

In addition to their role in chemoprevention and malignant transformation, Vit A/retinoids play crucial roles in a wide variety of biological processes including embryo morphogenesis and cell homeostasis: proliferation and differentiation. Retinoids exert these pleiotropic effects through two classes of nuclear ligand-dependent transactivators, the RARs, which are activated by at-RA and its 9-*cis* isomer, and the RXRs activated by 9-*cis* RA only. There are three RARs (α , β , and γ) and three RXRs (α , β , and γ) isoforms encoded by different genes [38]. In humans, the RAR α , β and γ genes are located at chromosomes 17q21.1, 3p24 and 12q13 respectively, while RXR α , β and γ lay on chromosomes 9q34.3, 6p21.3 and 1q22 respectively. For each isotype, there are at least two main isoforms, which are generated by differential promoter usage and alternative splicing. RR protein isoforms thus only differ at their N-terminus part. Truncated versions of RRs with “tumorigenic activity” have been described mainly in breast tumors [39]. Finally, specific micro-RNAs able to degrade the RRs mRNAs are still to be found.

The adult lung expresses all RXRs and RARs but at different levels [40]. RAR β 2 and RAR β 4, sharing the same P2 promoter, are the main isoforms expressed in the lung. The expression status of the other isoforms in normal human bronchial epithelial tissues remains unknown.

RARs and RXRs are characterized by the presence of several modular domains designated A–F (Fig. 3). The highly conserved region C contains two zinc-binding motifs corresponding to the core of the DNA-binding domain (DBD) ensuring the recognition of cognate responsive elements. Region E is functionally complex as it contains: the ligand-binding domain (LBD), a dimerisation domain, and the ligand-dependent transactivation function AF-2. It is dependent upon the integrity of a highly conserved alpha-amphipathic helix,

the AF-2 AD core, corresponding to helix 12 at the C-terminal end of the LBD. Region D contains a nuclear localisation signal and lays between the DBD and the LBD and besides an hinge function. The function, if any, of region F which is absent in RXRs, is still unknown.

The amino-terminal A/B region contains a ligand-independent transactivation function AF-1. For a given RAR, the AF-1 activity synergises with AF-2. The A regions are unrelated and different for each isoform of a given RAR or RXR isotype. In contrast, the B region of the three RARs is relatively well conserved and is phosphorylated at specific serine residues by the cycline H-dependent kinase cdk7, associated to the general transcription factor TFIIH involved in DNA repair. This B region is missing in RXR α , which has an A region phosphorylated by a cycline H-dependent kinase distinct from cdk7. A recent review recapitulates all the relevant knowledge [41].

As transcription factors, RARs and RXRs activate transcription when binding as RXR/RAR heterodimers to cognate response elements located in the promoter region of RA-responsive genes. These responsive elements (RAREs) consist of two directly repeated half sites (puG(G/T)TCA motif) with a spacing of 5 bp (DR5 element), 2 bp (DR2 element) or 1 bp (DR1 element). DR1 can bind either RXR/RAR heterodimers or RXR/RXR homodimers. RXRs can also dimerise with a variety of nuclear receptors: thyroid hormone receptors, peroxisomal proliferator-activated receptors and orphan receptors. The RA-responsive genes are numerous (more than 300!), they include the RAR β gene itself, which contains in its P2 promoter a DR5 element (β -RARE) mediating the induction of RAR β 2 expression in various cell types upon RA addition. When bound to RAREs, liganded RARs and RXRs activate RA-responsive genes but repress genes containing promoter AP-1-binding sites. Conversely, AP-1 (c-Jun/c-fos complex) inhibits genes under the control of RAREs. The molecular mechanism that underlies this reciprocal antagonism remains elusive.

Ligand binding leads to major changes in the spatial conformation of RARs and RXRs. These structural alterations include the swinging of helix 12 which then seals as a lid the receptor's ligand-binding pocket to create a new site for co-activators binding, while co-repressors are released. This initiates further interactions with histone acetylases and the transcriptional machinery for chromatin remodelling and gene transcription.

4. Retinoids and lung development

The human respiratory system is not operative until birth and develops until puberty. During the fourth week of foetal development, the caudal part of the laryngotracheal groove (pharynx) forms a tube of endoderm, which will differentiate into the epithelial cells and glands of the trachea to give the bronchial tree. In parallel, cells from the splanchnic mesoderm surround this respiratory tube and form the connective tissue of the respiratory system. Two initial bronchial buds separate and regularly divide for 17 orders of branching formed at 6 months. This branching will continue until puberty. The tracheal and bronchial cells become ciliated at week 10 and mucosal glands appear at week 12, while alveolar



Fig. 3. Structural organization of RARs and RXRs. RARs/RXRs are divided into five regions: the amino-terminal end A/B with an AF-1 ligand-independent, but cell-dependent, transcriptional activation function; the DNA-binding domain (C) with two zinc fingers involved in the recognition of retinoids response elements in the target genes promoters; the ligand-binding domain (E) with an AF-2 ligand-dependent transcriptional activation function and a domain for receptors dimerisation; and a D linker domain. Phosphorylation of B and E are necessary for AF-1 and AF-2 efficient functions. For retinoids signalling, functional retinoids receptors are homo or heterodimers (RXRs and RARs/RARs). In the absence of ligand, a co-repressor complex remains associated with the dimer; inhibiting gene transcription. Ligand binding induces a conformational change that displaces the co-repressor but allows a co-activator complex binding; transcription begins.

development begins at week 16. Around the 23rd week, lamellar inclusion bodies are present within type II pneumocytes indicating that synthesis of surfactant has begun. Finally, the pleural cavities derive from the two primitive caelomic cavities (mesoderm) with a progressive individualisation from pericardial and peritoneal cavities [42]. Retinoids effects are thought to be mediated by changes in expression of patterning genes such as Hox and Sonic hedgehog.

In human, foetal lung Vit A stores are high during the last trimester of embryo life, but decrease towards the pregnancy term and during the early post-natal period. After birth, or in pre-term newborns, Vit A dietary deficiency results in squamous metaplasia of the respiratory tree [43]. RA supplement increases the synthesis of surfactant while Vit A supplement ensures protection from sepsis and respiratory deficiency.

In rodents, functional RA or retinol foetal deficiency results in lung defects similar to bronchopulmonary dysplasia. The animals are sterile and have severely compromised immune functions. Their mucous tracheal epithelium differentiates into a pseudo-stratified squamous epithelium (squamous metaplasia).

Complete foetal RA deficiency in embryos, induces a wide range of abnormalities affecting the brain, face, eyes, teeth, limb, urogenital system, heart and lung. Foetal excess of RA induces the growth of structures that resemble proximal airways without the distal epithelial buds. RA also induced lung alveoli regeneration in a mouse model of emphysema [44]. Nevertheless, it must be stressed that the human and rodent lungs are different. Whereas humans breathe through mouth and nose, rodents breathe mainly with the nose. They also develop experimental malignant pulmonary adenoma rare in humans.

Vit A deprivation studies applied at different stages of animal embryo development have shown that RA is important for many organs and at several different times throughout development rather than at one stage only. However, the lungs fail to develop only in animal deprived in late stage embryogenesis. Both deprivation or excess of RA applied to the embryo result in very similar defects indicating that RA levels have to be precisely tuned during embryogenesis [37].

In the lung, the retinoids signalling is thought to be conveyed by RAR β and not RAR γ while the levels of CRBP I appear as important in the control of the branching morphogenesis [45]. In experimental animals, the posterior end of the embryo produces RA and the forming head metabolizes RA. Initially the anterior end of the embryo develops in the absence of at-RA but RA is required for the development of the trunk. There exists an intriguing relationship between enzymes synthesizing retinoids and the distribution of CYP26 which uses RA as a substrate. A review recapitulates what is known on the subject [46].

The distribution of RAR/RXR has been intensively analysed in the mouse embryo but mainly at early stages. The RAR α gene was ubiquitously expressed whereas RAR β and γ were present in spatially and temporally restricted patterns: the first in the branchial epithelium and the last in the precartilaginous mesenchymal condensation. Later, RAR α was also observed in the branchial arches [47]. Recently, only expression of RAR α and of RXR α were observed at the human embryo implantation site [48] but more studies are obviously needed.

5. Retinoids receptors knock-out mice

In order to assess the functions of RR genes and isoforms during normal embryogenesis, specific knock-out mice have been engineered [38]. RAR $\alpha^{-/-}$ and RAR $\gamma^{-/-}$ mice showed several symptoms of the post-natal RA deficiency syndrome: lethality, poor weight gain and male sterility, which could all be cured or prevented by RA supplementation. RAR $\beta^{-/-}$ displayed persistent retro-lenticular membrane. Single RAR null mutant mice developed almost nor-

mally, indicating that some degree of functional redundancy exists between RARs.

Compound mutants RAR $\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$, RAR $\alpha^{-/-}\gamma^{-/-}$ or RAR $\beta^{-/-}\gamma^{-/-}$ exhibited a partial foetal RA deficiency syndrome. In RAR $\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$, absence of the left lung, hypoplasia of the right lung, absence of the oesophago-tracheal septum and laryngo-tracheal defects were all observed. In RAR α , β and γ specific isoforms knock-out mice, the tracheal rings were absent and from mildly to severely affected.

RXR $\alpha^{-/-}$ mice died at embryonic day: 12.5–16.5 and displayed a complete foetal RA deficiency syndrome with severe malformations of the face, limbs, heart and lungs. RXR $\alpha^{+/+}$ mutants showed only mild tracheal malformations. RXR $\beta^{-/-}$ female mice are viable but the males are sterile, most probably because of abnormal lipid metabolism in the Sertoli cells. RXR $\gamma^{-/-}$ are viable, fertile and morphologically normal [49].

The compound mutants of RXR γ in a RXR $\alpha^{-/-}$ genetic background did not display additional abnormalities, whereas RXR $\beta^{-/-}$ /RXR $\gamma^{-/-}$ mice were morphologically normal although with locomotor deficiencies. RXR $\alpha^{-/-}$ /RXR $\beta^{-/-}$ embryos died earlier than RXR $\alpha^{-/-}$ mutants and displayed a more severe myocardial hypoplasia, thus indicating that RXR β can perform certain developmental functions. In contrast, such synergy was not observed between RXR β or RXR γ and the RARs [50,51].

These data strongly support the conclusion that RXR α /RARs heterodimers represent the main functional units of the RA signalling pathway during mouse embryonic development. Moreover, since RXR $\gamma^{-/-}$ /RXR $\beta^{-/-}$ /RXR $\alpha^{+/+}$ mutants are viable, a single allele of RXR α can perform most of the developmental functions, although all RARs are required for the formation of a normal trachea and for further lung development, while RAR γ seems more important for alveolar formation.

6. Retinoids receptors in lung cancer

It was discovered first that many lung cancer cell lines carry large non-random 3p14–25 deletions [52]. Then Houle et al. mapped the RAR β gene at 3p24 and demonstrated that RAR β expression was decreased [53] or even suppressed in lung cancer cell lines, suggesting that its re-expression could suppress malignity. This idea was reinforced when reintroduction of the RAR β gene into lung cancer cells suppressed their tumorigenicity in nude mice and when transgenic mice expressing antisense RAR β 2 RNA developed lung tumors [54]. However, in primary lung tumors, although RAR β expression was significantly decreased, no mutations were found to affect the RAR β gene itself. Hence, the mechanisms underlying this RAR β down-regulation are still poorly understood.

Xu et al. [55] analysed surgical specimens from patients with NSCLC by *in situ* hybridization (ISH) and reported that, in addition to RAR β , RAR γ and RXR β mRNAs were respectively decreased in 28% and 24% of their specimens. Our group performed a detailed characterization of RARs and RXRs in NSCLCs [40]. We evaluated the relative levels of RAR α , RAR β , RXR α and RXR β proteins using immuno-histochemistry (IHC) and correlated the results to mRNAs levels by quantitative RT-PCR and ISH. Over-expression of RAR α and RXR α were observed in 26% and 85% of the tumors, respectively. By contrast, a marked decreased expression of RAR β was observed in 63% of the tumors with a concomitant decreased expression of RXR β in 1/3 of this subset of tumors. Decreased expression of RAR γ was shown only by RT-PCR in 41% of the tumors. Additional loss of heterozygosity (LOH) at chromosome 3p24, near the RAR β locus, was observed in half of the informative specimens.

Using the methylation specific-PCR method described by Côté et al. [56] and the same tumor samples; we observed that decreased RAR β expression was significantly associated with a hypermethylation of normally unmethylated CpG islands in the P2-RAR β

promoter in 75% of the tumors (unpublished data). Similarly, a recent report also showed that methylation of the P2-RAR β promoter could be one mechanism silencing RAR β expression in small cell lung cancers (SCLCs) (72%) and in NSCLCs (41%) [57].

7. Retinoids receptors and bronchial precursor lesions

The sequence of events in the development of squamous carcinoma in the large airway is that carcinogens such as those contained in tobacco smoke lead to a series of morphologic and genetic changes [58], which ultimately lead to carcinoma. These changes include basal cell hyperplasia and squamous metaplasia, which are thought to be reversible, followed by varying degrees of dysplasia and ultimately by carcinoma *in situ*. The marked and frequent down-regulation of several RARs/RXRs in invasive carcinoma was inciting to investigate their status in bronchial precursor lesions.

For this purpose we used fluorescent PCR-based assays for allelotyping, at the RARs and RXRs loci, bronchial precursor lesions of different grades, as well as normal bronchial epithelium from smokers and non-smokers [59]. Microsatellite changes (LOHs) occurred frequently. But no change was common to a given type of lesion or associated with a specific grade of preneoplasia. They were only correlated to tobacco exposure and affected at most the RAR γ vicinity; a region prone to DNA breakage because it harbours a fragile site.

LOHs near the RAR β increased with the grade of lesions (from 0% in bronchial epithelium from non-smokers to 22% in bronchial epithelium from smokers, 35% in precursor lesions and 60% in paired tumors), with a concomitant decrease in RAR β protein expression and a P53 increased immuno-reactivity [59]. These results are similar to those reported by Xu et al. [55] about oral cancer precursor lesions. Using ISH, RAR β expression was found lost in 60% of the samples. Losses were increasing with the increasing grades of the lesions whereas the expression of the others receptors was not substantially altered.

8. Discussion

In experimental animal models of epithelial cancers, Vit A/retinoids were reported to suppress the malignant phenotype induced by chemical or physical carcinogens. They appeared most effective during the late tumor promotion phase [60]. But opposite results were also reported in high-risk individuals and were attributed to variations in retinol basal levels. In smokers, although reexpression of RAR β mRNA after 13-*cis* RA was observed in the bronchial mucosa there was no regression of squamous metaplasia [61]. Finally, all smoker-related diseases prevention trials with Vit A/retinoids have been so far very disappointing and ethically, it is impossible to continue prevention interventions with such compounds.

The reasons for such failures are not obvious. The level of RA is exquisitely tuned in the cell. It is possible that doses adjustment could be easier to achieve by inhalation, as shown recently when inhaled 13-*cis* RA up-regulated RARs expression in rodent lungs but not in their livers [62]. Similarly topical β -carotene prevented carcinoma formation in a two-stage model of skin carcinogenesis in mice [60]. Both studies suggest that RA as well as β -carotene systemic catabolism could generate toxic metabolites as was suggested for carotenoids metabolites suspected of being highly oxidated in smokers.

During the first stage of SQCLC, combined down-regulation of RAR β , RXR β and RXR γ seems to really induce a functional RA deficiency translated first as squamous metaplasia. But what is the initiating event affecting the genes: chromatin defect (allele loss, promoter hypermethylation) or RNA interference? Later, the tumors demonstrate almost the same RRs down-regulations.

Finally, RAR β down-regulation is not specific to lung cancer, it is as frequent in colon and breast cancers. This underlines the very important role of the Vit A/retinoids pathway in all tissues.

DNA damages are induced by tobacco smoke carcinogens. Individual genetic pedigrees condition carcinogens activation and adequate DNA repairs. Bronchial epithelial stem cells could be affected by these damages. Depending upon their stage of maturation these cells could be transformed to give SQCLC or ADC and even SCLC. Regions prone to carcinogens breakage and recombination could involve RAR β and RXR β whose hetero-dimerisation is important for the normal maturation of the adult bronchial cells.

Several mechanisms could explain the down-regulation of RRs: an over-degradation by the proteasome machinery [41] or also a ligand deficit, which has not been explored in detail. A full inventory of the enzymatic machinery leading to the synthesis of retinoids in the lung would be useful in this regard. Abnormal receptors forms could be deleterious in sequestering ligand, or occupying wrongly the RARE of target genes. On site aerosolised retinoids, selective RRs agonists, demethylating agents and histone acetylase inhibitors could synergise for a better lung cancer prevention. But before, we must understand better how does the Vit A/retinoids signalling work.

Conflict of interest statement

Authors have no conflict of interest to disclose.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants of: the Ligue Lorraine Contre le Cancer, the European contract "Early Lung Cancer Detection" QLRT 200101735, the contract no. 2002 for Clinical Research from the Centre Hospitalier Régional of Nancy and the Cancéropole Grand Est.

References

- [1] Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath Jr C. Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet* 1992;339:1268–78.
- [2] Cooper DA, Eldridge AL, Peters JC. Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: a review of recent research. *Nutr Rev* 1999;57:201–14.
- [3] Saffiotti U, Montesano R, Sellakumar AR, Borg SA. Experimental cancer of the lung. Inhibition by vitamin A of the induction of tracheobronchial squamous metaplasia and squamous cell tumors. *Cancer* 1967;20:857–64.
- [4] Missot JL, Mathé G, Santelli G, Gouveia J, Homasson JP, Sudre MC, et al. Regression of bronchial epidermoid metaplasia in heavy smokers with tretinate treatment. *Cancer Detect Prev* 1986;9:167–70.
- [5] Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol* 2002;3:461–9.
- [6] Hong WK, Lippman SM, Itri LM, Karp DD, Lee JS, Byers RM, et al. Prevention of second primary tumours with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1990;323:795–801.
- [7] Toma S, Raffo P, Isnardi L, Palumbo R. Retinoids in lung cancer prevention and treatment. *Ann Oncol* 1999;10:95–102.
- [8] Gouveia J, Mathé G, Hercend T, Gros F, Lemaigre G, Santelli G, et al. Degree of bronchial metaplasia in heavy smokers and its regression after treatment with a retinoid. *Lancet* 1982;1:710–2.
- [9] Lee JS, Lippman SM, Benner SE, Lee JJ, Ro JY, Lukeman JM, et al. Randomized placebo-controlled trial of isotretinoin in chemoprevention of bronchial squamous metaplasia. *J Clin Oncol* 1994;12:937–45.
- [10] No authors listed. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1994;330:1029–35.
- [11] Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1550–9.
- [12] Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;334:1145–9.
- [13] van Zandwijk N, Dalesio O, Pastorino U, de Vries N, van Tinteren H. EUROSCAN, a randomized trial of vitamin A and N-acetylcysteine in patients with head and

- neck cancer or lung cancer. For the European Organization for Research and Treatment of Cancer Head and Neck and Lung Cancer Cooperative Groups. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:977–86.
- [14] Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 1976;35:1332–8.
- [15] Warrel Jr RP, Frankel SR, Miller Jr WH. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-*trans*-retinoic acid). *N Engl J Med* 1991;324:1385–93.
- [16] Roth AD, Abele R, Alberto P. 13-*cis*-Retinoic acid plus interferon-alpha: a phase II clinical study in squamous cell carcinoma of the lung and the head and neck. *Oncology* 1994;51:84–6.
- [17] Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996;10:940–54.
- [18] Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:950–64.
- [19] Sun SY, Yue P, Malo L, Dawson MI, Shroot B, Lamph WW, et al. Identification of receptor-selective retinoids that are potent inhibitors of the growth of human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:1563–73.
- [20] Boisvieux-Ulrich E, Le Pechon-Vallée C, Million K, Baeza-Squiban A, Houcine O, Guennou C, et al. Differential effects of several retinoid receptor-selective ligands on squamous differentiation and apoptosis in airway epithelial cells. *Cell Tissue Res* 2000;300:67–81.
- [21] Kim SY, Adachi H, Koo JS, Jetten AM. Induction of the cytochrome P450 gene CYP26 during mucous cell differentiation of normal human tracheobronchial epithelial cells. *Mol Pharmacol* 2000;58:483–90.
- [22] Dawson MI. The importance of vitamin A in nutrition. *Curr Pharm Des* 2000;6:311–25.
- [23] Peters U, Leitzmann MF, Chatterjee N, Wang Y, Albanes D, Gelmann EP, et al. Serum lycopene, other carotenoids, and prostate cancer risk: a nested case-control study in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:962–8.
- [24] Zolfaghari R, Ross AC. Cloning, gene organization and identification of an alternative splicing process in lecithin:retinol acyltransferase cDNA from human liver. *Gene* 2004;341:181–8.
- [25] Linke T, Dawson H, Harrison EH. Isolation and characterization of a microsomal acid retinyl ester hydrolase. *J Biol Chem* 2005;280:23287–94.
- [26] Formelli F, Barua AB, Olson JA. Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl beta-glucuronide. *FASEB J* 1996;10:1014–24.
- [27] Bowman R, Clarke B, Duhig E, Larsen J, Fong K. Re: effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on hTERT expression in the bronchial epithelium of cigarette smokers. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:949–50.
- [28] Wei S, Episkopou V, Piantedosi R, Maeda S, Shimada K, Gottesman ME, et al. Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *J Biol Chem* 1995;270:866–70.
- [29] Ghyselinck NB, Bavik C, Sapin V, Mark M, Bonnier D, Hindelang C, et al. Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J* 1999;18:4903–14.
- [30] Lidén M, Tryggvason K, Eriksson U. Structure and function of retinol dehydrogenases of the short chain dehydrogenase/reductase family. *Mol Aspects Med* 2003;24:403–9.
- [31] Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 2000;267:4315–24.
- [32] Moise AR, Von Lintig J, Palczewski K. Related enzymes solve evolutionarily recurrent problems in the metabolism of carotenoids. *Trends Plant Sci* 2005;10:178–86.
- [33] Penning TM. AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clin Cancer Res* 2005;11:1687–90.
- [34] Niederreither K, Subbarayan V, Dollé P, Chambon P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 1999;21:444–8.
- [35] Lampron C, Rochette-Egly C, Gorry P, Dollé P, Mark M, Lufkin T, et al. Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABP2) or in both CRABP1 and CRABP2 are essentially normal. *Development* 1995;121:539–48.
- [36] Abu-Abed S, Dollé P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* 2001;15:226–40.
- [37] Maden M. The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development. *Proc Nutr Soc* 2000;59:65–73.
- [38] Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umehono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83:835–9.
- [39] Swift ME, Wallden B, Wayner EA, Swisshelm K. Truncated RAR beta isoform enhances proliferation and retinoid resistance. *J Cell Physiol* 2006;209:718–25.
- [40] Picard E, Seguin C, Monhoven N, Rochette-Egly C, Siat J, Borrelly J, et al. Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1059–66.
- [41] Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 2004;328:1–16.
- [42] Netter FH. Respiratory system. In: Divertie MB, editor. The CIBA Collection of Medical Illustrations, vol. 7. New Jersey: CIBA; 1980. p. 28–30.
- [43] Mollard R, Ghyselinck NB, Wendling O, Chambon P, Mark M. Stage-dependent responses of the developing lung to retinoic acid signaling. *Int J Dev Biol* 2000;44:457–62.
- [44] Hind M, Maden M. Retinoic acid induces alveolar regeneration in the adult mouse lung. *Eur Respir J* 2004;23:20–7.
- [45] Gottesman ME, Quadro L, Blaner WS. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 2001;23:409–19.
- [46] Borel P, Drail J, Faure H, Fayol V, Galabert C, Laromiguière M, et al. Recent knowledge about intestinal absorption and cleavage of carotenoids. *Ann Biol Clin (Paris)* 2005;63:165–77.
- [47] Dupé V, Ghyselinck NB, Wendling O, Chambon P, Mark M. Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development* 1999;126:5051–9.
- [48] Tarrade A, Rochette-Egly C, Guibourdenche J, Evain-Brion D. The expression of nuclear retinoid receptors in human implantation. *Placenta* 2000;21:703–10.
- [49] Mendelsohn C, Lohnes D, Décimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 1994;120:2749–71.
- [50] Wendling O, Chambon P, Mark M. Retinoid X receptors are essential for early mouse development and placentogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:547–51.
- [51] Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupé V, Grondona JM, et al. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 1997;124:313–26.
- [52] Kok K, Naylor SL, Buys CH. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv Cancer Res* 1997;71:27–92.
- [53] Houle B, Leduc F, Bradley WE. Implication of RARB in epidermoid (squamous) lung cancer. *Genes Chromosome Cancer* 1991;3:358–66.
- [54] Bérard J, Laboune F, Mukuna M, Massé S, Kothary R, Bradley WE. Lung tumors in mice expressing an antisense RARB2 transgene. *FASEB J* 1996;10:1091–7.
- [55] Xu XC, Sozzi G, Lee JS, Lee JJ, Pastorino U, Pilotti S, et al. Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:624–9.
- [56] Côté S, Sinnott D, Mompalmer RL. Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor beta gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 1998;9:743–50.
- [57] Virmani AK, Rathi A, Zöchbauer-Müller S, Sacchi N, Fukuyama Y, Bryant D, et al. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1303–7.
- [58] Klein N, Vignaud JM, Sadmi M, Plenat F, Borelly J, Duprez A, et al. Squamous metaplasia expression of proto-oncogenes and P 53 in lung cancer patients. *Lab Invest* 1993;68:26–32.
- [59] Martinet N, Alla F, Farré G, Labib T, Drouot H, Vidili R, et al. Retinoic acid receptor and retinoid X receptor alterations in lung cancer precursor lesions. *Cancer Res* 2000;60:2869–75.
- [60] Ponnampertuma RM, Shimizu Y, Kirchlof SM, De Luca LM. beta-Carotene fails to act as a tumor promoter, induces RAR expression, and prevents carcinoma formation in a two-stage model of skin carcinogenesis in male Sencar mice. *Nutr Cancer* 2000;37:82–8.
- [61] Lotan R, Xu XC, Lippman SM, Ro JY, Lee JS, Lee JJ, et al. Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *New Engl J Med* 1995;332:1405–10.
- [62] Wang DL, Marko M, Dahl AR, Engelke KS, Placke ME, Imondi AR, et al. Topical delivery of 13-*cis*-retinoic acid by inhalation up-regulates expression of rodent lung but not liver retinoic acid receptors. *Clin Cancer Res* 2000;6:3636–45.

Do Evolving Practices Improve Survival in Operated Lung Cancer Patients? A Biobank May Answer

Fotis Vlastos,*† Stéphanie Lacomme,* Pascal Wild,‡ Stéphane Poulain,* Joëlle Siat,*§ Gilles Grosdidier,*§ Stanislas du Manoir,|| Ben Monga,|| Georgios Hillas,† Roselyne Varsovie,* Frédérique Claudot,¶ Béatrice Marie,# Jean Michel Vignaud,*# and Nadine Szymanski*

Introduction: Biobanks may play a pivotal role in lung cancer patients' management, research, and health policy. The Nancy "Centre of Biologic Resources" analyzed the evolving profiles of operated lung cancer patients and their management over 20 years.

Methods: A total of 1259 consecutive patients operated upon from 1988 till 2007 were included. Survival rates were statistically compared before and after 1997. The parameters associated with a significant improvement of survival were determined.

Results: After 1997, lung cancer was diagnosed at an earlier stage. For Squamous Cell Lung Cancer (SQCLC), stages IA increased from 5.4 to 19.5% and for Adenocarcinoma (ADC), stage IA increased from 9.9 to 24.7%. More women with stage I ADC were operated upon after 1997 ($p = 0.01$). More patients with Large Cell Lung Cancer were diagnosed recently. Recent patients received more adjuvant or neo-adjuvant chemotherapy ($p < 0.001$) and less radiotherapy (stage I SQCLC: $p = 0.019$, stage I ADC: $p < 0.001$). A longer overall patients' survival was observed after 1997 (χ^2 test for SQCLC and ADC independently $p \leq 0.002$). Among SQCLC long survivors, those at stage I-II, below 50 years, were more numerous. A longer survival was associated with early stage in ADC patients. Stage was the single constant factor for overall outcome.

Conclusion: Overall and stage-adjusted survival of operated lung cancer patients has been improved in the last decade due mainly to earlier diagnosis. The generalized use of computed tomography scan, chemotherapy, and a collegial management improved patients' survival.

*Centre of Biological Resources/U 724 INSERM, Central Hospital, Cour d'Anatomie, Rue Lionnois, Nancy, France; †Department of Respiratory and Critical Care Medicine, "Sotiria" Chest Diseases Hospital, Athens, Greece; ‡Institut National de la Recherche et de la Sécurité (INRS), Department of Epidemiology, Vandoeuvre les; §General and Thoracic Surgery Department, Central Hospital, Nancy, France; ||Institute of Genetic, Molecular and Cellular Biology, INSERM U 596, CNRS UMR 7104, University Louis Pasteur, Strasbourg, France; ¶Department of Forensic Medical; and #Department of Pathology, Central Hospital, Nancy, France.

Disclosure: The authors declare no conflict of interest.

Address for correspondence: Dr. Fotis Vlastos, 152 Mesogeion Avenue 115 27, Athens, Greece. E-mail: fovlastos@yahoo.gr

F.V. is an associated Professor of Pulmonology from the French Ministry of Education.

Copyright © 2009 by the International Association for the Study of Lung Cancer

ISSN: 1556-0864/09/0404-0001

Key Words: Lung cancer, Thoracic surgery, Survival, Biobank.

(*J Thorac Oncol.* 2009;4: 000–000)

Lung cancer is one of the world's leading causes of cancer related death.¹ Europe and North America have the highest incidence rates.² At the beginning of the 21st century, there were about 375,000 cases of lung cancer in Europe resulting in about 347,000 deaths.² This incidence raised in 2004 to 381,500 cases. In France, about 28,000 new cases are recorded annually.³ It is the first cause of cancer-related death in men and the fourth in women.⁴ The region of Lorraine is severely affected, having the second highest incidence in France.⁴

Surgical resection is the treatment of choice for both nonadvanced and selected advanced patients.⁵ Though the French "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" created CRBs for research purposes, they are shown here to be of greater value. Nancy CRB has been developed in the Nancy Central Hospital, aiming to recruit operated lung cancer patients willing to donate their samples for cancer research.⁶ The CRB has accrued 1259 patients retrospectively from 1988.

In 1997, although the World Health Organization (WHO) lung cancer staging was modified, lung cancer management became collegial in Nancy Central Hospital. After 1997, the postoperative follow-up included a new 3 months out-patient evaluation by both a surgeon and a chest physician to decide on further management.

The goal of the study was to evaluate the evolving clinical presentation of the operable lung cancer disease and its management during the last 19 years in a single institution. Moreover, survival was analyzed with respect to parameters for surgery modality and additional treatment indications adjusting for the initial cancer stage. The characteristics of long survivors were assessed.

PATIENTS AND METHODS

Patients

The CRB collection was initiated in 1988 to store tissues samples of patients operated for lung tumors as a resource for research purposes. From 2002, all survivors and new patients were invited to give their informed consent, offer access to their medical records, retrieve their pre and

postoperative management, and to donate biologic material for research. Standard operating procedures were followed for all steps of samples collection and storage and for the retrieval of clinical annotations culminating in ISO 9001 certification of the biobank.

A retrospective study in which 1259 consecutive patients operated upon for primary lung cancer were followed up from 1988 to 2007 was conducted by the CRB. The information regarding demographic variables, such as age, gender, and smoking habits was collected. Familial and personal cancer histories with eventual occurrence of previous cancers and apparition of second primaries were recorded. The type of surgical resection and all relevant follow-up, preop and/or postoperative treatments, and the date and cause of death were registered. Tumor related data included tumor histotyping and tumor, node, metastasis (pTNM) staging (WHO version 6) and tumor size.

Postoperative mortality was considered as death occurrence upto 45 days after surgery. Second lung primary was considered when occurring at least 2 months after the first lung cancer surgery.

Study period was divided in two semi-periods, using 1997 as a cutoff year. In 1997, three important changes were enrolled concerning the management of operable lung cancer patients: the revision of TNM system, the generalization of computed tomography (CT) scan use in our area and the adoption of a collegial decision procedure.

The initial follow-up included a contact of the surgeon 1 month after the operation and every 6 months thereafter for 2 years. Then, general practitioners or chest physicians took care of the patients with varying schedules. In 1997, a first collegial examination was added of each patient candidate to surgery: the collegial management team included an oncologist, a surgeon, a chest physician, and a radiologist. Thus, adjuvant chemotherapy became a usual practice for certain patients. A supplementary contact was added 3 months after the operation with the surgeon and the chest physician. Follow-up by chest physicians was extended upto 7 years. CT scan use was generalized in our area by early 1997. No patient was lost to follow-up.

Statistical Analysis

The primary goal of this study was to compare survival in the two periods and analyze parameters correlated with survival. We also aimed to determine for each histologic type the predictive significance of each clinical parameter on the overall survival. All statistical analyses were done on the full patient subset and were carried out with the Stata software (StataCorp, College Station, Texas). Patient survival was described by a standard Kaplan- Meier estimate stratified on disease staging. If the patient died during the follow-up, patient survival was censored at the time of death. Long survivors were defined as free from clinical and radiologic local or distant relapse 5 years after surgery. The predictive significance of each parameters was then tested univariately in a nonparametric fashion by generalized Wilcoxon rank tests conducted at the 5% significance (level alpha <0.05). To model the survival with multiple parameters, we used a Cox proportional hazard model stratified on tumor. Stage was

used to assess the simultaneous contribution of the different covariates. The following variables were considered for entering the model: age, sex, tumor staging, smoking history, extent of surgery, preop and postoperative treatments. The Cox models were developed in a forward fashion based on changes in log-likelihood. Interactions between survival and the different parameters were also considered. Possible confounding effects by the other factors were systematically assessed. The results of the Cox model are given as hazard ratios by which the hazard of relapse is multiplied when the factor is present versus when it is absent. Postoperative mortality was analyzed using unconditional logistic regression and the results were expressed as odds ratios (OR).

RESULTS

Description of the Cohort

The epidemiological characteristics of our cohort are presented in Table 1. The population was mainly males (86.33%) and smokers (94.12%). The two most represented histologic types were squamous cell lung cancer (SQCLC) (49.64%) and adenocarcinoma (ADC) (38.68%). The 40.27% of the cohort was included in the period before 1997, whereas those included after 1997 represent 59.73%. Patients with stage IV lung cancer were a minority (4.92%). This is not peculiar because stage IV is inoperable by definition. Under special circumstances (young age, one isolated metastasis etc), some patients with stage IV lung cancer may be operated upon but their number is usually small. Patients with stage IIA disease were 3.49%, indicating the relative rarity of this

T1

TABLE 1. Main Characteristics of the Cohort in Number and Percentage of Patients

Age (mean ± SD) in years	61.62 ± 9.72
Males	1.087 (86.33%)
Females	172 (13.67%)
Smokers	1.185 (94.12%)
Never smokers	74 (5.88%)
Smoking history (pack/yr)	41.26 ± 22.1
SQCLC	625 (49.64%)
ADC	487 (38.68%)
LCLC	74 (5.88%)
NELT	73 (5.80%)
Stages	
IA	193 (15.32%)
IB	361 (28.67%)
IIA	44 (3.49%)
IIB	238 (18.9%)
IIIA	228 (18.10%)
IIIB	133 (10.56%)
IV	62 (4.92%)
Period 1: 1988–1997	507 (40.27%)
Period 2: 1997–2007	753 (59.73%)
Total	1.259

SQCLC, squamous cell lung cancer; ADC, adenocarcinoma; LCLC, large cell lung cancer; NELT, neuroendocrine lung tumors.

TABLE 2. Demographic, Clinical, and Surgical Characteristics of the Histological Subgroups, in Numbers of Patients and in Percentage

	SQCLC	ADC	LCLC	NELT	Total
Males	573 (91.6%)	396 (81.3%)	57 (77.0%)	61 (83.5%)	1087
Females	52 (8.4%)	91 (18.7%)	17 (23.0%)	12 (16.5%)	172
Age in years (SD)	63.19 (9.5)	60.15 (9.68)	58.10 (10.45)	61.34 (8.9)	
Never smokers	10 (1.6%)	54 (11.1%)	4 (5.4%)	6 (8.2%)	84
Smokers	615 (98.4%)	433 (88.9%)	70 (94.6%)	67 (91.8%)	1175
Smoking habits pack/years (SD)	43.64 (20.0)	38.55 (23.5)	37.02 (18.9)	43.43(29.2)	
(pTNM) stage					
IA	87 (13.9%)	92 (18.9%)	5 (6.8%)	8 (10.8%)	192
IB	196 (31.3%)	138 (28.3%)	19 (25.6%)	11 (15.0%)	364
IIA	28 (4.5%)	12 (2.5%)	3 (4.0%)	4 (5.7%)	47
IIB	118 (18.9%)	87 (17.9%)	16 (21.6%)	13 (17.7%)	234
IIIA	116 (18.6%)	79 (16.2%)	19 (25.6%)	14 (19.1%)	228
IIIB	64 (10.2%)	45 (9.2%)	7 (9.6%)	19 (26.0%)	135
IV	16 (2.6%)	34 (7.0%)	5 (6.8%)	4 (5.7%)	59
Period 1	257 (41.1%)	192 (39.4%)	14 (19.9%)	42 (57.5%)	507
Period 2	368 (58.9%)	295 (60.6%)	59 (80.1%)	30 (42.5%)	752
Pneumonectomies	225 (36.0%)	100 (20.5%)	46 (62.1%)	50 (68.4%)	421
Postoperative mortality	52 (8.3%)	20 (4.1%)	4 (5.4%)	6 (8.2%)	82
Overall mortality	235/625	220/487	33/74	39/73	527/1259

Overall mortality is also indicated for each group.

SQCLC, squamous cell lung cancer; ADC, adenocarcinoma; LCLC, large cell lung cancer; NELT, neuroendocrine lung tumors.

stage. The description of the histologic subgroups with their demographic, clinical and surgical characteristics is summarized in Table 2.

SQCLC patients tended to be older, although large cell lung cancer (LCLC) or ADC patients tended to smoke less. Mean smoking cessation period was longer for patients with SQCLC.

Survival—Comparison Between the Two Periods

The lung cancer related mortality of the cohort was 43.48% (527 of 1259 patients). Overall survival has been statistically increased for patients with SQCLC ($\chi^2 = 13.73$, $p = 0.002$) or ADC ($\chi^2 = 18.04$, $p < 0.001$) during the recent period. The number of operated lung cancer patients who died of their disease decreased during the recent period (245 versus 282). The proportion of patients who died in the previous and recent period was respectively 55.62 and 32.57%. Table 3 shows that the proportion of stage IA diagnosis increased sharply after 1997 for both main histotypes. The comparison of the estimated mortality rates between the two periods in these histotypes is shown in Table 4. Mortality rate ratios of the recent period comparing with the previous period for patients with SQCLC were significantly decreased for stages IB (0.057 versus 0.098) and IIB (0.086 versus 0.171). For patients with ADC, the respective significant rate ratios concerned the stages IB: (0.063 versus 0.110) and IIIA: (0.217 versus 0.496).

The number of pneumonectomies decreased during the recent years in favor of more limited resections (Tables 2). Overall postoperative mortality was 4.1 and 8.3%, for ADC

and SQCLC respectively. It remained statistically unaffected along the two studied periods.

The diagnosis of earlier SQCLC or ADC was more frequent after 1997. In patients with SQCLC, stages IA and IB increased from 5.41 to 19.57% and from 30.50 to 32.44%, respectively. In ADC, stage IA levelled from 9.90 to 24.75%. More ex-smokers with SQCLC stage I and more women with ADC stage I were operated after 1997 ($p = 0.01$ and $p = 0.02$, respectively).

Incidence of stage III presented a different evolution: SQCLC patients with IIIA disease were fewer recently (14.7 versus 23.9%), although stage IIIA ADC patients were almost equal between the two periods. Fewer patients with stage IV disease were operated in both histologic subgroups during the recent period.

Additional treatments were associated with opposite outcome regarding stage-adjusted survival. In stage I SQCLC patients, preoperative chemotherapy was more frequent after 1997 ($p = 0.04$), although postoperative radiotherapy was rarer ($p = 0.01$) (Table 4). In stage I ADC, postoperative chemotherapy increased steadily after 1997 ($p < 0.001$), although postoperative radiotherapy dropped ($p < 0.001$). In stage III SQCLC patients, postoperative chemotherapy increased after 1997 ($p < 0.001$), although postoperative radiotherapy diminished ($p = 0.02$) (Table 4). In stage III ADC patients, postoperative chemotherapy increased after 1997 ($p < 0.001$) and postoperative radiotherapy diminished ($p = 0.001$). This may contribute to the differences in stage-adjusted survival between the two periods. SQCLC patients with stages IB and IIB and ADC patients with stages IB and IIIA survived longer during the recent period. The effect of

TABLE 3. Comparison Between the Two Periods for Operated Patients with SQCLC or ADC

Stage	Period	Number of Deaths	Mortality Rate	95% Confidence Interval	Ratio Rate	95% Confidence Interval
SQCLC						
IA	2	6	0.084	0.038–0.188	3.11	1.00–9.64
	1	6	0.030	0.012–0.060		
IB ^a	2	32	0.057	0.039–0.083	0.59	0.35–0.97
	1	28	0.098	0.069–0.139		
IIA	2	5	0.092	0.029–0.287	0.92	0.22–3.83
	1	3	0.101	0.042–0.243		
IIB ^a	2	22	0.086	0.057–0.132	0.51	0.29–0.90
	1	26	0.171	0.116–0.251		
IIIA	2	37	0.240	0.174–0.332	1.40	0.80–2.43
	1	19	0.172	0.109–0.269		
IIIB	2	27	0.291	0.200–0.425	0.61	0.32–1.16
	1	14	0.478	0.283–0.808		
IV	2	7	1.254	0.598–2.632	7.47	1.93–28.89
	1	3	0.167	0.054–0.520		
ADC						
IA	2	7	0.040	0.019–0.083	1.12	0.39–3.19
	1	7	0.044	0.021–0.093		
IB ^a	2	13	0.063	0.036–0.108	1.73	0.92–3.28
	1	35	0.110	0.078–0.152		
IIA	2	4	0.420	0.157–1.118	0.70	0.18–2.80
	1	4	0.294	0.110–0.784		
IIB	2	18	0.180	0.113–0.285	1.31	0.73–2.32
	1	33	0.234	0.167–0.330		
IIIA ^a	2	23	0.217	0.144–0.328	2.28	1.29–4.02
	1	25	0.497	0.335–0.735		
IIIB	2	17	0.432	0.268–0.695	0.96	0.46–1.97
	1	13	0.413	0.240–0.712		
IV	2	9	0.360	0.187–0.690	1.06	0.45–2.51
	1	12	0.380	0.215–0.669		

Estimated mortality rates with lower/upper bounds of 95% confidence intervals are presented.

^aIndicate stages with statistically longer survival after 1997.

SQCLC, squamous cell lung cancer; ADC, adenocarcinoma.

chemotherapy upon the survival of stage III SQCLC patients was not demonstrated. This is also true for stage IIB or IIIB ADC patients.

An increase in the number of patients with LCLC was observed during the recent period affecting more the females (Table 2). More Neuroendocrine Lung Tumors were operated after 1997 (44 versus 29).

Prognosis Factors for Survival

Prognosis factors for survival differed between the major histologic types. Table 3 shows their respective hazard ratios for the Cox regression analysis.

Stage was the single common prognosis factor for all the patients (Figures 1, 2). In SQCLC patients, early stage was an independent favorable predictor. A favorable trend was observed for younger age and recent period. No significant association was found for sex or tobacco consumption excepting for the increase of ex-smokers after 1997. In ADC patients, early stage and the recent period were independent positive predictors with favorable trends for never smoker and female gender.

Tumor size did not affect SQCLC patients' survival. A T >4 cm (longest axis) was weakly associated with a shortened survival in ADC patients (log-rank test for equality of survivor functions, $p = 0.311$).

Pneumonectomy seemed as the major common determinant of postoperative mortality in both groups (for patients with SQCLC, the age-adjusted OR was 3.18 [95% CI: 1.75–5.81], whereas for patients with ADC was 3.29 [95% CI: 1.31–8.25]). SQCLC patients aged over 75 years were associated with a higher postoperative mortality. In ADC, the corresponding age-specific ORs versus age <55 years were as follows; for the group of the 65 to 75 years old patients: 4.84 (95% CI 1.00–23.5), for those over 75 years: 2.68 (95% CI: 0.23–30.9). Neither gender nor smoking status was significant factors for postoperative mortality.

Long survivors had different profiles depending upon the histology. SQCLC patients (42.90% of the patients still alive) tended to be younger at the time of surgery (age <50 years) and had an earlier staged disease. For operated SQCLC patients younger than 50 years, the OR of patients aged 50 to 60 years was 2.13, for patients aged 60 to 70 years was 2.99,

TABLE 4. Comparison of Clinical and Pathological Characteristics of Operated Patients with Earlier or Advanced Stages SQCLC or ADC Between the Periods 1988–1997 (Period 1) and 1997–2007 (Period 2)

Clinical and Pathological Characteristics	Earlier Stages (I or II)			
	SQCLC (%)		ADC (%)	
	Period 1	Period 2	Period 1	Period 2
Postoperative mortality	7	6.98 (<i>p</i> = 0.99)	5.34	3.52 (<i>p</i> = 0.42)
Age class in years				
0–50	11.00	8.84	10.69	10.61
50–60	26.00	22.33	27.48	35.35
60–70	39.00	35.35	41.22	33.33
>70	24.00	33.49 (<i>p</i> = 0.39)	20.61	20.71 (<i>p</i> = 0.41)
Mean age (±SD) at surgery (in years)	64.71 ± 9.62	62.68 ± 9.53	61.26 ± 9.51	62.25 ± 9.46
Females	8.08	9.95	10.69	21.72
Males	91.92	90.05 (<i>p</i> = 0.59)	89.31	78.28 (<i>p</i> = 0.01) ^a
Ex-smokers	41.00	57.21	50.38	43.94
Smokers	57.00	41.86	40.46	45.96
Nonsmokers	2.00	0.93 (<i>p</i> = 0.02) ^a	9.16	10.10 (<i>p</i> = 0.5)
Preoperative radiotherapy	1.00	1.4 (<i>p</i> = 0.77)	2.29	0.51 (<i>p</i> = 0.14)
Postoperative radiotherapy	14.00	6.05 (<i>p</i> = 0.01) ^a	29.77	5.05 (<i>p</i> < 0.001) ^a
Preoperative chemotherapy	3.00	9.30 (<i>p</i> = 0.04) ^a	0.76	7.07 (<i>p</i> = 0.007) ^a
Postoperative chemotherapy	5.00	7.44 (<i>p</i> = 0.41)	3.05	15.66 (<i>p</i> < 0.001) ^a
Advanced stage (III)				
Postoperative mortality	9.57	10.74 (<i>p</i> = 0.7)	6.38	1.30 (<i>p</i> = 0.12)
Age classes in years				
0–50	11.30	9.09	14.89	20.78
50–60	23.48	26.45	42.55	35.06
60–70	45.22	33.88	34.04	24.68
>70	20	30.58 (<i>p</i> = 0.17)	8.51	19.48 (<i>p</i> = 0.24)
Mean age (±SD) at surgery (in years)	63.40 ± 9.84	62.14 ± 9.76	59.25 ± 10.1	59.60 ± 8
Females	3.51	9.17	14.89	23.38
Males	96.49	90.83 (<i>p</i> = 0.07)	85.11	76.62 (<i>p</i> = 0.25)
Ex-smokers	45.22	55.37	38.30	38.96
Smokers	52.17	42.98	48.94	48.05
Never smokers	2.61	1.65 (<i>p</i> = 0.28)	12.77	12.99 (<i>p</i> = 0.99)
Preoperative radiotherapy	4.35	3.31 (<i>p</i> = 0.67)	2.13	0 (<i>p</i> = 0.19)
Postoperative radiotherapy	45.22	31.40 (<i>p</i> = 0.02) ^a	65.96	35.06 (<i>p</i> = 0.001) ^a
Preoperative chemotherapy	5.22	11.57 (<i>p</i> = 0.08)	6.38	10.39 (<i>p</i> = 0.44)
Postoperative chemotherapy	3.48	22.31 (<i>p</i> < 0.001) ^a	12.77	44.16 (<i>p</i> < 0.001) ^a

Numbers in brackets are *p* values.

^aUnderline statistical significance.

SQCLC, squamous cell lung cancer; ADC, adenocarcinoma.

and for patients older than 70 years was 2.48. Furthermore, advanced stages showed increased ORs compared with stage IA. After stage adjustment, tobacco consumption was examined. Among SQCLC, the majority of long survivors were recent quitters. Long survivors were fewer among the ADC patients (33.88%). Although age at surgery was not a significant predictor for a longer survival, early stage, female sex, and never smokers seemed to be independent positive predictors of a longer survival.

Second Primary, Recurrence of First Primary, Personal and Familial History of Cancer

A nonnegligible group of both SQCLC and ADC patients presented a second primary lung cancer (6.01% for

SQCLC and 18 3.69% for ADC). This occurred in an interval of 3.84 years (±3.55) in SQCLC patients and of 3.84 years (±2.9) in ADC patients. Patients who presented a second primary tended to be heavier smokers. Patients with initial SQCLC tended to present a second primary of the same histology, whereas patients with initial ADC presented as much a second ADC than a second SQCLC.

Local recurrences of lung cancer needing a complementary surgery were observed in 12 patients with SQCLC and 15 patients with ADC. The mean interval for such recurrences was 1.5 (±1.4) years for SQCLC patients and 1.5 (±0.8) years for ADC patients. Stage-adjusted estimated rates of mortality tended to be higher for such patients.

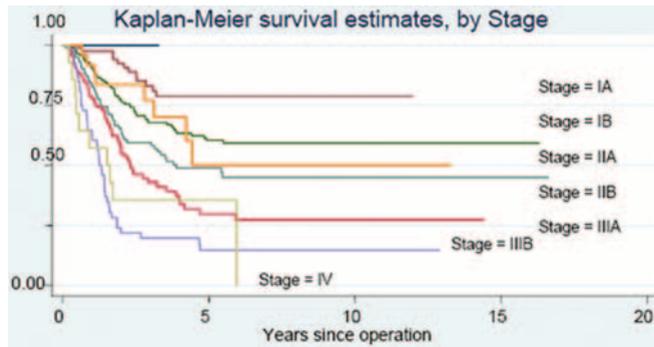


FIGURE 1. Kaplan-Meier stage-adjusted survival curves describing the survival rates among patients with squamous cell lung cancer (SQCLC).

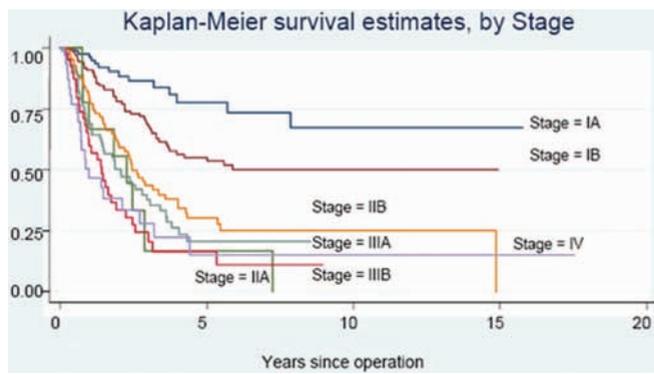


FIGURE 2. The stage-adjusted survival rates among patients with adenocarcinoma (ADC).

Analysis of cancer history of patients revealed that 10.46% among the SQCLC patients and 5.75% among the ADC patients presented a Head and Neck Cancer (HNC). In SQCLC patients, it seemed 5.49 (± 9) years before the lung cancer. In ADC patients, this interval was 5.3 (± 14) years. A diagnosis of HNC was recorded in 0.95% of patients already operated for SQCLC and in 0.62% of patients operated for ADC. Tobacco-related bladder cancer preceded lung cancer in 2.06% of SQCLC patients and in 1.85% ADC patient. It followed the lung primary in 0.79% of SQCLC patients and in one patient with ADC.

Twenty-one patients had a history of three different primary tumors. Interestingly, 31.25% of females with LCLC ($n = 5$) had a history of breast cancer. Thirteen patients had a kidney cancer. Nine patients had a history of kidney transplantation. Six others had previously a Hodgkin lymphoma.

About 7% of all patients had at least one first degree relative with a cancer history, whereas 2% had 2 first degree relatives with cancer: a lung, a head and neck or/and a digestive tract cancer in most cases (50%) with colon cancer being the most frequent. Varied cancers affected the other half of such families with predominant prostate and breast cancers in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Familial hematological malignancies concerned more ADC

patients, although breast and thyroid cancers were preponderant between LCLC patients.

DISCUSSION

Early diagnosis constitutes the critical tool in the current effort to diminish lung cancer mortality. The generalized use of CT scan for earlier diagnosis and better staging plays an important role.^{7,8}

A weak but clear benefit in survival, adjusted for stage, has been shown in this study for the post-TNM revision period (1997–2007). More patients with stage IA were diagnosed during this period. Apart from an increased awareness to follow populations at high risk, a more frequent use of CT scan explains this observation. The absence of such a kind of awareness explains the delayed diagnosis of ADC and even LCLC in nonsmoking women before 1997. Furthermore, additional treatments (chemo- and radiotherapy) demonstrated opposite effects upon patients' survival. Chemotherapy became more frequent after 1997, whereas radiotherapy decreased. Adjuvant and neo-adjuvant chemotherapy offered a longer survival to our patients' measurable benefit to our patients after 1997.

Improved survival during recent years may also be linked to better staging due to superior CT technique and equipment. Positron emission tomography was introduced lately positron emission tomography scan was introduced lately and none of the patients of our cohort was benefited from it. The surgical team remained unchanged but its surgical skills may be improved over the years.

This study corroborates the validity of the established cornerstones of lung cancer diagnosis and treatment: histology and pTNM staging. Operated patients showed a discrete postoperative survival pattern characterized by different prognosis factors depending upon the histotype: age for SQCLC patients, sex, and smoking habits for ADC patients. Beyond these distinct patterns, stage remained the only common prognosis factor for survival in both groups.

In ADC patients with stage I disease, a tumor size ≥ 4 cm was an unfavourable prognosis factor. This may reflect the correlation of the T with survival or a different pattern of natural history for ADC. A cutoff size of 4 cm was proposed to distinguish T2 from T3, based on correlation between T size and survival in patients with NSCLC.⁹ In patients with a pN0 NSCLC, a tumor size greater than 5 cm was associated with a worse prognosis.¹⁰ In patients with stage I NSCLC, a study reported 2 and 5 cm as the 2 cutoff sizes regarding the prognosis.¹¹ Similarly, tumor size was shown to be an independent prognosis factor in patients operated for stage I NSCLC, with 2 and 5 cm being the thresholds of prognosis modification.¹² The addition of stage IIA in the WHO staging system has been proven of limited value because it concerns very few patients. Alternatively, measuring the tumor size might be more helpful for the postoperative management of the patients.

Gender seemed as a favorable predictor in ADC patients. Women had better prognosis and lesser postoperative mortality. Female sex seemed also as a favorable prognosis factor in many studies.^{13,14} A lower postoperative mortality

was likewise reported for French women.¹⁵ We found this advantage for women only in ADC, due perhaps to the few women among the SQCLC patients.

Being less than 50 years old is correlated with a longer stage-adjusted survival only in patients with SQCLC. This confirms earlier reports.^{13,16,17} Relative survival of all patients was found to be decreased with age at diagnosis, regardless of stage or demographics.¹⁸

Postoperative mortality remained stable throughout the study period, though a decrease in pneumonectomies is found during the recent years. Being older than 75 was a negative predictor for postoperative mortality in patients with SQCLC. This is consistent with the presence of a greater comorbidity and has already been reported.^{19,20} Nevertheless, it may be also linked to more pneumonectomies performed in elderly SQCLC comparing with ADC patients (14 versus 4).

Long survivors presented a different profile depending on histology. Stage was the only common predictive factor for long survivors. Among SQCLC patients, younger subjects with earlier stages tended to live longer. Long survivors with ADC were fewer than those with SQCLC and were mostly women and never smokers. Tumor and host-related biologic factors have been hypothesized for this advantage of female patients with ADC.²¹ Patients with a history of HNC seem particularly at risk for presenting a second primary lung cancer.²² Therefore, a close follow-up has to be proposed for patients with heavy smoking and previous HNC. It should exceed 5 years after diagnosis. For patients with a HNC history, the lung tumor is most often a SQCLC (2/1, comparing with ADC). This may be due to the “field effect” of tobacco smoking.²³

Our study presents a number of limitations and one of them is that not all the relevant characteristics have been recorded. This is mainly due to the initial design of our database (1988). At that time, only the presented characteristics were appeared as clinically relevant.

Biobanks are able to demonstrate that a collegial management and extended survey benefit lung cancer patients. They are doing more than distributing patients’ samples for research. Biobanks are hospital structures able to help the evaluation of the effects of new medical practices for lung cancer management.

Overall and stage-adjusted survival of operated lung cancer patients has been improved in the last decade due mainly to earlier diagnosis. The generalized use of CT scan, chemotherapy, and a collegial management improved patients’ survival.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported, in part, by the 5th PCRDT (to S.L.), Région Lorraine (to S.P.), Support came also from Lorraine and Haut-Rhin Ligue Contre le Cancer, National Ligue Contre le Cancer (CIT-program), Institut National du Cancer and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Cancéropole Grand-Est.

The authors thank Virgine Laugel for manuscript reading and suggestions.

REFERENCES

- Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003;123:21S–49S.
- Tyczynski JE, Bray F, Parkin DM. Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention and early treatment. *Lancet Oncology* 2003;4:45–55.
- Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005;16:481–488.
- Ministère de la Santé, de la Famille et des Personnes handicapées, Ministère délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies. Rapport de la Commission d’orientation sur le cancer. Paris: Direction générale de la Santé; 2003.
- Gawrychowski J, Gabriel A, Lackowskat B. Heterogeneity of stage IIIA non-small lung cancers and evaluation of late results of surgical treatment. *Eur J Surg Oncol* 2003;29:178–184.
- Claudot F, Malservet N, Gallina-Muller C, et al. Le Centre de Ressources Biologiques Oncogénèse thoracique. *Bull Cancer* 2004;91:201–203.
- The International Early Lung Cancer Action Program Investigators. Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *N Engl J Med* 2006;355:1763–1771.
- Jett JR, Midhun DE. Screening for lung cancer: current status and future directions. *Chest* 2004;125:158S–162S.
- Mulligan CR, Meram AD, Proctor CD, et al. Lung cancer staging: a case for new T definition. *Ann Thorac Surg* 2006;82:220–226.
- Takeda S, Fukai S, Komatsu H, et al. Impact of large tumour size on survival after resection of pathologically node negative (pN0) non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2005;79:1142–1146.
- Christian C, Erica S, Morandi U. The prognostic impact of tumour size in resected stage I non-small cell lung cancer: evidence for two thresholds tumour diameter classification. *Lung Cancer* 2006;54:185–191.
- Koike T, Tsuchiya R, Goya T, Sohara Y, Miyaoka E. Prognostic factors in 3,315 completely resected cases of clinical stage I non-small cell lung cancer in Japan. *J Thorac Oncol* 2007;2:408–413.
- Ramalingam S, Pawlish K, Gadgeel S, Demers R, Kalemkerian GP. Lung cancer in young patients: analysis of a Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *J Clin Oncol* 1998;16:651–657.
- Thomas L, Doyle A, Edelman MJ. Lung cancer in women. Emerging differences in epidemiology, biology and therapy. *Chest* 2005;128:370–381.
- Foucault C, Berna P, LE Pimpec Barthes F, et al. Lung cancer in women: surgical aspects related to gender. *Rev Mal Respir* 2006;23:234–253.
- Radzikowska E, Roszkowski K, Glaz P. Lung cancer in patients under 50 years old. *Lung Cancer* 2001;33:203–211.
- Minami H, Yoshimura M, Matsuoka H, et al. Lung cancer treated surgically in patients <50 years of age. *Chest* 2001;120:32–36.
- Wingo PA, Ries LA, Parker SL, Heath CW Jr. Long-term cancer patient survival in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:271–282.
- Licker MJ, Widikker I, Robert J, et al. Operative mortality and respiratory complications after lung resection for cancer: impact of chronic obstructive pulmonary disease and time trends. *Thorac Surg* 2006;81:1830–1837.
- Shiono S, Yoshida J, Nishimura M, et al. Risk factors of post-operative respiratory infections in lung cancer surgery. *J Thorac Oncol* 2007;2:34–38.
- Neugut AI, Jacobson JS. Women and lung cancer. Gender equality at a crossroad? *JAMA* 2006;296:218–219.
- Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1995;75:1343–1353.
- Neugut AI, Sherr D, Robinson E, Murray T, Nieves J. Differences in histology between first and second primary lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992;1:109–112.

AQ: E

AUTHOR QUERIES

AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES

1

A—Kindly note that the short title has been shortened further per journal style. Kindly check whether it is OK as given.

B—Kindly provide the highest obtained educational qualification for the all the authors.

C—Kindly check whether the sentence, “A total of...” is OK as edited.

D—Kindly spell out, “CRB.”

E—Kindly check whether the page range for Ref. 7 is OK as given.

F—Kindly check whether the affiliation is OK as given.

G—Kindly check whether the corresponding author information is OK as given.



The synthesis, photophysical properties and energy transfer of a coumarin-based bichromophoric compound

J.E. Fortier^a, P. Even-Hernandez^b, F. Baros^a, S. Poulain^c, N. Martinet^c, M. Donner^c, C. Gouyette^d, M.C. Carré^{a,*}

^aDCPR – UMR 7630 CNRS – INPL, Nancy-Université, ENSIC, 1 rue Grandville, B.P. 20451, F-54001 Nancy Cedex, France

^bUMR 6226 CNRS-Université de Rennes 1 “Sciences Chimiques de Rennes” Bât. 10C, Campus de Beaulieu, 263, Avenue du Général Leclerc, F-35042 Rennes, France

^cCentre de Ressources Biologiques, INSERM U724, Avenue de la Forêt de Haye, F-54505 Vandoeuvre les Nancy, France

^dPlate-forme Synthèse d'Oligonucléotides longs à haut débit, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 February 2008

Received in revised form 16 May 2008

Accepted 28 May 2008

Available online 7 June 2008

Keywords:

Fluorescent probes

Coumarins

Bichromophoric compound

Methyl red

Energy transfers

ABSTRACT

The energy transfer between two coumarin compounds having donor emission/acceptor absorption spectra overlap was studied firstly in solution by applying an excess of the acceptor. The observed transfer was then confirmed in the bichromophoric compound resulting from the covalent binding of the two fluorophores via a short alkyl chain.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Multiplexing of fluorescent labels is frequently required in biology and more particularly in molecular biology. Firstly applied in the Sanger sequencing, it is now well adapted for PCR technology. Among the different probes used in this technology, molecular beacons (MB) first described by Tyagi and Kramer [1] are largely developed as seen by the numerous works published during the last decade [2,3]. MB are hairpin-shaped oligonucleotides carrying at their extremity both a fluorophore and a quencher in close proximity. In this conformation, energy emitted by the excited fluorophore is absorbed by the quencher and dissipated. By interaction with its specific target oligonucleotide, the structure opens and the resulting fluorescence measured is then directly proportional to the quantity of the DNA fragment present. Many fluorescent probes and adapted quenchers are either commercially available or synthesized. Amongst them, we were interested in the wavelength-shifting chromophores described by the pioneers of this method [4]. The authors have developed this kind of compounds to access fluorophores with various colors being excited by

a common monochromatic source. Our goal aims at combining two fluorophores in structures showing various fluorescence emission fields but being quenched by a common quencher (Scheme 1).

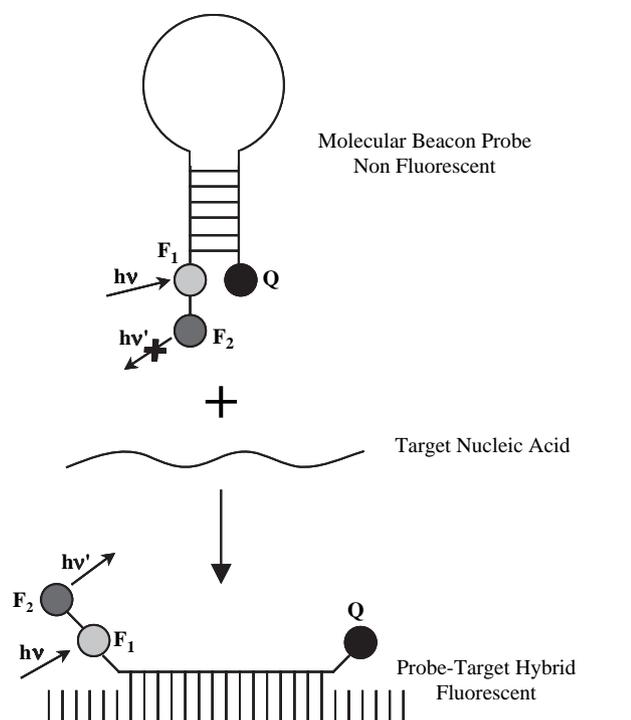
In previous work, we have shown that fluorophores belonging to molecular rotors could be applied in various fields and among them, coumarin dyes remain interesting probes [5,6]. Indeed, due to their separated photophysical fields, we are intended to combine two different coumarin compounds to evidence energy transfer. The two coumarins chosen have been already studied in bichromophores' structures [7–9], but their association is different as the way to link them. We describe herein the synthesis of a bichromophoric compound **1** (NCouOCou) trying to obtain structures that could be later applied in molecular biology. Compound **1** (NCouOCou) was synthesized from the two different coumarin compounds designed, respectively, by **2** (HOCou) and **3** (NCou) (Fig. 1).

The energy transfer was firstly performed in solution between the two free coumarins by using a method tested previously in our laboratory to demonstrate the fluorescence quenching of fluorescein by iodide anions [10]. The transfer was then confirmed in the bichromophoric compound. Moreover, methyl red (MR), a dabcyll isomer, has been successfully tested as quencher.

The interesting photophysical properties found show that this strategy could be further extended to achieve a series of compounds with different wavelengths range.

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)3 83 17 51 20; fax: +33 (0)3 83 17 81 20.

E-mail address: Marie-Christiane.Carre@ensic.inpl-nancy.fr (M.C. Carré).



Scheme 1. A schematic representation of a molecular beacon with a bichromophore (donor F_1 /acceptor F_2) on one end and a donor quencher on the other end.

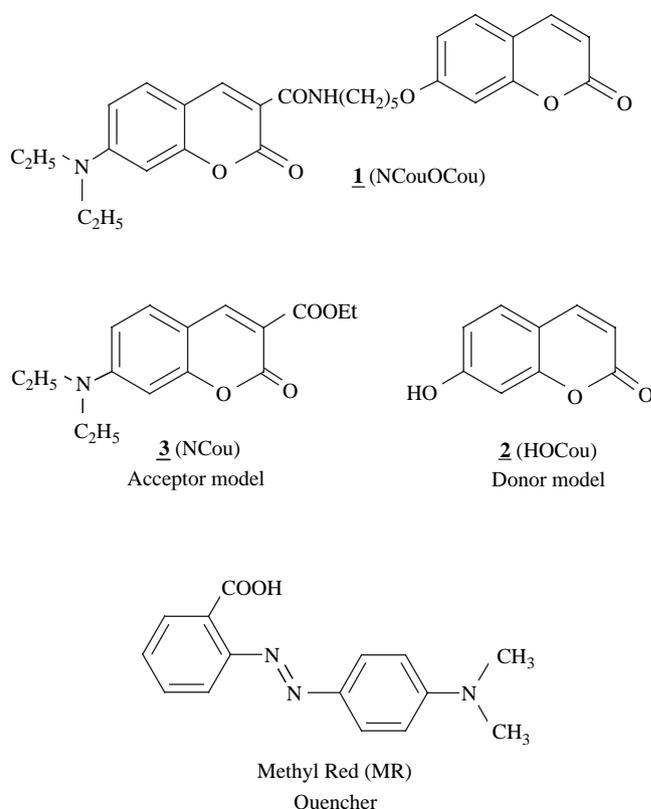


Fig. 1. Structures of the investigated compounds: three fluorescent dyes **1–3** and methyl red (MR) quencher.

2. Experimental

2.1. Materials and instrumentation

Chemicals and solvents were purchased from Aldrich and SdS. Thin layer chromatography was performed using silica gel plates (60 F254, Merck). Liquid chromatography was performed using silica gel (70–200 μm , chromagel, SdS).

^1H NMR spectra were recorded in CDCl_3 on a Bruker Avance 300 spectrometer; chemical shifts (δ , ppm) were referenced internally to solvent signal. UV/vis absorption spectra were recorded on a Lambda EZ210 spectrophotometer (Perkin–Elmer). Fluorescence excitation and emission spectra were obtained with a Spex-Fluorolog-3 (HORIBA, Jobin Yvon) spectrofluorimeter. Measurement of fluorescence decays was performed by way of the single photon counting (SPC) technique [11] using a self-assembly apparatus. Excitation was provided by a pulsed lamp nF900 (Edinburgh Instruments) filled with hydrogen. The acquisition chain comprises a microchannels' plate photomultiplier R2287U (Hamamatsu) whose signal, after amplification and discrimination, is directed to a time–amplitude converter 2145/1467 (Canberra) in the same time than a synchronisation signal issued from a photomultiplier coupled by fiber optic to the lamp. Acquisition of the histogram of the fluorescence decay was then performed by a multichannels' analyser coupled to a microcomputer. Analysis of experimental decays was made with a homemade software using a deconvolution–reconvolution method with gold number dichotomy [12]. This method requires an assumption on the analytical equation governing decays (mono- or bi-exponential, or else ...).

2.2. Syntheses

7-Hydroxycoumarin **2** (HOCou) was a commercial sample. Compound **4** (NCouCOOH) was synthesized by Knoevenagel condensation of Meldrum's acid with 4-(diethylamino)salicylaldehyde

according to Ref. [13]. Brominated coumarin compound **5** was prepared following the protocols described elsewhere [5].

2.2.1. 7-[5-(7-diethylaminocoumarin-3-carboxamido)pentyl]oxy]coumarin **1** (NCouOCou)

Equimolar ratio (0.25 mmol) of **2** (HOCou) (40.5 mg) and brominated coumarin **5** (102.25 mg) was added to DMF (0.5 mL). K_2CO_3 (155.25 mg, 0.75 mmol, 3 equiv) was then added and the mixture was strongly stirred at room temperature for 14 h. H_2O was added to the mixture and the solution was extracted with CH_2Cl_2 . The organic phase was dried (MgSO_4), filtered and evaporated to dryness to give crude compound. Chromatography on silica gel ($\text{EtOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 0.5–3%, v/v) gave **1** (NCouOCou) as a yellow solid.

Yield: 102 mg, 0.208 mmol, 83%; m.p. 139 °C. ^1H NMR (CDCl_3) δ_{H} (ppm): 1.25 (6H, t, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.47–1.95 (6H, m, $-\text{CONHCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{OAr}$), 3.47 (6H, m, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ and $-\text{CONHCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{OAr}$), 4.03 (2H, t, $-\text{CONHCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{OAr}$), 6.23 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H_3 **2** (HOCou)), 6.53 (1H, s, H_8 **3** (NCou)), 6.75 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H_6 **3** (NCou)), 6.82 (2H, m, H_6 , H_8 **2** (HOCou)), 7.36 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H_5 **2** (HOCou)), 7.43 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H_5 **3** (NCou)), 7.62 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H_4 **2** (HOCou)), 8.71 (1H, s, H_4 **3** (NCou)), 8.84 (1H, br, $-\text{CONH}$). FAB-HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$ 513.20016 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, found 513.2008 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

2.3. Photophysical study

The fluorescence quantum yields (ϕ_f) were determined in ethanol using fluorescein as reference ($\phi_f = 0.79$ at 25 °C) [14], by exciting fluorescein (R) and the sample (S) of unknown quantum yield at the same wavelength at weak absorbance (respectively, A_R and A_S). Quantum yield ϕ_f was then obtained from the rate of the surfaces of the emission spectra (S_R and S_S), according to

$$\phi_f = 0.79 \times \frac{(S_S/A_S)}{(S_R/A_R)}$$

For the energy transfer between the two coumarins, the **2** (HOCou) solution (A) in ethanol was 5×10^{-6} M. The second solution (B) was composed with the same concentration of **2** (HOCou) i.e. 5×10^{-6} M and a greater concentration of **3** (NCou) at 4×10^{-5} M. Nine samples were prepared by mixing volumes of solution B starting from 0.3 mL and subsequent increasing by 0.3 mL level completed at 3 mL by the solution A. By this way, concentration of **2** (HOCou) remained constant, while the concentration of **3** (NCou) varied from 4×10^{-6} M to 4×10^{-5} M.

For the quenching study with MR, the **1** (NCouOCou) solution in ethanol was 5×10^{-6} M. The second one comprised the same concentration of **1** (NCouOCou) i.e. 5×10^{-6} M and a greater concentration of MR at 4×10^{-5} M. By mixing the two solutions as above, nine samples were obtained with **1** (NCouOCou) concentration constant and MR concentrations ranging from 4×10^{-6} M to 4×10^{-5} M.

3. Results and discussion

3.1. Choice of the probes

After having analysed different spectra of commercially available or synthesized fluorophores, the study started with two coumarinic compounds which should give access to a bichromophore with planned properties. In Fig. 1, are shown the two base coumarinic structures on which the photophysical characterization was investigated separately. The first one acting as the donor was the commercial umbelliferone: 7-hydroxycoumarin **2** (HOCou); the second, acceptor part is an amino coumarin derivative **3** (NCou) already studied in our laboratory [5,6]. Fig. 2 illustrates respective excitation and emission spectra in ethanol of coumarins **2** (HOCou) and **3** (NCou): a good overlap of the donor emission spectrum with the acceptor absorption one is observed, which is predictable of a transfer possibility. At this stage, this fact was very promising for the target of our study, therefore the coupling synthesis between the two compounds was approached.

3.2. Synthesis of the coumarin-based bichromophore **1** (NCouOCou)

The best way to obtain the bichromophoric compound **1** (NCouOCou) is shown in Scheme 2. The commercial 7-hydroxycoumarin **2**

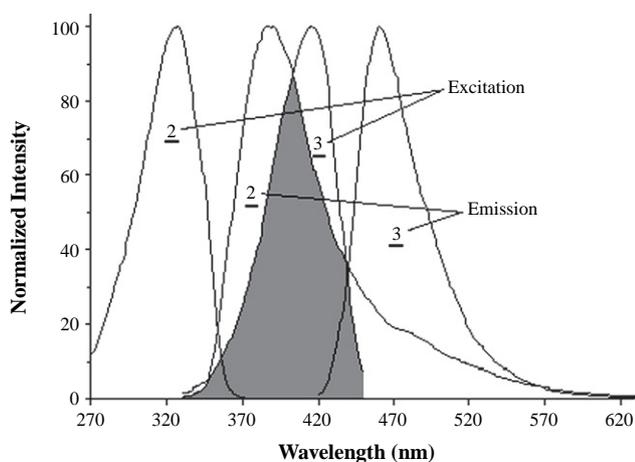


Fig. 2. Normalized fluorescence excitation and emission spectra of **2** (HOCou) and **3** (NCou) in EtOH at RT; visualisation of the overlap between donor emission and acceptor excitation.

(HOCou) acting as donor was used as such in the final coupling step. The acceptor part needed some modification steps: the base coumarin was first prepared by a protocol leading directly to the corresponding coumarin acid derivative **4** at very high yield as reported [13]. Compound **5**, alkylbrominated derivative of **3** (NCou), was synthesized in two steps as reported in Ref. [5]. In the last step, alkylation of the phenoxy moiety of the donor coumarin **2** (HOCou) with **5** was performed in the presence of K_2CO_3 in DMF, to yield 83% of the bichrominic compound **1** (NCouOCou).

3.3. Energy transfer studies

As reported in Refs. [15,16], the mechanism of energy transfer between a donor molecule D and an acceptor molecule A can be radiative or not.

Considering the radiative transfer where an emitted photon from D is absorbed by A, in addition to an overlap of the donor emission and acceptor absorption spectra, a large excess of A is required to quantify this effect. In this case, the shape of the donor emission spectrum is modified in the region of spectral overlap.

In the non-radiative case, the interaction can be of dipole–dipole nature operating at distances up to 80–100 Å. Here, the donor emission spectrum shape is not affected.

Measurement of fluorescence decays is a complementary way to determine if the transfer is radiative or not, and in the last case to calculate some kinetics parameters (such as the yield of transfer).

In the simple case of a donor molecule with a mono-exponential decay

$$D \exp(-t/\tau_d)$$

where t is time and τ_d the lifetime of donor molecule, two situations can occur:

- a radiative transfer, where the donor decay becomes

$$D' \exp(-t/\tau_d)$$

(with $D' < D$, but the SPC technique cannot determine the absolute values of pre-exponential factors),

- a non-radiative transfer, where the donor decay is now

$$D'' \exp(-t/\tau'_d)$$

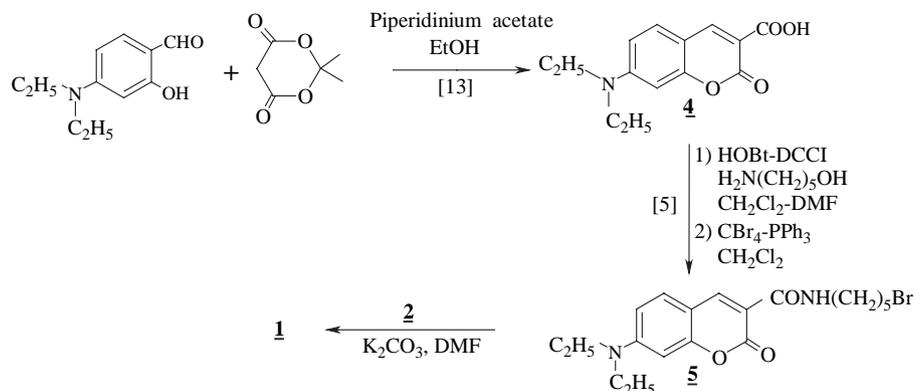
(with $\tau'_d < \tau_d$) and the acceptor one is such as $A \exp(-t/\tau_a) - A''' \exp(-t/\tau'_d)$ (with τ_a the lifetime of acceptor).

In order to discriminate the two effects, a steady-state study on the three compounds and some pulsed excitation analyses have been performed.

3.3.1. Study of the two free coumarins **2** (HOCou) and **3** (NCou)

3.3.1.1. Steady-state study. To approach the transfer in solution between the two dyes, we have followed a method already used in our laboratory [10] and largely argued [15,16]. For this purpose, a series of nine solutions were prepared (see Section 2). Fig. 3 reports emission spectra of the two dyes after excitation at 320 nm of these obtained different solutions.

Obviously, we observe the classical features of an energy transfer, that is a large decrease of the fluorescence of the donor (localized initially at 390 nm) and a concomitant increase of the acceptor band at 456 nm. We can see a modification of the donor spectra in the overlap region blue wavelength shifted from 390 to 373 nm, occurring in the same time which is in favour of a radiative transfer, as already mentioned by Valeur [15].



Scheme 2. Synthesis of 7-[5-(7-diethylaminocoumarin-3-carboxamido)pentyl]oxy]coumarin **1** (NCouOCou).

The efficiency of the energy transfer Φ_T may be assessed by using the following relation [15]

$$\Phi_T = 1 - I_D/I_0$$

where I_D is the fluorescence intensity of the donor in the presence of acceptor, I_0 the fluorescence intensity of the donor without acceptor.

The values of Φ_T calculated as a function of acceptor concentration and gathered in Table 1 indicate clearly an increase of energy transfer efficiency Φ_T correlated with **3** (NCou) acceptor concentration. The fluorescence of the acceptor was evaluated by subtracting from the rough signal, the spectra of both direct excitations of the donor and acceptor.

3.3.1.2. Pulsed excitation study. In the case of transfer from **2** (HOCou) to **3** (NCou) in solution, the lifetime of **2** (HOCou) (UV excitation, emission between 380 and 420 nm, concentration 5×10^{-6} M) was measured as 0.78 ns without **3** (NCou) and as 0.79

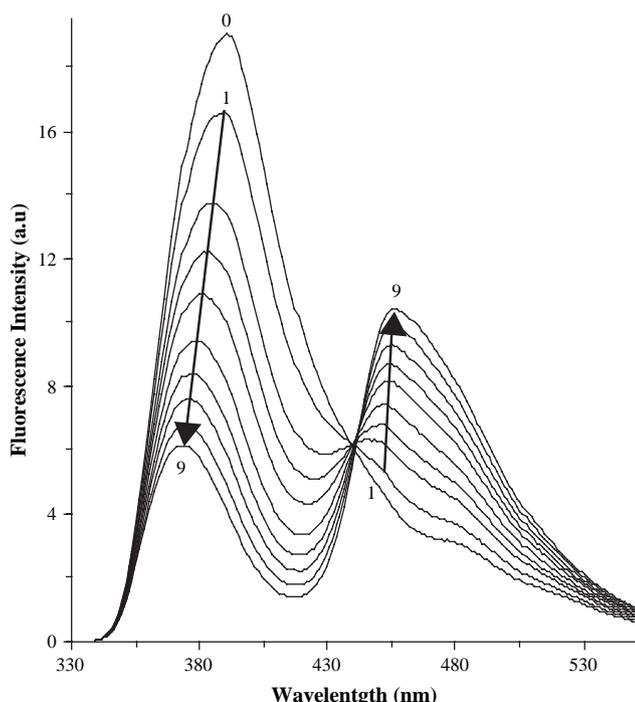


Fig. 3. Energy transfer from **2** (HOCou) to **3** (NCou) in EtOH at RT ($\lambda_{exc} = 320$ nm) by increasing acceptor **3** (NCou) concentration (0: **2** (HOCou) alone, 5×10^{-6} M; 1–9: **2** (HOCou), 5×10^{-6} M with **3** (NCou) varying from 4×10^{-6} M to 4×10^{-5} M).

and 0.77 ns in the presence of **3** (NCou) at concentrations of 10^{-5} M and 6×10^{-5} M, respectively. These values are similar (according to the accuracy of our apparatus) and confirm the results observed above in accordance with a radiative transfer.

3.3.2. Study of the bichromophoric compound **1** (NCouOCou)

3.3.2.1. UV/vis absorption spectra. As reported in Fig. 4, it appears that the bichromophoric compound shows the characteristics of the two initial free compounds.

Indeed, the absorption spectrum of **1** (NCouOCou) displays two maxima signals at 321 nm ($\epsilon = 18,700$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$) and at 418 nm ($\epsilon = 46,000$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$), respectively (Table 2), confirming the presence of two independent fluorophores, as required for an energy transfer [17,18].

3.3.2.2. Emissive properties. The excitation at 320 nm (absorption domain of **2** (HOCou)) was realized on the three compounds (Fig. 5).

For **2** (HOCou), we can observe fluorescence emission at 390 nm. For the bichromophoric compound **1** (NCouOCou), the signal from **3** (NCou) part at 460 nm is the only one visible. This is in favour that a transfer occurs from **2** (HOCou) to **3** (NCou) inside the molecule. For compound **3** (NCou), a direct irradiation at this wavelength leads to a very low signal. By applying the relation given previously, the efficiency of the transfer was calculated equal to 98%. The main photophysical data are collected in Table 2.

3.3.2.3. Fluorescence lifetimes. In this case, where the two fluorophores donor/acceptor are linked by a short alkyl chain, the donor fluorescence is very weak as shown in Fig. 5 and consequently, the sensitivity of our apparatus is not sufficient to allow acquisition of the corresponding fluorescence decay. Decay of the assumed acceptor is clearly bi-exponential ($\exp(-t/0.37) + 0.06 \exp(-t/1.71)$), with t in ns, but with two positive pre-exponential factors and time constants independent of the excitation wavelength

Table 1
Efficiency of energy transfer Φ_T from **2** (HOCou) to **3** (NCou) as a function of **3** (NCou) concentration

Sr no.	Concentration of 3 (NCou) (10^{-6} M)	Φ_T
1	4.0	0.13
2	9.3	0.30
3	13.3	0.39
4	17.3	0.47
5	22.7	0.57
6	26.7	0.64
7	30.7	0.69
8	36.0	0.74
9	40.0	0.78

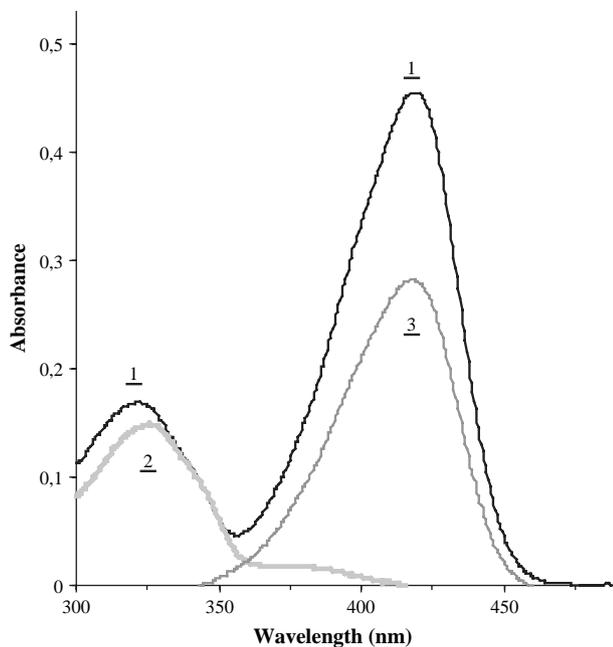


Fig. 4. UV/vis absorption spectra of 1–3 as equimolar solutions in EtOH (10^{-5} M) at RT.

(330 nm for transfer, 380–420 nm for direct excitation). Absence of a decay term with negative factor when exciting at 330 nm is simply due to the very small non-measurable value of the donor lifetime as mentioned above. Nevertheless, these observations are in accordance with a non-radiative transfer, even if in this particular case, experiments in pulsed excitation don't give more information than the one obtained in continuous excitation.

3.3.2.4. Quenching study by methyl red. As the objective is to use such compounds in order to label molecular beacon oligonucleotides used in PCR technology, we have studied the behavior of **1** (NCouOCou) in the presence of methyl red (MR), a structural isomer of dabcyl. This quencher has already been included in molecular beacons' structure [19], we also used it, because its absorption properties seem suitable for our quenching study, it is not fluorescent and commercially available at low price.

The quenching effect was experienced by the same way as described in preceding study. Here the "mother" solutions were one with a given concentration of **1** (NCouOCou) without MR and the second one with the same concentration of **1** (NCouOCou) and a maximal given concentration of MR, in excess compared to **1** (NCouOCou).

The emission spectra of **1** (NCouOCou) in the presence of increasing quantities of MR are reported in Fig. 6. It is interesting to mention that we observe a significant diminution of fluorescence emission of the compound as a consequence of an inhibiting effect from MR, the greatest MR concentration leading to 82% of quenching.

The fluorescence spectra exhibit a weak blue shift indicating that a part of the fluorescence decrease is due to radiative transfer. But, the shape of the spectra is not deeply modified which is in favour of

Table 2
Spectroscopic characteristics of compounds 1–3 in ethanol

Compound	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	λ_{fl} (nm)	Stokes shift (nm)	$\Phi_{\text{fl}}^{\text{a}}$ (%)
1 (NCouOCou)	321	18,700			
	418	46,000	461	140	0.24
2 (HOCou)	326	16,300	390	64	0.28
3 (NCou)	414	35,200	458	44	0.11

^a Values calculated referring to fluorescein ϕ_{f} ($\phi_{\text{f}} = 0.79$ at 25 °C, in ethanol) [14].

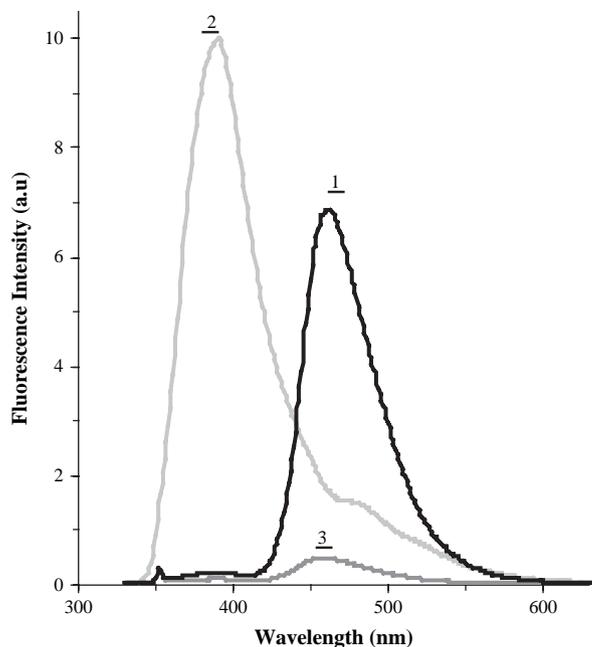


Fig. 5. Fluorescence spectra of 1–3 as equimolar solutions in EtOH at RT (2.5×10^{-6} M; $\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm).

a quenching (non-radiative) mechanism. Slope at origin of the Stern–Volmer plot (inset of Fig. 6) gives a value of the constant nearby 5400 L mol^{-1} , indicative of a moderate efficiency of this quenching reaction conducted in solution between free compounds.

4. Conclusion

We have shown that the covalent binding of two coumarin fluorophores with different photophysical properties and with

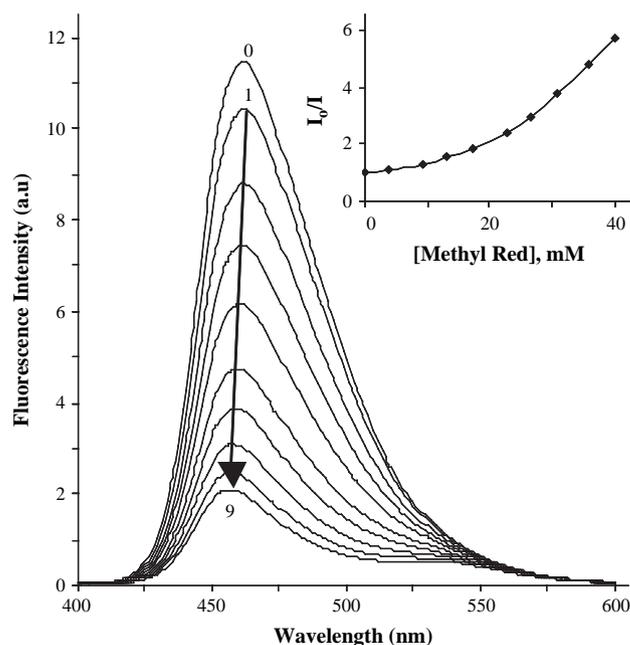


Fig. 6. Fluorescence spectra of **1** (NCouOCou) quenched by methyl red (MR) in EtOH at RT ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm); (0: **1** (NCouOCou) alone, 5×10^{-6} M; 1–9: **1** (NCouOCou), 5×10^{-6} M with MR from 4×10^{-6} M to 4×10^{-5} M); inset of the figure shows the Stern–Volmer plot of the variation of fluorescence intensity versus the MR concentration.

efficient overlap of emission and absorption spectra led to an interesting compound. The length of the linker binding covalently the two molecules is appropriate for a good energy transfer between them. This effect was evidenced by the different steady-state studies conducted on the three compounds and corroborated by time-resolved experiments. Whatever the nature of the transfer is, *i.e.* radiative or not, it remains an interesting feature for our objective. Furthermore, it appears that this kind of bichromophoric compound easily synthesized could find application where great wavelength shifts are researched. Work is in progress with the synthesis of bichromophoric compounds comprising in their structure suitable functions for their grafting on oligonucleotides.

Acknowledgments

The authors acknowledge INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) and Cancéropôle du Grand-Est for financial support.

References

- [1] Tyagi A, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 1996;14(3):303–6.
- [2] Marras SAE, Tyagi S, Kramer FR. Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Clin Chim Acta* 2006;363:48–60.
- [3] Santangelo P, Nitin N, Bao G. Nanostructured probes for RNA detection in living cells. *Ann Biomed Eng* 2006;34(1):39–50.
- [4] Tyagi A, Marras SAE, Kramer FR. Wavelength-shifting molecular beacons. *Nat Biotechnol* 2000;18:1191–6.
- [5] Muller C, Even P, Viriot ML, Carré MC. Protection and labelling of thymidine by a fluorescent photolabile group. *Helv Chim Acta* 2001;84(12):3735–41.
- [6] Even P, Chauvet F, Letourneur D, Viriot ML, Carré MC. Coumarin-like fluorescent molecular rotors for bioactive polymers probing. *Biorheology* 2003;40:261–3.
- [7] Valeur B, Poujet J, Bourson J, Kaschke M, Ernstring NP. Tuning of photoinduced energy transfer in a bichromophoric coumarin supermolecule by cation binding. *J Phys Chem* 1992;96:6545–9.
- [8] Kaschke M, Ernstring NP, Valeur B, Bourson J. Subpicosecond time-resolved intramolecular electronic energy transfer in flexible bichromophoric coumarin molecule. *J Chem Phys* 1990;94:5757–61.
- [9] Berthelot T, Talbot JC, Lañ G, Déleris G, Latxague L. *J Pept Sci* 2005;11:153–60.
- [10] Baros F, Bouchy M, Brooke F, Andre JC. Kinetics of partly diffusion-controlled reactions. Part 23 – The case of ionic reactions. *J Chem Soc Faraday Trans* 1990;86(12):2145–53.
- [11] O'Connor DV, Phillips D. Time-correlated single photon counting. London: Academic Press; 1984.
- [12] Eaton DF. Recommended methods for fluorescence decay analysis. *Pure Appl Chem* 1990;62(8):1631–48.
- [13] Song A, Wang X, Lam KS. A convenient synthesis of coumarin-3-carboxylic acids via Knoevenagel condensation of Meldrum's acid with *ortho*-hydroxyaryl aldehydes or ketones. *Tetrahedron Lett* 2003;44:1755–8.
- [14] Kellogg RE, Bennett RG. Radiationless intermolecular energy transfer. III. Determination of phosphorescence efficiencies. *J Chem Phys* 1964;41(10):3042–5.
- [15] Valeur B. Molecular fluorescence: principles and applications. Weinheim: Wiley-VCH; 2002.
- [16] Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 1999.
- [17] Jiao GS, Kim TG, Topp MR, Burgess K. A blue-to-red energy-transfer thymidine analogue that functions in DNA. *Org Lett* 2004;6(11):1701–4.
- [18] Skene WG, Dufresne S. Easy one-pot synthesis of energy transfer cassettes. *Org Lett* 2004;6(17):2949–52.
- [19] Wang C, Leffler S, Thompson DH, Hrycyna CA. A general fluorescence-based coupled assay for *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:351–6.

POSTER

DOCTORIALES DE LORRAINE 2006

CONCEPTION ET VALIDATION D'OUTILS MOLECULAIRES POUR LA CANCEROLOGIE CLINIQUE

Projet Cancéropole Grand Est

- Centre de Ressources Biologiques (CRB) du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy
- INSERM EMI0014, Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Moléculaire en Nutrition, Faculté de Médecine, Nancy
- UMR 7630, CNRS/INPL, DCPR, Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC), Nancy
- Institut Pasteur, Plate-forme de synthèse d'oligonucléotides longs à haut débit, Paris



Stéphane Poulain
Docteurant
2ème année

BUT DU PROJET : IL S'AGIT DE DEVELOPPER POUR LA CANCEROLOGIE CLINIQUE DES SONDAS MOLECULAIRES MODELES AFIN DE VALIDER DE NOUVEAUX FLUOROPHORES.

L'APPLICATION PRINCIPALE DU PROJET EST LA MESURE PAR RT-PCR EN TEMPS REEL MULTIPLEXE DU SIGNAL RETINOÏDE DANS DES CELLULES BRONCHIQUES NORMALES ET CANCEREUSES.

Les émetteurs fluorescents ont remplacé avantageusement la radioactivité et sont aujourd'hui utilisés dans tous les domaines des sciences du vivant.
Le marché des fluorophores est à 90% Nord Américain.

Elle est équipée d'un système « reporter » de fluorescence.

Les appareils qui utilisent la fluorescence (machines de PCR en temps réel, séquenceurs d'ADN, scanners, microscopes...) lisent de plus en plus dans les 5 mêmes gammes de longueurs d'onde de fluorescence.

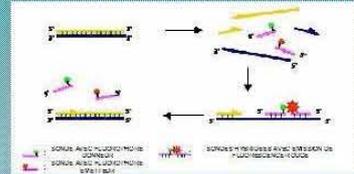
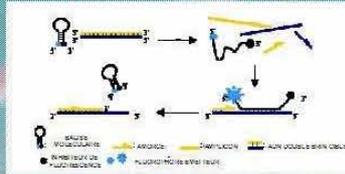
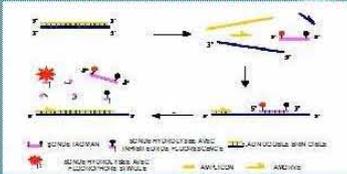
C'est un oligonucléotide composé de bases A, T, C et G dont la séquence est spécifique et complémentaire à celle d'un gène cible.

Qu'est ce qu'une sonde moléculaire fluorescente ?

Utilisée dans des tests moléculaires, la sonde permet de :
• mesurer et quantifier l'expression génique,
• détecter des mutations de l'ADN, des polymorphismes génétiques, des traces d'OGM ou d'agents pathogènes viraux, bactériens et parasitaires.

La sonde émet un signal fluorescent quand elle se trouve parfaitement liée à sa séquence cible, ce signal est mesuré par des machines dédiées comme par exemple les appareils de PCR en temps réel qui peuvent détecter jusqu'à 5 longueurs d'onde de fluorescence (5 couleurs) simultanément.

Différents types de sondes sont disponibles dont les plus utilisées en PCR en temps réel sont les sondes Taqman, les Balises Moléculaires et les sondes FRET.



APPLICATION : RETINOÏDES ET CANCERS BRONCHIQUES

Les cancers bronchiques

- Un des principaux problèmes de santé publique.
- 25 000 nouveaux cas / an en France.
- Première cause de mortalité par cancer dans les pays développés.
- Etude réalisée en 2000 : âge moyen des malades en France = 64 ans.
- Augmentation de 30% de l'incidence en 7 ans chez la femme.
- Survie à 5 ans < 15% car diagnostic trop tardif.
- Insuffisances des traitements et du dépistage.

Rôle des rétinoïdes dans le développement des cancers bronchiques

- Des études épidémiologiques ont démontré l'effet bénéfique des fruits et légumes riches en caroténoïdes (provitamine A) dans la prévention des cancers bronchiques.
- Les lésions précancéreuses observées dans la muqueuse bronchique des fumeurs ressemblent à celles induites par une carence en vitamine A chez l'animal modèle.
- Des diminutions d'expression de certains récepteurs aux rétinoïdes ont été mises en évidence dans ces lésions.
- La détection de ces diminutions d'expression chez des sujets à risques pourrait servir d'outil diagnostique pour le dépistage précoce des cancers bronchiques.



Rétinoïdes = Vitamine A (Rétinol) et dérivés (Caroténoïdes)

Le Signal Rétinoïde

Métabolisme des rétinoïdes

Les ligands

Transport au noyau

Liaison aux RARs/RXRs

Les récepteurs aux rétinoïdes (RRs)

Effets biologiques des rétinoïdes

Les gènes cibles

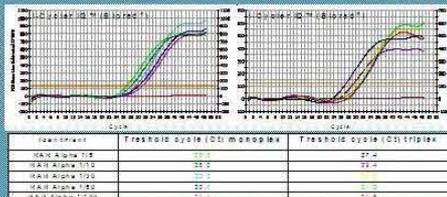
Prolifération cellulaire ↑, Différenciation cellulaire ↑, Apoptose ↓, Angiogenèse ↓

Anomalie du signal rétinoïde → Cancer

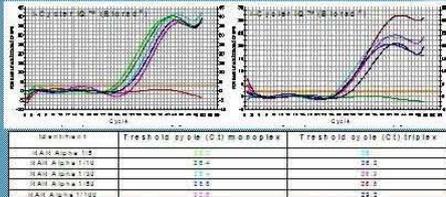
RESULTATS : MESURE PAR RTPCR EN TEMPS REEL TRIPLEX DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS AUX RETINOIDES

- 3 sondes Taqman et 3 Balises Moléculaires spécifiques des gènes codant pour les récepteurs aux rétinoïdes : RAR α , RAR β et RXR β ont été définies par une étude bioinformatique. Ces sondes sont marquées par différents fluorophores.
- Les 3 gènes sont amplifiés simultanément et leur expression est quantifiée en ligne au cours de chaque cycle d'amplification d'une même réaction de PCR en temps réel (économie de temps et d'échantillons)
- Afin de valider la technique, divers échantillons biologiques ont été testés sur plusieurs appareils et en utilisant différents kits de PCR.

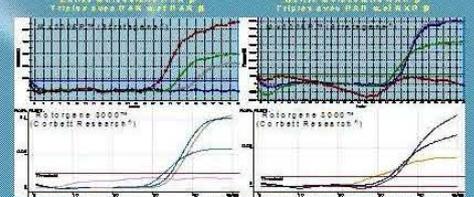
Sonde Taqman RAR Alpha (HEX) dans CML Monoplex



Balise Moléculaire RAR Alpha (Texas Red) Monoplex



Résultats de l'étude de l'ARN extrait d'un crachat obtenu chez un sujet à risque



L'utilisation de ces sondes dans des analyses multiplexes de l'expression génique est encore peu répandue. Ceci pour les raisons suivantes :

- design bioinformatique difficile,
- nécessité de posséder l'échantillon biologique contenant l'anomalie à détecter,
- coût prohibitif (du pour 30% au coût du fluorophore).

PERSPECTIVES : DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX FLUOROPHORES

- De nouveaux fluorophores sont en cours de développement au Département de Chimie Physique des Réactions (DCPR) de l'ENSIC de Nancy.
- Les caractéristiques spectrales de ces fluorophores sont dans un premier temps étudiées en solution.
- Des dérivés des fluorophores d'intérêt seront préparés afin d'être greffés à l'Institut Pasteur sur les séquences oligonucléotidiques déjà validées dans le modèle multiplexe présenté ci-dessus.
- Ces nouveaux fluorophores seront alors testés dans des réactions de PCR en temps réel et leurs efficacités seront comparées à celle des fluorophores commerciaux.

Résumé

Les Récepteurs aux Rétinoïdes sont impliqués dans le développement et dans l'homéostasie cellulaire. Des altérations de leurs expressions ont été observées dans les cancers bronchiques. Cependant, les essais de chimioprévention utilisant les rétinoïdes dans des populations à risques ont échoué. Par conséquent, avant de procéder à de nouveaux essais cliniques utilisant des rétinoïdes de seconde génération, il apparaît nécessaire de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la signalisation des rétinoïdes. Tel est ici notre objectif en présentant la validation d'outils de recherches destinés à l'étude de ces récepteurs, et en particulier à celle du Récepteur à l'Acide Rétinoïque β , dont le rôle majeur dans le cancer du poumon est documenté.

Des outils bioinformatiques ont été utilisés afin de reconstituer *in silico* l'organisation génomique de RAR β . Les caractéristiques d'un promoteur potentiel P1'-RAR β ont été étudiées expérimentalement. Des mesures spécifiques, réalisées dans des essais de qRT-PCR Syber Green et avec un triplex de sondes Taqman, ont été validées extensivement afin d'établir des valeurs de référence de l'expression ARNm des Récepteurs aux Rétinoïdes dans les cellules épithéliales bronchiques humaines normales. Les expressions relatives des différentes isoformes ARNm RRs ont ensuite été quantifiées dans des échantillons de tumeurs bronchiques ainsi que dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses. Enfin, un anticorps reconnaissant toutes les isoformes protéiques RAR β , a été conçu et validé extensivement par western-blot et immunoprécipitation.

Aucune activité promotrice n'a pu être démontrée pour P1'-RAR β . Une augmentation des quantités d'ARNm P2-RAR β signe la différenciation normale de l'épithélium bronchique, alors qu'une diminution significative de ces ARNm est observée dans la plupart des lignées de cellules cancéreuses bronchiques. Une sous-régulation concomitante de RAR β et RXR β a également été mise en évidence dans les tumeurs bronchiques. En utilisant des extraits nucléaires de cellules BEAS-2B et de cellules bronchiques normales, seule l'isoforme protéique longue RAR β 2 a été reconnue par notre anticorps.

Un traitement rigoureux des échantillons ainsi qu'une analyse bioinformatique exhaustive sont les points clés de cette étude. Des valeurs ARNm de référence ainsi que des outils validés sont maintenant disponibles pour faire progresser la recherche sur le signal rétinoïde dans les cellules bronchiques.

MOTS-CLÉS : Cancer, Chimioprévention, Métabolisme, Poumon, Récepteurs, Rétinoïdes, Vitamine A.

Summary

Retinoid Receptors are involved in development and cell homeostasis. Alterations of their expressions have been observed in lung cancer. However, retinoid chemoprevention trials in populations at risk to develop such tumours have failed. Therefore, the pertinence of new clinical trials using second generation retinoids requires prior better understanding of the molecular mechanisms involved in the retinoid signalling. This is our aim when validating extensively research tools, focused on the Retinoic Acid Receptor β , whose major role in lung cancer is documented.

Biocomputing was used to draw *in silico* an updated RAR β genomic organisation. Features of a putative P1'-RAR β promoter were investigated experimentally. Specific measures realised, with qRT-PCR Syber Green assays and a triplex of Taqman probes, were extensively validated to establish Retinoid Receptors mRNAs reference values for normal human bronchial epithelial cells. Relative expressions of the different RRs mRNA isoforms were further quantified in lung tumour samples and in several cancer cell lines. Finally, an antibody recognising all the RAR β protein isoforms, was generated and extensively validated by western-blot and immunoprecipitation.

No promoter-like activity was found for P1'-RAR β . P2-RAR β mRNA increase signs the normal differentiation of the human bronchial epithelium while a significant decrease is observed in most lung cancer cell lines. Accordingly, it is also, along with RXR β , down-regulated in lung tumours. When using nuclear extracts of BEAS-2B and normal lung cells, only the P2-long RAR β 2 protein isoform was recognised by our antibody.

Rigorous samples processing and extensive biocomputing, were the key factors for this study. mRNA reference values and validated tools are now available to advance researches on retinoid signalling in the lung.

KEY WORDS: Cancer, Chemoprevention, Lung, Metabolism, Receptors, Retinoids, Vitamin A.