

Université Louis Pasteur de Strasbourg
Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE

Présentée pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR

Discipline : aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : pharmacologie cellulaire et moléculaire

par

Sabrina DANILIN

*Les protéines de stabilisation des ARN messagers de
la protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne
(PTHrP) : identification et impact sur la croissance du
carcinome à cellules rénales*

Soutenue publiquement le 19 décembre 2008

devant les membres du jury

Docteur **Thierry MASSFELDER**

Professeur **Alain DOUCET**

Professeur **Jean-Jacques PATARD**

Professeur **Jean-Pierre BERGERAT**

CR INSERM, Strasbourg

DR CNRS, Paris

PUPH, Rennes

PUPH, Strasbourg

Directeur de thèse

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Abréviations

A :	Adénine
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AhR :	Aryl hydrocarbon Receptor
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
ARNT :	Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
AUF-1 :	A+U-rich-element RNA-binding factor 1
ATCC :	American Type Culture Collection
ATP :	Adénine TriPhosphate
BHD :	Birt-Hogg-Dube
bNLS :	bipatite Nuclear Localisation Signal
C :	Cytidine
CAIX :	Anhydrase Carboxylase IX
CCC :	Carcinome rénal à Cellules Conventionnelles
CCR :	Carcinome à Cellules Rénales
CMLV :	Cellules Musculaires Lisses Vasculaires
CRE :	cAMP Responsive Element
CTAD :	C-terminal Transactivation Domain
CTP :	Cytidine TriPhosphate
DEPC :	Diéthyl PyroCarbonate
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNase :	Désoxyribonucléase
dNTP :	Désoxy Nucléotides TriPhosphate
DO :	Densité Optique
DTT :	dithiothreitol
EDTA :	Acide éthylènediamine-tétracétique
EGF :	Epidermal Growth Factor
EMA :	European Medicine Evaluation Agency
EPO :	Erythropoïétine
E.S.M :	Ecart Standard à la Moyenne
FBS :	Fœtal Bovin Serum
FDA :	Food and Drug Administration
FH :	Furamate Hydratase
GAPDH :	Glyceraldéhyde Phosphate Deshydrogénase

G :	Guanine
GRE :	Glucocorticoïde Responsive Element
GTP :	Guanine TriPhosphate
HIF :	Hypoxia Induced Factor
hnRNP L :	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein L
HRE :	Hypoxia Responsive Element
IGF :	Insuline-like Growth Factor
IL-2 :	Interleukine-2
INF- α :	Interferon α
KDa :	Kilo Dalton
MDR :	Multi Drug Resistance
MEC :	Matrice Extra Cellulaire
MVD :	Densité MicroVasculaire
mTOR :	mammalian Target Of Rapamycin
NF- κ B :	Nuclear Factor κ B
NTAD :	N- terminal TransActivation Domain
pb :	paires de bases
PBS:	Phosphate-Buffered Saline
PCR :	Réaction de Polymérisation en Chaîne
PDGF :	Platelet-Derived Growth Factor
PHD :	HIF-specific Prolyl Hydroxylase Domain
PMSF:	Fluorure de PhénylMéthyl Sulfonyl
PTH :	Parathyroid Hormone
PTHrP :	Protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne
pTNM :	pathologic Tumor Node Metastase
rNTP :	riboNucléotides TriPhosphate
RCPG :	Récepteurs Couplés aux Protéines G
RPTH1 :	Récepteur PTH/PTHrP 1
RRM :	RNA Recognition Motif
RT :	Transcription Reverse
SABG :	Senescence-Associated β -galactosidase
SAHF :	Senescence-Associated Heterochromatic Foci
SDS :	Sodium DodecylSulfate
SRE :	Serum Responsive Element
SSC :	Standard Sodium Nitrate

TBS :	Tris-Buffered Saline
TGF:	Tumor Growth Factor
TSC :	Tuberous Sclerosis Complex
TTP :	Tristetraproline
U :	Uracyle
UTP :	Uracyle TriPhosphate
UTR :	Région non Traduite
UV :	Ultra Violets
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL :	Von Hippel-Lindau

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Thierry Massfelder, pour m'avoir accompagnée tout au long de mes travaux en tant que Directeur de thèse. Je le remercie également pour ses précieux conseils, sa disponibilité et sa bonne humeur.

Merci au Docteur Jean-Jacques Helwig pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour avoir toujours porté un grand intérêt à mes travaux.

Je tiens également à remercier les Professeurs Alain Doucet, Jean-Jacques Patard et Jean-Pierre Bergerat pour avoir accepté de faire partie des membres de mon jury de thèse.

Un merci particulier à tous les autres membres du laboratoire, présents et passés, que j'ai côtoyés avec joie et dont l'esprit d'entraide et la bonne humeur quotidienne m'ont permis de mener à terme ce projet dans les meilleures conditions.

Merci enfin à tous les membres de ma famille, ainsi qu'à mes amis pour m'avoir soutenue et encouragée dans les moments difficiles. Une mention particulière pour Carole, Marie-Charlotte et Nathalie qui ont toujours été là pour m'aider.

Sommaire

<i>Abréviations</i>	1
<i>Remerciements</i>	4
<i>Sommaire</i>	5
Chapitre 1 : Introduction bibliographique	9
1- Le carcinome à cellules rénales	10
1.1 Epidémiologie du cancer du rein	10
1.1.1 Epidémiologie descriptive	10
1.1.2 Classification	11
1.1.3 Facteurs de risques	11
1.2 Génétique et classification	13
1.2.1 La classification d'Heidelberg	13
1.2.2 Gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes	14
1.2.3 Altérations épigénétiques	16
1.3 Les marqueurs pronostiques	17
1.3.1 Cliniques	17
1.3.2 Histologiques	18
1.3.3 Biomoléculaires	19
1.4 Thérapies	20
1.4.1 CCR localisés : la chirurgie	20
1.4.2 CCR métastatiques	21
2- CCC et VHL : une étroite corrélation	25
2.1 La maladie de von Hippel-Lindau	25
2.2 Le VHL	26
2.2.1 Un gène suppresseur de tumeur	26
2.2.2 Structure du gène	27
2.2.3 pVHL	27
2.2.4 Le complexe de polyubiquitination	28
2.3 Le système VHL/HIF	29
2.3.1 Les facteurs HIF	29
2.3.2 Mécanisme moléculaire	31

2.3.3 Cibles du système	31
2.4 Autres rôles du VHL	32
2.4.1 Interactions avec la matrice extracellulaire et le cytosquelette	33
2.4.2 Autres fonctions	34
2.4.3 pVHL et sénescence	35
3- La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP)	36
3.1 Son gène	36
3.1.1 Structure	36
3.1.2 Produits	37
3.1.3 Régulation	37
3.2 La protéine	38
3.2.1 Une polyprotéine aux rôles divers	39
3.2.2 Une cytokine	41
3.3 PTHrP et cancers	43
3.3.1 PTHrP et survie cellulaire	44
3.3.2 PTHrP et invasion	45
3.3.3 Expression de la PTHrP dans les cancers	45
3.4 PTHrP et CCC	46
3.4.1 Un facteur de survie	46
3.4.2 Un facteur antiangiogénique	47
3.4.3 Une cible du VHL	47
4- La stabilité des ARN messagers	49
4.1 Un mécanisme majeur de régulation post-transcriptionnelle	49
4.2 Mécanisme de cette régulation	50
4.2.1 Les éléments en cis	50
4.2.2 Les facteurs agissant en trans	51
4.2.3 Interaction des éléments cis et trans	52
4.3 Gènes régulés par les ARE et mécanismes de régulation	53
4.4 Pertinence clinique : stabilité des ARNm et cancer.	54
5- Objectifs	56
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes	57
1 - Matériel	58

1.1 Lignées cellulaires	58
1.2 Tissus	58
2- Etude de l'expression des ARNm	59
2.1 Extraction des ARNm	59
2.2 Transcription reverse	59
2.3 Quantification des ARNm	60
2.3.1 Etude de l'expression relative des cibles : PCR semi quantitative en temps réels	60
2.3.2 Etude du profil d'expression des isoformes de la PTHrP : PCR quantitative en temps réels	60
3- Recherche des protéines de liaison à l'ARNm de la PTHrP	61
3.1 Génération des sondes ARN	61
3.2 Transcription in vitro	62
3.3 UV cross-linking ARN-protéines	63
3.4 Purification des complexes	63
3.5 SDS-PAGE et révélation	64
4- Etude de l'expression protéique	65
4.1 Extraction des protéines	65
4.1.1 Protéines totales	65
4.1.2 Protéines nucléaires-cytoplasmiques	65
4.2 Western blot	66
4.3 Elisa	67
5- Etude de l'inhibition de HuR sur la croissance cellulaire	67
5.1 In vitro	67
5.1.1 Transfection des cellules par siARN	67
5.1.2 La densité cellulaire	68
5.1.3 La prolifération cellulaire	68
5.1.4 La mort cellulaire induite	68
5.2 In vivo	69
5.2.1 Le modèle de souris nude xénotransgénée.	69
5.2.2 Mesure de la prolifération cellulaire	69
5.2.3 Mesure de la mort cellulaire induite	70
5.2.4 Mesure de la vascularisation	70

6- Statistiques	70
Chapitre 3 : Etude de l'expression et de la stabilisation des ARNm de la PTHrP	71
1- Publication	72
1- Résumé	98
2- Discussion	99
Chapitre 4 : Etude de l'implication de la protéine stabilisatrice des ARNm HuR sur la survie du CCC humain	102
1- Résumé	103
2- Introduction	104
3- Résultats	105
<i>Expression et localisation sub-cellulaire de HuR dans les lignées cellulaires et tissus de CCC humain.</i>	105
<i>Effet de l'inhibition de HuR sur la prolifération cellulaire</i>	106
<i>Effet de l'inhibition de HuR sur la mort cellulaire induite.</i>	106
<i>Effet de l'inhibition intratumorale de HuR dans le CCC humain in vivo</i>	107
<i>Effet de l'inhibition de HuR sur l'expression des cibles en aval in vitro et in vivo</i>	107
4- Discussion	108
Chapitre 5 : Conclusion générale et perspectives	120
Chapitre 6 : Références bibliographiques	124
Chapitre 7 : Annexes	142
Résumé en français	143
Résumé en anglais	144
Publications	145
Posters et communications	146

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

1- Le carcinome à cellules rénales

1.1 Epidémiologie du cancer du rein

Le carcinome à cellules rénales ou CCR, développé aux dépens du parenchyme rénal, est la tumeur du rein la plus fréquente, représentant 85% des tumeurs malignes de cet organe. Le cancer du rein, tous types de tumeurs confondus, se place en 3^{ème} position des cancers urogénitaux après ceux de la prostate et de la vessie et représente 3 % des tumeurs de l'adulte. Dans les pays industrialisés, il est la 6^{ème} cause de décès par cancer.

1.1.1 Epidémiologie descriptive

En 2002, il a été recensé dans le monde, 208 000 nouveaux cas de cancer du rein (Parkin et al., 2005), un cancer qui touche majoritairement les hommes avec un sex-ratio de 2 hommes atteints pour 1 femme (Woldrich et al., 2008). Les taux d'incidence standardisés sont d'environ 12,2 pour 100 000 chez l'homme et de 5,7 pour 100 000 chez la femme dans les pays industrialisés mais sont très variables. Cette variation s'observe tout d'abord en fonction des zones géographiques considérées. En effet, les taux d'incidence varient de plus de 10 fois en fonction des pays, les plus importants étant retrouvés en Amérique du Nord et en Europe et les plus faibles en Asie et en Afrique (Parkin et al., 2005). En Europe, l'incidence chez les hommes varie de 6,81 à 21,66 en Suède et en République Tchèque respectivement. Globalement, le taux moyen en Europe en 2005 était de 16,1 pour 100 000 chez l'homme et de 6,2 pour 100 000 chez la femme, ce qui correspond par exemple à 8000 nouveaux cas recensés en France cette même année (Levi et al., 2008). Les taux d'incidence varient également en fonction des ethnies considérées, exemple aux Etats-Unis, où l'incidence globale est la plus forte, et où l'on retrouve des taux allant de 8,9 à 20,4 pour 100 000 chez les hommes d'origine asiatique ou africaine respectivement sur la période allant de 2000 à 2004 (Jemal A, 2008). Il faut noter que cette incidence augmente de façon constante depuis 1975 à raison de 2 à 3% par an mais là encore, on observe des disparités géographiques importantes. En effet, selon l'étude de *Levi & Al* (2008) allant de 1982 à 2002, l'incidence du cancer du rein tendrait à diminuer ou à se stabiliser dans les pays d'Europe du Nord (à l'exception de l'Angleterre) dans les 10 dernières années considérées par cette étude, allant même jusqu'à une diminution substantielle de l'ordre de 18-19% de l'incidence en Suède, alors qu'elle augmente dans les pays de l'Europe de l'Est, jusqu'à + 27% en Slovaquie.

Quant aux taux de mortalité, après un pic au début des années 1990, ils tendent aujourd'hui à diminuer. Ils sont de 4,3 pour 100 000 chez l'homme et 1,7 pour 100 000 chez la femme (Levi et al., 2008).

1.1.2 Classification

On distingue les différents types de tumeurs rénales en fonction de leur origine histologique. Elles sont classifiées comme suit par la société française de pathologie :

Les tumeurs d'origine épithéliale :

- Bénignes : Adénome cortical, oncocytome, tumeurs de l'appareil juxtaglomérulaire, adénome métanéphrique.
- Malignes : Appelées carcinomes à cellules rénales (CCR), ces tumeurs sont les plus fréquentes, elles représentent 90% des tumeurs du rein. Ce sont ces tumeurs en particulier qui seront traitées dans cette thèse.
- D'origine endocrine : Appelées tumeurs carcinoïdes ou carcinomes, elles peuvent être bénignes ou malignes

Les tumeurs d'origine mésenchymateuse :

- Bénignes : Angiomyolipome, léiomyélome, lipome
-
- Malignes : Sarcomes

Les tumeurs blastémateuses :

- Malignes : Néphrome mésoblastique, néphroblastome de l'adulte et sarcome à cellules claires

Les métastases :

- Elles sont souvent multiples et parfois bilatérales. Le carcinome primitif est le plus souvent pulmonaire, mammaire ou digestif.

1.1.3 Facteurs de risques

Les diverses études menées sur ce sujet ont suggéré l'implication de nombreux facteurs que l'on peut classer en deux catégories à savoir les facteurs environnementaux et les facteurs liés au patient.

- **Les facteurs environnementaux :**

Le tabac : C'est le facteur de risque du cancer du rein, dont le lien de causalité est le mieux établi. On estime qu'il joue un rôle dans 20 à 30% des CCR chez l'homme et dans 10 à 20 % chez la femme (McLaughlin et al., 1995; McLaughlin et al., 2006). Le risque relatif pour un fumeur de développer un carcinome à cellules rénales par rapport à un non fumeur est de 1,54 pour l'homme et 1,22 pour la femme et augmente fortement de façon dose dépendante. Il atteint des taux respectifs de 2,03 et 1,58 chez les hommes et les femmes considérés comme de gros fumeurs, c'est-à-dire fumant plus de 20 cigarettes par jour. L'arrêt du tabac diminue ce risque, la baisse devenant significative après une période de sevrage de 10 ans et ce, surtout chez les hommes (Hunt et al., 2005).

Autres : Hormis le tabac, aucun facteur de risque environnemental n'a réellement pu être validé, les différentes études menées arrivant à des conclusions parfois contradictoires. Ainsi, différents composés chimiques semblent être impliqués dans l'augmentation du risque de cancer du rein, bien que cela n'ait pas été confirmé. C'est le cas par exemple du cadmium, du plomb, des hydrocarbures ou encore de l'amiante (Dhote et al., 2000). De la même manière, la sur-consommation de thé ou de café serait incriminée dans l'augmentation du risque de cancer du rein alors que la consommation de fruits et légumes serait plutôt associée à une diminution de ce risque, tout comme l'activité sportive ou la consommation d'alcool (Janout and Janoutova, 2004; Mellempgaard et al., 1994).

- **Facteurs de prédisposition liés au patient :**

Prédispositions génétiques : les formes héréditaires du cancer du rein sont assez rares. Elles représentent 1 à 2% des cas et peuvent être classées en 2 groupes (Sudarshan and Linehan, 2006). On distingue d'une part les cancers du rein associés à des syndromes tumoraux familiaux comme la maladie de Von Hippel Lindau (la plus fréquente), la sclérose tubéreuse de Bourneville ou encore le syndrome de Birt-Hogg-Dube, et d'autre part les cancers du rein familiaux qui ne s'intègrent dans aucun syndrome spécifique. C'est le cas du cancer du rein familial non lié au VHL ou des cancers du rein à tumeurs papillaires qui eux sont associés à une trisomie du chromosome 7 ou à des délétions des bras courts des chromosomes 11 et 21.

Autres prédispositions : parmi les autres facteurs liés au patient, le plus important est l'obésité. C'est un facteur de risque indépendant de cancer du rein, impliqué dans 30 % des cas et dont le risque relatif est corrélé à l'augmentation de l'indice de masse corporelle (1,07/U) (Bergstrom et al., 2001). L'hypertension artérielle est également reconnue comme un

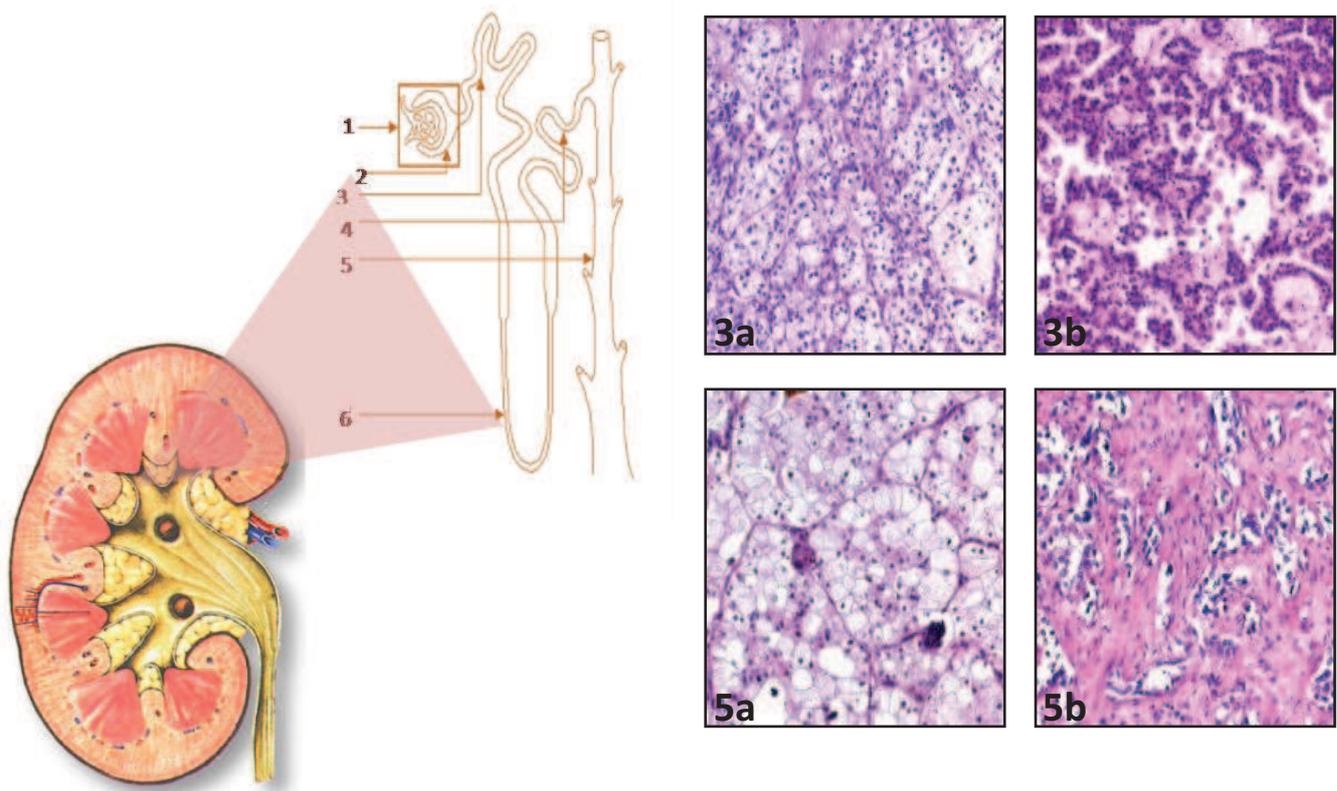


Figure 1 : Classification des CCR : cellules d'origine. Le néphron est formé du corpuscule comprenant le glomérule (1) et la capsule de Bowman (2) ainsi que du tubule rénal divisé en 4 parties : le tubule contourné proximal (3), la anse de Henle (6), le tubule contourné distal (4) et le tube collecteur (5). Les différents sous-types de CCR trouvent leur origine dans le tubule rénal, principalement au niveau du tubule contourné proximal(3a CCC et 3b CCR papillaire) et du canal collecteur (5a CCR chromophile, 5b Carcinome collecteur de Bellini). D'après Baldewijns et al, 2008.

Type de CCR	Fréquence	Age	Ratio homme/femme
Carcinome à cellules rénales conventionnel	70	61 ^a	
Carcinome à cellules rénales papillaire	10-15	61 ^a	1,8/1 à 3,8/1
Carcinome à cellules rénales chromophile	5	60 ^a	1/1
Carcinome à cellules rénales non classés	4-5		
Carcinome à cellules rénales multiloculaire à cellules claires	<5	51 ^a	3/1
Carcinome de type canal collecteur ou de Bellini	<1	55 ^a	2/1
Carcinome rénal mucineux tubuleux à cellules fusiformes	<1	53 ^a	1/4
Carcinome à translocation Xp11	<1	15 ^b	4/7

Tableau1 : les sous-types de CCR D'après Baldewijns et al, 2002

^a : Age moyen ^b : Age médian

facteur de risque de ce cancer (Weikert et al., 2008). Quant au diabète, il semble être associé à une augmentation du risque de cancer du rein mais il est important de moduler ce résultat en fonction des corrélations qui existent entre diabète et obésité (Zucchetto et al., 2007). Enfin, le risque de cancer du rein est 10 fois plus important chez les patients dialysés que dans la population générale, risque qui augmente avec l'ancienneté de la dialyse (Stewart et al., 2003). Les patients qui sont finalement transplantés ont un sur-risque de développer un cancer du rein au moins égal à celui des patients dialysés, voire supérieur (Vajdic et al., 2006).

1.2 Génétique et classification

1.2.1 La classification d'Heidelberg

Bien que les CCR trouvent tous leur origine dans les structures tubulaires matures, il s'agit en réalité d'un groupe de tumeurs qui présentent des caractéristiques différentes. En 1996, un consensus de classification, basé sur les caractéristiques génétiques et morphologiques ainsi que sur le potentiel évolutif de ces tumeurs a été proposé et adopté à Heidelberg en 1997, au « Heidelberg workshop » (Kovacs et al., 1997). Les CCR ont ainsi été subdivisés en 5 sous-types, à savoir les CCR de type conventionnel, papillaire, chromophile, canal collecteur ou encore non classés. Voici brièvement les principales caractéristiques de ces groupes (Figure 1 et Tableau 1).

- **Le carcinome à cellules rénales conventionnelles ou CCC**

Il s'agit du sous-type le plus fréquent, représentant 70 à 80% des CCR. Le regroupement de ces tumeurs est basé sur la fréquence d'une délétion spécifique du chromosome 3p, siège du gène VHL dont les mutations sont retrouvées exclusivement dans ce sous-type. D'autres altérations caractéristiques sont la duplication en position 5q22 et les délétions des bras des chromosomes 6q, 8p 9p et 14q. La plupart des CCC est composé majoritairement de cellules à cytoplasme clair entre lesquelles on retrouve des cellules à cytoplasme acidophile en proportion variable.

- **Le carcinome à cellules rénales papillaires ou chromophiles**

Ce groupe représente 10% des CCR. Les anomalies génétiques les plus fréquentes sont les trisomies des chromosomes 7 (dans 75% des cas) et 17 et une perte du chromosome Y. Les cellules qui le composent sont soit acidophiles soit basophiles. Dans le premier cas, on parlera de CCR papillaire de type 1 alors que dans le deuxième cas on parlera du type 2. L'agressivité des CCR papillaires est moindre que celle des CCC.

- **Le carcinome à cellules rénales chromophobe**

Il regroupe environ 5% des CCR et se développe à partir des cellules intercalaires B du tube collecteur. Les cellules ont un aspect caractéristique dû à la teinte particulière de leur cytoplasme. Génétiquement, il est caractérisé par une combinaison de perte d'hétérozygotie aux chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17 ou 21 et souvent d'une hypodiploïdie.

- **Le carcinome de type canal collecteur ou de Bellini**

C'est le sous-type de CCR le plus rare (moins de 1% des cas). Il se développe à partir du canal collecteur mais son diagnostic est difficile car ses aspects morphologiques sont très variables. Aucun profil génétique particulier n'a pu être établi.

- **Les carcinomes à cellules rénales non classés**

Ce type regroupe tous les CCR qui n'ont pu être classés dans un des types présentés ci-dessus même après analyses génétiques. C'est le cas pour 4 à 5% des CCR.

Plus récemment, 3 nouveaux sous-types ont été décrits et sont venus compléter cette classification :

- le CCR multiloculaire à cellules claires
- le carcinome rénal mucineux tubuleux à cellules fusiformes
- le carcinome rénal associé aux translocations Xp11.2/TFE (gène de fusion).

Dans tous ces types de CCR, on peut retrouver une différenciation sarcomatoïde (ressemblant à du sarcome). Cette différenciation indique un caractère plutôt agressif du carcinome concerné et le pronostic est alors défavorable (Delahunt et al., 2001).

1.2.2 Gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes

L'étude des formes familiales de CCR, a permis l'identification de gènes suppresseurs de tumeurs ou de proto-oncogènes impliqués dans le développement de ces tumeurs et dont la pertinence dans les cas sporadiques de CCR est plus ou moins bien établie.

- **Gènes suppresseurs de tumeurs**

VHL : Le gène VHL est le gène suppresseur de tumeur le plus souvent impliqué dans le CCR. Depuis 1993, date à laquelle ce gène fût isolé, près de 150 mutations germinales différentes ont été répertoriées. Elles sont très hétérogènes et distribuées tout au long de la séquence codante à l'exception des 50 premiers nucléotides où elles sont rares. Le VHL, dont la perte est à l'origine d'une forme familiale de cancer du rein, appelée la maladie de von Hippel Lindau, est également inactivé dans la majorité des cas sporadiques (Kim and Kaelin, 2004). Le principal rôle du VHL est de dégrader les facteurs HIF- α (pour hypoxia-induced factors) en conditions normoxiques. Sa perte conduit donc à la surexpression des cibles des facteurs HIF- α impliqués entre autres dans l'angiogénèse, la croissance cellulaire ou la formation de la matrice extracellulaire. Autant de voies impliquées dans la cancérogenèse (Sufan et al., 2004). Le VHL joue donc un rôle très important qui sera abordé plus largement dans la prochaine partie.

FH (Furamate hydratase) : Ce gène suppresseur de tumeur est localisé sur le chromosome 1q42.3-43. Il code pour la protéine furamate hydratase, une enzyme du cycle de Krebs, qui catalyse la conversion du furamate en malate (Baldewijns et al., 2008). Les études de Isaacs et al (Isaacs et al., 2005) et Pollard et al (Pollard et al., 2007) ont montré que la perte de cette enzyme conduit également à une activation de la voie HIF. Les patients porteurs de mutations germinales de ce gène développent des CCR papillaires de types 2 mais aucune relation n'a été démontrée entre les mutations somatiques de ce gène et les cas sporadiques de CCR.

BHD (Birt-Hogg-Dube) : Ce gène suppresseur de tumeur, localisé sur le bras court du chromosome 17, est responsable du syndrome héréditaire de Birt-Hogg-Dubé, dont 15 à 25% des patients affectés vont développer des CCR, le plus souvent de type chromophile (Linehan and Zbar, 2004). Les mutations germinales affectant ce gène sont concentrées dans l'exon 11 au niveau d'une chaîne de 8 cytosines. Ces mutations résultent presque toujours en une protéine tronquée, la folliculin, qui aurait un rôle suppresseur de tumeur. Le gène BHD n'est pas muté dans la plupart des cas de CCR sporadiques, cependant on a retrouvé des altérations du chromosome 17, porteur de ce gène (Nagy et al., 2004).

TSC1-TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex) : Les patients atteints de sclérose tubéreuse de Bourneville développent des CCR qui peuvent être de type conventionnel, papillaire ou chromophile. Ces patients portent en fait une mutation inactivatrice germinale sur l'un ou l'autre des gènes suppresseurs de tumeur TSC1 ou TSC2, gènes qui codent pour 2 protéines

orthologues qui s'associent afin de former un complexe inhibant mTOR, impliqué dans des voies de signalisation régulant la croissance cellulaire (Mak and Yeung, 2004). Une seule étude (Parry et al., 2001) s'est intéressée au rôle de l'inactivation de ce complexe TSC dans les cas de CCR sporadiques et n'a pas montré de rôle particulier. Cependant, les études menées chez le rat Eker (knock-out pour TSC2) qui exprime un VHL sauvage montrent que la perte de TSC2 augmente l'expression du VEGF via HIF-2 α , suggérant que la perte de ce gène a des conséquences similaires à la perte du gène VHL (Liu et al., 2003).

- **Proto-oncogènes**

MET : Le gène MET a été identifié dans le cadre d'études sur les formes familiales de CCR papillaires. Les patients présentant des mutations germinales pour ce gène développent plus particulièrement des CCR papillaires de type I. Les mutations germinales de ce gène situé sur le bras long du chromosome 7, sont des mutations activatrices affectant le domaine tyrosine kinase de MET (Schmidt et al., 1997). La protéine issue de ce gène est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase qui lorsqu'elle est activée induit des cascades de signalisation impliquées dans la mitogénèse ou la migration. Si MET n'est muté que dans 5% des cas sporadiques de CCR papillaires, une trisomie de chromosome 7 porteur de ce gène est observée dans 75% des cas, résultant en une expression accrue de MET (Cohen and McGovern, 2005; Schmidt et al., 1997).

1.2.3 Altérations épigénétiques

Les altérations épigénétiques sont des modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes ne s'accompagnant pas de changements des séquences nucléotidiques. Ces modifications, qui peuvent intervenir au niveau de l'ADN, de l'ARN ou des protéines peuvent se produire spontanément ou en réponse à l'environnement. La plus courante et la plus étudiée d'entre elles se produit au niveau de l'ADN, c'est l'hyperméthylation des promoteurs qui inactive la transcription des gènes concernés. Etant donné que les mutations de gènes suppresseurs de tumeurs sont généralement plus fréquentes dans les formes héréditaires que dans les cas sporadiques, l'hyperméthylation des promoteurs est susceptible d'être impliquée dans les formes sporadiques et/ou familiales de CCR.

Plusieurs études ont montré que le gène VHL est hyperméthylé et donc inactivé dans 16 à 20% des cas sporadiques de CCC (Banks et al., 2006; Dulaimi et al., 2004). Cette hyperméthylation du VHL a également été observée dans les CCR papillaires. Les études menées sur le gène BHD sont contradictoires. En effet, dans une étude de da Silva et al (da

Stade	Signification
T	<i>Tumeur primitive</i>
pTx	La tumeur primitive ne peut être évaluée
pT0	Absence de tumeur primitive identifiable
pT1	Tumeur inférieure ou égale à 7 cm de grand axe, limitée au rein
pT1a	Tumeur limitée au rein, ≤ 4 cm dans sa plus grande dimension
pT1b	Tumeur limitée au rein > 4 cm mais ≤ 7 cm dans sa plus grande dimension
pT2	Tumeur supérieure à 7 cm de grand axe, limitée au rein
pT3	Tumeur étendue à la veine rénale, à la surrénale ou à la graisse périrénale mais sans dépassement du fascia de Gerota
pT3a	Tumeur étendue à la surrénale ou à la graisse périrénale mais sans dépassement du fascia de Gerota
pT3b	Tumeur étendue macroscopiquement à la veine rénale ou à la veine cave sous-diaphragmatique
pT3c	Tumeur étendue macroscopiquement à la veine cave sus-diaphragmatique
pT4	Tumeur envahissant le fascia de Gerota
N	<i>Ganglions régionaux (hilaires, para-aortiques abdominaux et paracaves</i>
Nx	Envahissement ganglionnaire non évalué
N0	Absence de métastase ganglionnaire régionale
N1	Métastase ganglionnaire régionale unique
N2	Plus d'une métastase ganglionnaire régionale
M	<i>Métastases à distance</i>
Mx	Métastases non évaluées
M0	Absence de métastase à distance
M1	Métastases à distance

Tableau 2 : Classification pathological tumor-node-metastase (pTNM) des carcinomes à cellules rénales (International Union Against Cancer).

Silva et al., 2003) portant sur une vingtaine de CCR, aucune hyperméthylation du promoteur n'a été observée. Au contraire, Khoo et al (Khoo et al., 2003) ont observé cette hyperméthylation dans 11%, 36% et 33% des CCR chromophobes, papillaires, et conventionnels respectivement. Quant au gène FH, une seule étude s'y est intéressée et aucune hyperméthylation du gène n'a été observée (Dulaimi et al., 2004).

Enfin, différentes études s'intéressant à d'autres gènes suppresseurs de tumeurs connus pour jouer un rôle dans les cancers ont observé, dans les CCR, une hyperméthylation des promoteurs de près de 50 gènes impliqués dans divers processus cellulaires tels que l'adhésion, l'angiogénèse, l'apoptose, le cycle cellulaire ou la prolifération (Baldewijns et al., 2008). Les exemples les plus parlants sont ceux d'APAF1 (impliqué dans l'apoptose), JUP (impliqué dans l'adhésion cellulaire) ou TIMP3 (impliqué dans l'invasion cellulaire), hyperméthylés respectivement dans 97%, 87% et 78% des CCR étudiés.

1.3 Les marqueurs pronostiques

1.3.1 Cliniques

- **La classification pTNM :** Ce système de stadification de l'*International Union Against Cancer* est à l'heure actuelle le plus couramment utilisé et est considéré comme l'un des plus fiables et précis des facteurs de pronostic de survie des patients atteints de CCR. Appelé p (pour pathologique) *tumor node metastasis* (TNM), il est établi à partir de l'examen anatomopathologique et permet de classer les tumeurs en stades allant de pT1a à pT4, où le T correspond à la tumeur primaire (taille et envahissement), N au nombre de ganglions régionaux et M à l'existence ou non de métastases à distance (Tableau 2). Ce système, qui en est à sa sixième édition, a été révisé pour la dernière fois en 2002, date à laquelle le stade pT1 a été subdivisé en pT1a et pT1b afin d'augmenter la pertinence pronostique de ce système (Sagalowsky, 2002). La survie à 5 ans varie de 97% pour les stades pT1a à 20% pour les pT4.

- **L'ECOG performance status :** c'est un facteur pronostique important qui a l'avantage d'être simple et facilement utilisable. Il comporte 5 grades (de 0 à 4) et est basé sur l'activité physique dont le patient est capable (Tableau 3).

Capable d'une activité identique à celle précédant la maladie sans aucune restriction.	0
Activité physique diminuée mais ambulatoire et capable de mener un travail.	1
Ambulatoire et capable de prendre soin de soi-même, Incapable de travailler. Alité moins de 50 % de son temps.	2
Capable seulement de quelques soins. Alité ou en chaise plus de 50 % du temps.	3
Incapable de prendre soin de soi-même. Alité ou en chaise en permanence	4

Tableau 3 : L'ECOG performance status (PS)

1.3.2 Histologiques

- **Le grade de Fuhrman :** Créé en 1982 par Fuhrman et al, il est le système de graduation histologique le plus largement utilisé dans le monde (Fuhrman et al., 1982). Il se rapporte exclusivement aux caractéristiques nucléaires des cellules des tumeurs primaires des CCR. Le grade (1 à 4) est déterminé d'après la taille des noyaux, la régularité de leurs contours, l'existence et la taille du nucléole ou encore l'existence de noyaux bizarres. Le grade qui sera retenu est le grade le plus élevé qui est détecté, même si celui-ci n'est présent que localement. Le grade de Fuhrman est reconnu par l'*International Union Against Cancer* comme étant le meilleur facteur prédictif dans le cancer du rein. Cependant, ce système souffre de points faibles et son remaniement est sujet à discussion. En effet, s'il est admis que le grade attribué est le plus haut grade observé dans l'échantillon, même si celui-ci n'est présent que localement, il n'y a pas de consensus quant à la taille minimum significative. De plus, des études de Ficarra et al (Ficarra et al., 2005) et de Al Aynati et al (Al-Aynati et al., 2003) ont montré une reproductibilité des résultats inter- et même intra-observateurs assez modérée. De l'avis de nombreux auteurs, ce système devrait être simplifié pour ne comprendre plus que 3 stades mais à l'heure actuelle, aucun consensus quant aux stades qui devraient être regroupés n'a été trouvé, et ce, malgré l'étude de Rioux Leclercq et al (Rioux-Leclercq et al., 2007) attribuant une valeur prédictive à 84% au modèle regroupant les stades I et II. Pour le moment, le grade de Fuhrman reste donc utilisé tel qu'il a été décrit au départ.

- **Le type cellulaire :** Bien que les résultats des différentes études soient parfois contradictoires, il apparaît que l'agressivité des CCR est décroissante selon qu'ils sont du type canal collecteur, à cellules conventionnelles, papillaires ou chromophobes (Ficarra et al., 2006). Les patients atteints d'un CCC ont donc logiquement un taux de survie cancer-spécifique plus faible que ceux atteints d'un CCR papillaire ou chromophobe. Néanmoins, il

est important de tenir compte du caractère péjoratif d'une éventuelle composante sarcomatoïde associée. La présence de nécrose en histologie est également associée à un pronostic défavorable dans le cas d'un CCR conventionnel, ce qui n'est pas le cas dans les types papillaires et chromophobes (Minardi et al., 2008). Notons qu'une étude menée à l'Université de Los Angeles sur 310 patients a montré une valeur pronostique de la nécrose dans les cas de CCR localisés mais pas dans le cas de CCR métastatiques (Lam et al., 2005).

- **L'angioinvasion** : Les CCR étant des tumeurs très vascularisées, la valeur pronostique de la densité vasculaire des tumeurs a été évaluée dans plusieurs études mais les résultats obtenus ne permettent pas de la considérer comme un facteur pronostique. En effet, si 2 études ont observé une corrélation positive entre la densité vasculaire moyenne (MVD) et la survie des patients, 3 autres études n'ont trouvé aucune influence de la MVD sur la survie des patients.

1.3.3 Biomoléculaires

Les biomarqueurs sont des outils très importants qui ont plusieurs rôles. Ils permettent d'identifier les patients risquant de développer la maladie, de diagnostiquer ceux qui ne présentent que des signes précoces mais également et surtout de prédire l'évolution des cancers et la réponse aux différentes thérapies, de manière à définir la meilleure stratégie thérapeutique à adopter. Un enjeu majeur est l'identification de marqueurs permettant de prévoir le potentiel métastatique du cancer à un stade d'évolution précoce. A l'heure actuelle, aucun marqueur moléculaire réellement prédictif n'a été validé dans le CCR, faute de ne pas correspondre aux critères du *college of american pathologist* ou de n'avoir pas encore été assez étudié. Cependant, diverses études ont montré un rôle pronostique pour de nombreuses molécules intervenant dans divers processus cellulaires (Tunuguntla and Jorda, 2008).

- Des molécules d'adhésion cellulaire : Cadherine 6, E-Cadhérine ...
- Des molécules stimulant la réponse immunitaire : IL-6, IL-8, B7-H1...
- Des récepteurs de facteurs de croissance : VEGFR-3, TGF β R-II
- Des molécules induites par hypoxie : CAIX, HIF-1 α , VEGF....
- Des protéines régulant le cycle cellulaire : p53, bcl-2, PTEN, AKT, Ki67...

Le plus étudié et le plus prometteur de ces marqueurs pronostiques est l'anhydrase carboxylase IX (CAIX). Cette molécule, qui est une cible des facteurs HIF, intervient dans la régulation du pH dans les compartiments intra- et extracellulaires et voit son expression,

normalement limitée dans le rein sain, augmentée dans 95% des CCC et 50% des CCR papillaires (Bui et al., 2003). Son rôle pronostic a été clairement établi dans le CCC, où plusieurs auteurs ont démontré sa valeur pronostique en termes de survie. Dans une étude incluant 321 patients, *Bui et al* (2003) ont montré qu'une faible expression de CAIX (marquage dans moins de 85% des cellules tumorales) était un facteur pronostique indépendant de mauvais pronostic, les patients dans ce cas ayant 3,1 fois plus de risque de décéder du cancer que les patients ayant une plus forte expression. Une autre étude de Atkins et al (Atkins et al., 2005) a montré qu'une forte expression de CAIX (>85%) augmentait de 3,3 fois la probabilité de réponse à l'immunothérapie.

1.4 Thérapies

La survie à 5 ans après le diagnostic est légèrement plus faible chez les hommes (52%) que chez les femmes (56%) mais s'accroît de façon régulière depuis le début des années 1990. En effet, les taux de mortalité en Europe ont baissé d'environ 15% entre 1992 et 2002 (Levi et al., 2008). En France, on constate environ 3600 décès par an. L'âge médian au diagnostic est de 67 ans chez les hommes et de 70 ans chez les femmes (Belot et al., 2008). Du fait de l'augmentation des découvertes fortuites grâce aux échographies et tomodensitométries (TDM) réalisées pour d'autres motifs (Cooperberg et al., 2008), le stade d'évolution du CCR au moment du diagnostic a beaucoup diminué, ce qui est encourageant au regard des variations des taux de survie des patients en fonction du stade du CCR : ils sont de 90% à 5 ans pour les tumeurs localisées de petite taille (< 4 cm) mais chutent à seulement 5% en cas d'atteinte métastatique. Ces différences sont en partie dues aux options thérapeutiques disponibles dans ces 2 cas de figure.

1.4.1 CCR localisés : la chirurgie

Pour les patients atteints de CCR localisés, la chirurgie est le seul traitement curatif disponible (Lee and Patel, 2002).

La chirurgie consiste dans la plupart des cas en une néphrectomie totale de façon à s'assurer que toutes les zones potentiellement cancéreuses soient retirées. La néphrectomie partielle, bien que de plus en plus adoptée, reste limitée aux patients qui présentent des tumeurs locales de moins de 4 cm ou chez les patients au statut particulier, c'est-à-dire ayant un seul rein, présentant des tumeurs bilatérales ou en insuffisance rénale. Après néphrectomie totale ou partielle, les patients atteints de CCR localisés ont un taux de survie à 10 ans de plus de 70%,

les récurrences locales de CCR n'étant observées que dans 2 % des cas après néphrectomie totale et 3% des cas après néphrectomie partielle (Hafez et al., 1999; Itano et al., 2000).

Aucune thérapie adjuvante n'est pour l'instant disponible, ni l'interleukine-2 (IL-2) ni l'interféron- α (INF- α) n'ayant démontré un quelconque bénéfice et aucun autre traitement n'ayant été approuvé (Drucker, 2005).

1.4.2 CCR métastatiques

Dans les cas de CCR métastatiques, le traitement des patients pose plus de difficultés. En effet, les CCR sont des tumeurs réfractaires aux traitements classiques, en grande partie car ils développent rapidement des résistances.

Thérapies classiques

Chimio-hormono-et radiothérapies

La chimiothérapie, pourtant utilisée dans le traitement de nombreuses tumeurs solides n'a quasiment aucun effet sur les CCR. Une revue de 83 essais cliniques sur plusieurs agents chimiothérapeutiques incluant plus de 4000 patients a montré un taux de réponse au traitement très faible : 4,7% de réponse partielle et 1,3% de réponse totale. Les raisons de cette résistance à la chimiothérapie ne sont pas clairement établies. Elle pourrait être due à l'expression du transporteur *multi drug resistance* (MDR) dans les cellules des tubules proximaux à partir desquelles les CCR se développent, ou au fait que les CCR progressent lentement or ces agents ciblent les cellules qui se divisent rapidement. De la même manière, l'hormonothérapie n'est pas non plus un traitement efficace puisqu'elle ne permet qu'une réponse partielle dans moins de 5% des cas. Enfin, la radiothérapie n'est utilisée que comme traitement palliatif à la douleur ou pour le traitement des métastases osseuses et cérébrales .

Immunothérapie

Deux cytokines en particulier sont utilisées, il s'agit de l'interféron- α (INF- α) et de l'interleukine-2 (IL-2). L'INF- α a été la première à être étudiée et approuvée pour le traitement des CCR. Elle présente un taux de réponse moyen de 15% mais la durée de cette réponse n'excède que très rarement les 2 ans, elle est en moyenne de 12 mois (Minasian et al., 1993). L'IL-2 présente des taux de réponses équivalents à ceux de l'INF- α mais a l'avantage d'induire une réponse plus durable, de 19 mois en moyenne (Fisher et al., 2000). Les études

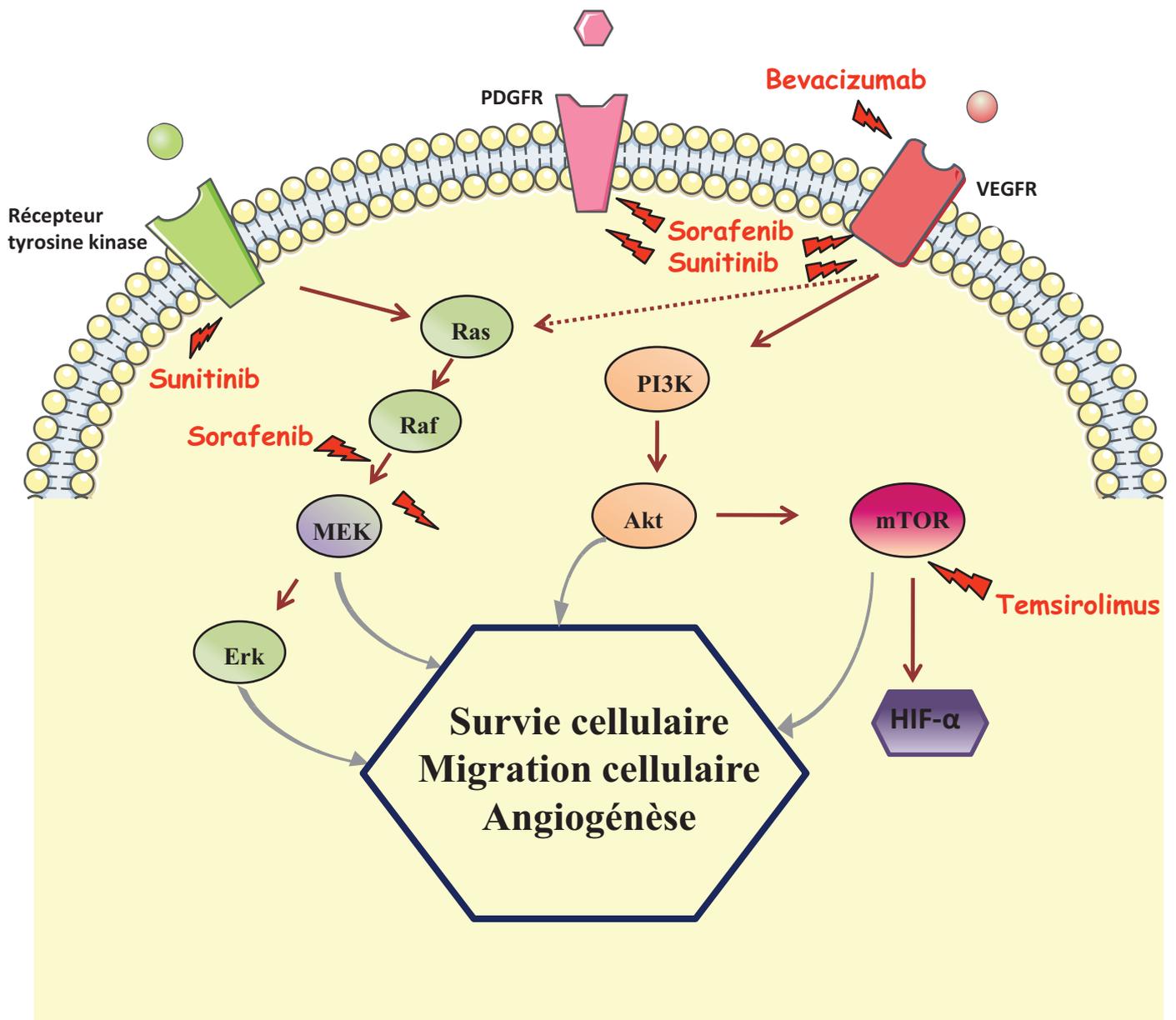


Figure 2 : Mécanismes d'action des thérapies ciblées. Le bevacizumab inhibe l'interaction du VEGF avec son récepteur. Le sorafenib et le sunitinib inhibent les récepteurs du VEGF et du PDGF, le sunitinib inhibe également d'autres récepteurs à domaine tyrosine kinase et le sorafenib inhibe Raf. Le temsirolimus est un inhibiteur de mTOR et inhibe donc l'expression des facteurs HIF- α . D'après Clarke et Cookson (2008)

cliniques menées afin de déterminer un éventuel avantage d'une combinaison entre ces cytokines n'ont pas été concluantes. En effet, si une étude de phase 3 a montré une augmentation significative du taux de réponse, aucun bénéfice sur la survie des patients n'a été observé (Negrier et al., 1998).

L'immunothérapie par cytokines a longtemps été la seule thérapie utilisée dans le traitement des CCR métastatiques, son efficacité étant supérieure à celle des thérapies citées précédemment. Cependant, les taux de réponses restent faibles et l'utilisation de cytokines, induisant une réponse immunitaire non spécifique, engendre d'importants effets secondaires.

Thérapies ciblées

Les études sur la biologie des CCR ont permis une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans leur cancérogenèse et notamment du rôle de l'angiogénèse dans les CCC. En effet, nous avons vu que la majorité des CCC sont déficients en VHL, ce qui entraîne une accumulation de facteurs HIF et par conséquent de ses cibles comme le VEGF, le PDGF ou le TNF- α . Ces protéines ont ainsi été identifiées comme des cibles thérapeutiques potentielles et en décembre 2005 et juillet 2006, 2 molécules inhibitrices des tyrosines kinases ont été approuvées respectivement par la *food and drug administration* (FDA) et l'*european medicine evaluation agency* (EMA), pour le traitement en première ligne du CCR métastatique : le sunitinib (Pfizer) et le sorafenib (Bayer). Depuis d'autres molécules ciblant la voie de l'angiogénèse ont fait leur apparition (Figure 2).

Les inhibiteurs de tyrosines kinases

Sunitinib

Le sunitinib (SU 11248) est un inhibiteur multicible de tyrosine kinase anti-VEGFR 1, 2 et 3, PDGFR β et α , C kit, CSF-1R et Flt 3, administré par voie orale à raison de 50 mg/jour, 4 semaines sur 6. Deux essais cliniques de phase II avant son approbation par la FDA ont montré un taux de réponse de 42% et un bénéfice sur la survie de 8,2 mois (Motzer et al., 2006a; Motzer et al., 2006b). L'essai clinique de phase III du sunitinib comparé à l'INF- α chez des patients atteints de CCR métastatiques encore non traités, a démontré un meilleur taux de réponse du sunitinib (31% vs 6%) avec une survie moyenne sans progression de 11 mois pour le Sunitinib contre 5 mois pour l'INF- α (Motzer et al., 2007). Aucune donnée sur la survie globale des patients n'est disponible actuellement, puisque le recul clinique n'est pas encore assez important pour permettre de l'évaluer.

Le sunitinib est donc une molécule prometteuse qui entraîne cependant des effets secondaires assez importants comme l'asthénie (22-38%), les nausées, les diarrhées (16-24%), une neutropénie (39-45%) ou une anémie (25-37%). La tolérance reste néanmoins acceptable.

Sorafenib

Le sorafenib (BAY 43-9006) est un autre inhibiteur des récepteurs VEGFR-1, 2 et 3 et PDGFR qui inhibe également la kinase Raf. Un essai clinique de phase II sur 202 patients porteurs d'un CCR métastatique, a montré une survie sans progression à 24 semaines de 50% pour le groupe traité au sorafenib contre 18% pour le groupe placebo (Escudier et al., 2007a; Ratain et al., 2006). L'étude de phase III portant sur 905 patients en deuxième ligne a montré une durée de survie sans progression de 5,5 mois avec le sorafenib contre 2,8 mois pour le placebo et un taux de réponse objective de 2% (Escudier et al., 2007a). Les principales toxicités observées sont une fréquence importante de rash cutané (31%), de nausées (14%), de diarrhées (30%), de syndromes main-pied (26%) et une HTA (8%).

Une réduction de dose ou une interruption temporaire du traitement a du être prescrite chez 25% des patients.

L'anticorps anti-VEGF :

Bevacizumab

Le bevacizumab est un anticorps humanisé (93% humain et 7% murin) anti-VEGF qui neutralise les isoformes biologiquement actives du VEGF-A sans affecter le récepteur. Une étude randomisée de phase II a évalué son efficacité contre placebo chez 116 patients ayant un cancer du rein métastatique résistant à l'immunothérapie. Cette étude évaluait 2 doses (faible et forte respectivement de 3 mg et 10 mg/kg) contre placebo. La survie sans progression à 4 mois était de 64, 39 et 20% et à 8 mois de 30, 14 et 5% pour les patients traités par forte, faible dose et placebo, respectivement. La différence statistique en termes de survie globale n'était pas significative (Yang et al., 2003).

Le bevacizumab haute dose montre donc une efficacité plus grande mais les effets secondaires (HTA, hématurie, épistaxis, protéinurie asymptomatique) étaient eux aussi plus marqués.

Un autre essai en phase III (AVOREN) sur 641 patients porteurs d'un CCR métastatique sans traitement préalable a comparé l'effet du bevacizumab 10mg/kg administré seul ou en association avec l'IFN- α (9 MUI 3 fois par semaine). La survie sans progression apparaît augmentée avec l'association des 2 molécules par rapport au bevacizumab seul (10,2 versus

5,4 mois) avec un taux de réponse objective de 30,6% contre 12,4%. La survie globale est, elle aussi, améliorée. Il ne semble pas y avoir de toxicité accrue avec l'association de ces 2 molécules (Escudier et al., 2007b; Rini et al., 2004).

Les inhibiteurs de mTOR :

Temsirolimus

Il s'agit d'une molécule inhibitrice de mTOR (mammalian Target of Rapamycin), une protéine impliquée dans de nombreuses voies intracellulaires pro-tumorales dont la régulation des facteurs de transcription HIF impliqués dans l'expression du VEGF. L'efficacité du temsirolimus a été démontrée par une étude de phase III chez des patients porteurs de CCR avancé non traités préalablement (Hudes et al., 2007). L'étude incluait 626 patients répartis en 3 groupes : IFN α seul, temsirolimus seul (25 mg IV) et IFN α et temsirolimus (15 mg IV) en combinaison. La survie moyenne globale était de 10,9 mois pour le groupe temsirolimus seul et 7,3 mois pour le groupe IFN α seul. L'association IFN α et temsirolimus n'a pas permis d'obtenir de meilleurs résultats.

Les effets toxiques les plus fréquents observés chez les patients traités par temsirolimus étaient le rash cutané, la stomatite, les douleurs, l'infection, et l'œdème périphérique.

Ainsi, les études cliniques menées ces dernières années ont montré que les molécules ciblant la voie du VEGF apportent un bénéfice en terme de réponse objective, de diminution de la taille tumorale et de survie sans progression. C'est pourquoi elles sont aujourd'hui devenues les traitements de choix pour les CCR métastatiques. Toutefois, aucune donnée sur la survie globale n'est encore disponible. De plus, les effets secondaires à court terme de ces nouveaux agents thérapeutiques ne sont pas négligeables, ils demandent un contrôle suivi des patients. Quant aux effets à long terme, on ignore toujours s'il y en a et leur importance. Enfin, les études ont été menées sur des patients atteints de CCC, en accord avec la surexpression de la voie du VEGF dans ce sous-type. Leur efficacité dans les autres sous-types doit encore être confirmée.

2- CCC et VHL : une étroite corrélation

Le carcinome à cellules rénales de type conventionnel est le sous-type de CCR le plus fréquent, représentant environ 80% des CCR et 70 à 75% de l'ensemble des cancers du rein de l'adulte. Ces tumeurs, qui trouvent leur origine au niveau des tubules proximaux matures, sont responsables de 2% des décès liés au cancer. Comme énoncé dans la première partie, un gène en particulier joue un rôle crucial dans le développement du CCC, il s'agit du gène VHL. En effet, une forme familiale de CCC, la maladie de von Hippel-Lindau est due à la perte de fonction de ce gène, or une inactivation bi-allélique de ce même gène, due à des mutations ou à des modifications épigénétiques, est également retrouvée dans la majorité des cas de CCC sporadiques.

2.1 La maladie de von Hippel-Lindau

La maladie de von Hippel-Lindau est la forme familiale de CCR la plus fréquente. C'est un syndrome héréditaire récessif qui se transmet de façon autosomique dominante, et qui est causé par la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur VHL. Ce syndrome a été décrit pour la première fois il y a une centaine d'années, par Eugène Von Hippel, ophtalmologiste allemand, qui en 1904, décrivit une maladie familiale à l'origine d'un hémangioblastome rétinien (von-Hippel, 1904). Plus tard, en 1926, Arvid Lindau décrivit le caractère systémique de cette maladie et notamment l'association qui existe avec l'hémangioblastome cérébelleux (Lindau, 1927). Ce syndrome, qui a une incidence de 1/36000 et une pénétrance maximum de 90% à 65 ans entraîne le développement de tumeurs bénignes et malignes dans divers organes, les manifestations les plus fréquentes étant les hémangioblastomes du système nerveux central ou de la rétine, les phéochromocytomes et les CCR de type conventionnel. Il est important de noter que les CCC métastatiques sont une des principales causes de décès des patients atteints de la maladie de von Hippel-Lindau. La majorité des patients qui développent ce syndrome porte une mutation germinale d'un des allèles du gène VHL. Une mutation somatique du deuxième allèle est alors à l'origine de la maladie. Ceci explique que chez ces patients, les CCC soient souvent bilatéraux et multifocaux. Enfin, il existe une corrélation entre le génotype et le phénotype des patients atteints de cette maladie de von Hippel-Lindau. Ceci a conduit à une subdivision de ce syndrome en type 1 et 2, le type 2 étant lui-même divisé en 3 groupes A, B et C en fonction du risque de développer un CCC (Shehata et al., 2008). (Tableau 4 ci-dessous)

Classification	Mutation <i>VHL</i>	Défaut moléculaire	Manifestations cliniques
Type 1	Perte totale ou partielle du <i>VHL</i> Mauvais folding	Surexpression des facteurs HIF	Hémangioblastomes CCR Faible risque de phéochromocytomes
Type 2A	Mutation nonsens du <i>VHL</i>	Surexpression des facteurs HIF Incapacité à stabiliser les microtubules	Hémangioblastomes Phéochromocytomes Faible risque de CCR
Type 2B	Mutation nonsens du <i>VHL</i>	Surexpression des facteurs HIF	Hémangioblastomes Phéochromocytomes Fort risque de CCR
Type 2C	Mutation nonsens du <i>VHL</i>	p <i>VHL</i> est capable de réguler les facteurs HIF Faible liaison à la fibronectine Défaut d'assemblage de la matrice fibronectine	Phéochromocytomes uniquement

Tableau 4 : *Caractéristiques de sous-types de la maladie de von Hippel Lindau* (Kim et al., 2004). Abréviations : *VHL*, von Hippel Lindau ; HIF, hypoxia induced factors ; p*VHL*, protéine *VHL*

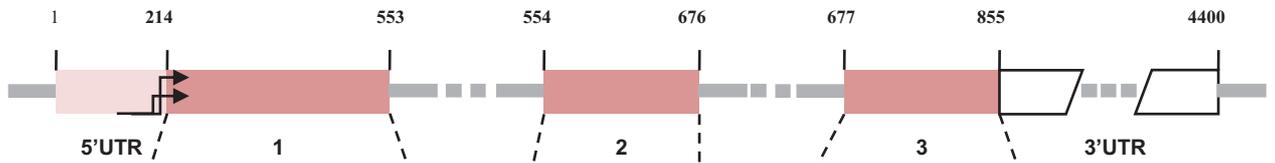
2.2 Le *VHL*

2.2.1 Un gène suppresseur de tumeur

Conformément au modèle de Knudson dans lequel s'intègre le *VHL*, une inactivation bi-allélique de ce gène est retrouvée dans la majorité des cas sporadiques de CCC. Cette inactivation peut être due à des mutations somatiques dans plus de 50% des cas ou à une hyperméthylation du promoteur dans 10 à 20% des cas. La propriété de gène suppresseur de tumeur du *VHL* est clairement illustrée par l'étude de Iliopoulos et al (Iliopoulos et al., 1995) dans laquelle il a été montré que la réintroduction du *VHL* dans des cellules *VHL*(-/-) est suffisante pour empêcher le développement de tumeurs chez la souris nude xénogreffée. Notons également que les souris *VHL*(-/-) meurent à mi-gestation d'un défaut de vascularisation du placenta et que les souris *VHL*(-/+) sont viables mais développent de nombreuses tumeurs vascularisées dans le foie (Kapitsinou and Haase, 2008).

□

A. Gène VHL



B. Protéine VHL

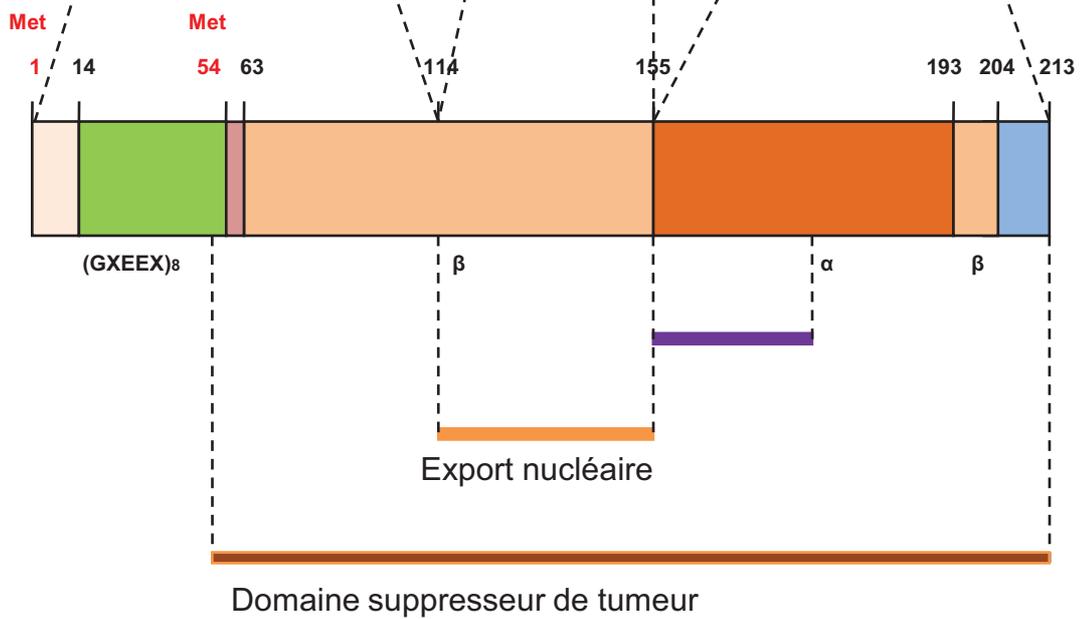


Figure 3 : Structure et fonction du gène et de la protéine VHL. (A) Le gène de la contient 3 exons, des régions 5' et 3' UTR et plusieurs sites de transcription. (B) Structure des domaines α et β de la protéine VHL. Les méthionines 1 et 54 donnent les protéines VHL (1-213) et VHL (54-213) respectivement.

2.2.2 Structure du gène

Les observations que des délétions du bras court du chromosome 3 étaient fréquentes dans les cas sporadiques de CCR et que ce même chromosome était souvent le siège de translocations chez les patients atteints de la maladie de von Hippel-Lindau ont conduit les investigateurs à étudier le profil génétique des patients souffrant de CCR familiaux. Ils présumaient en effet que le gène responsable de ce syndrome était également impliqué dans le développement des formes sporadiques. C'est ainsi que par recoupements génétiques, *Seizinger et al* ont localisé le gène VHL en position 3p25-26 (Seizinger et al., 1988; Seizinger et al., 1991). Par la suite, une collaboration internationale menée par Eamon Maher (Université de Cambridge, Angleterre) a permis de cloner ce gène en 1993 (Latif et al., 1993).

Ce gène VHL, est constitué de 3 exons et code principalement pour un ARN messager de 4,5 kb qui possède une longue région 3'UTR (*Untranslated region*). Ce messager contient les 3 exons et donnera 2 protéines, pVHL (1-213) et pVHL (54-213), la seconde étant le résultat d'une initiation à partir d'une méthionine en position 54 dans le cadre de lecture (Blankenship et al., 1999) (Figure 3A). Par épissage alternatif, un second ARNm comportant seulement les exons 1 et 3 peut être transcrit mais celui-ci ne semble pas avoir de rôle suppresseur de tumeur .

Son promoteur est situé au sein d'un îlot CpG et ne contient ni boîte TATA ni boîte CCAAT mais plusieurs sites de liaison putatifs pour des facteurs de transcription. Les 2 principales études qui se sont intéressées à ce promoteur (Kuzmin et al., 1995; Zatyka et al., 2002) ont permis de définir une région promotrice minimale de 106 nucléotides et de délimiter des régions régulatrices. Ainsi, ce promoteur contient 3 régions activatrices : 2 en amont du site d'initiation (de -114 à -91 et de -49 à -19) se liant à des facteurs de transcription encore non identifiés à ce jour et une en aval du site d'initiation (de +1 à +11) , site de liaison du facteur de transcription Sp1. L'étude de Zatyka et al. (2002) a également mis en évidence une région régulatrice inhibitrice en aval du nucléotide +17, là encore le ligand n'a pas été identifié.

2.2.3 pVHL

Chez l'homme, le gène VHL code pour 2 protéines appelées pVHL(1-213) ou pVHL³⁰ qui a un poids moléculaire de 28-30 kDa et pVHL(54-213) ou pVHL¹⁹ au poids moléculaire de 18-19 kDa, la seconde étant celle obtenue par l'initiation de la traduction en position 54. La seule différence entre ces 2 protéines est un domaine N-terminal acide que contient la forme longue mais pas la forme courte (figure 3B). Le rôle de cette séquence n'est pas connu, néanmoins il

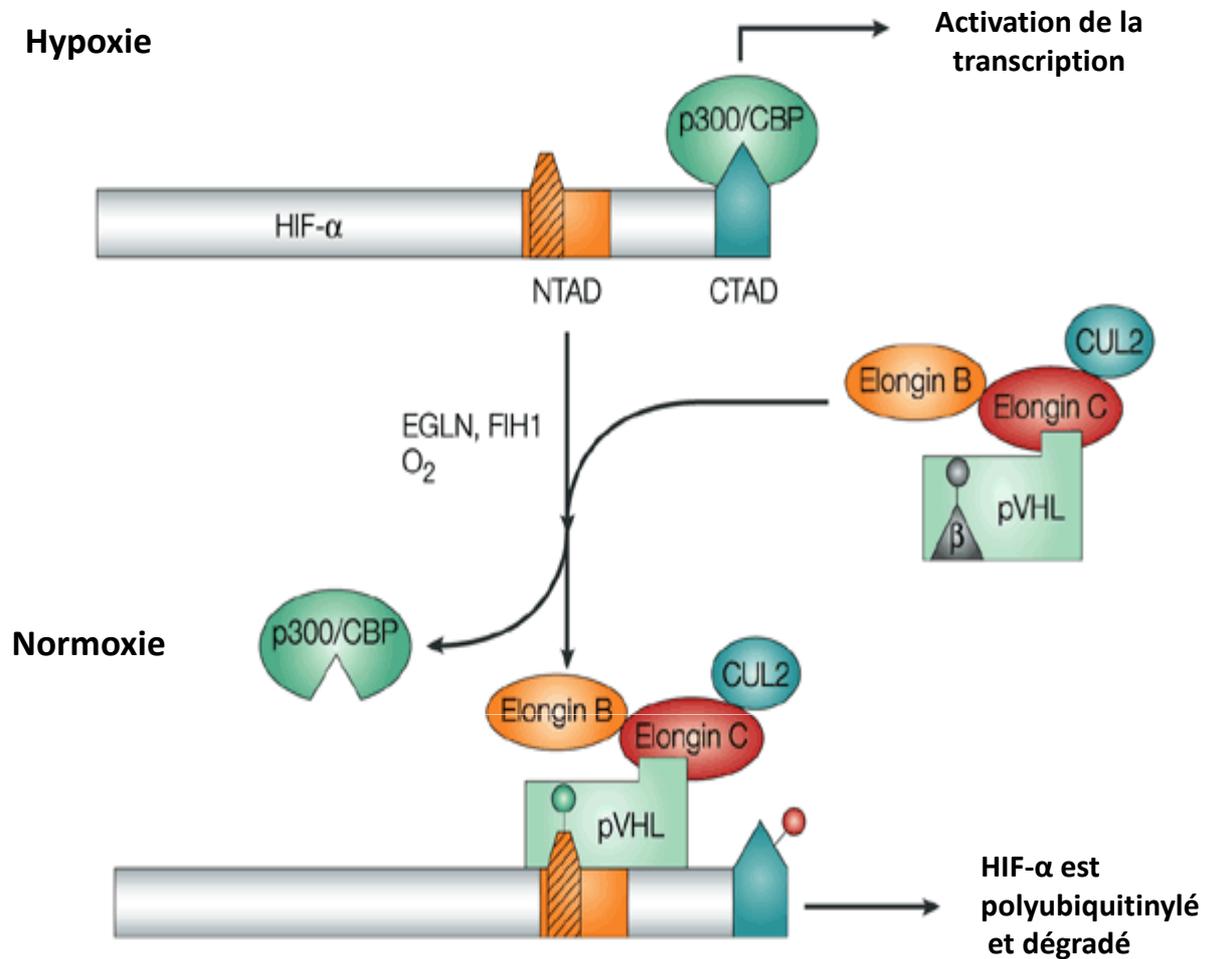


Figure 4 : Rôle des domaines fonctionnels de HIF- α . Le domaine CTAD du HIF- α interagit avec les co-activateurs de la transcription CBP/p300 pour activer la transcription de ses gènes cibles, le domaine de dégradation dépendante de l'oxygène n'étant pas phosphorylé, HIF n'est pas reconnu par le complexe d'ubiquitine ligase. En présence d'oxygène, une asparagine est hydroxylée dans le domaine CTAD, inhibant la liaison avec CBP/p300. Dans le même temps, l'hydroxylation de 2 prolines dans le domaine ODD permet au VHL de reconnaître ces facteurs HIF- α et de les dégrader.

ne semble pas lié au rôle suppresseur de tumeur du VHL. En effet, la réintroduction de l'une ou l'autre de ces formes dans des lignées de CCC déficientes en VHL suffit à supprimer la croissance de tumeurs xénogreffées chez la souris nude (Iliopoulos et al., 1995). Cependant, on note quelques différences entre pVHL³⁰ et pVHL¹⁹ qui pourraient être attribuées à ce domaine N-terminal. Ainsi, si les deux protéines sont retrouvées dans le noyau, le cytoplasme et les mitochondries, seul pVHL³⁰ peut être associé au réticulum endoplasmique. Il semblerait que la forme longue soit plutôt associée aux microtubules dans le cytoplasme et que la forme courte soit plutôt nucléaire. Notons également que pVHL³⁰ peut se lier à la fibronectine contrairement à pVHL¹⁹ (Kaelin, 2007). Ceci dit, les 2 formes ayant la même activité suppresseur de tumeur, je parlerai désormais de pVHL qui englobera les deux formes.

La séquence primaire du VHL ne présente aucun motif structural reconnaissable. Cependant, grâce aux données biochimiques et à la cristallographie par rayons X, 2 domaines fonctionnels nommés domaines alpha et beta ont pu être identifiés (Stebbins et al., 1999). Le domaine alpha s'étend des résidus 155 à 192 et consiste en 3 hélices α alors que le domaine beta lui, est formé de feuillets β des résidus 63 à 154 et d'une hélice α des résidus 193 à 294. Ces deux domaines sont souvent touchés par les mutations du gène VHL associées à des pathologies.

2.2.4 Le complexe de polyubiquitination

Le pVHL, par association avec les élongines B et C, la culline 2 et Rbx1 va former un complexe de polyubiquitination à activité E3 ubiquitine ligase dont la formation et l'activité sont dépendantes des domaines α et β du pVHL. En effet, le domaine α de pVHL va interagir avec l'élongine C qui va jouer le rôle de protéine adaptatrice pour assurer la liaison du pVHL avec l'élongine B et la culline 2 (Figure 4). Cette dernière va former une liaison avec Rbx1 et NEDD8 pour terminer la formation du complexe. Notons que la liaison du pVHL avec les élongines va lui permettre d'adopter une conformation optimale et donc de se stabiliser, probablement grâce à l'interaction entre les 3 hélices α du pVHL et l'hélice α de l'élongine C. Ce complexe ainsi formé possède une activité ubiquitine ligase et va donc être capable d'adresser les protéines cibles à une dégradation par le protéasome 26S. C'est le pVHL qui confère sa spécificité à ce complexe de polyubiquitination puisque la reconnaissance du substrat va se faire via son domaine β (Kaelin, 2007).

2.3 Le système VHL/HIF

2.3.1 Les facteurs HIF

Un facteur de transcription

Les facteurs HIF sont des membres de la famille des facteurs de transcription hétérodimériques bHLH/PAS (basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim) (Wang et al., 1995). Ils sont composés d'une sous-unité α sensible à l'oxygène et d'une sous-unité β constitutive. Pour que ce facteur de transcription soit actif, les sous-unités HIF- α , cytoplasmiques, doivent entrer dans le noyau et dimériser avec les sous-unités β , via l'interaction des domaines bHLH et d'une partie des domaines PAS des 2 sous-unités. Le dimère actif ainsi formé va pouvoir recruter des coactivateurs de la transcription tels que CBP/p300 et se lier sur des séquences consensus appelées HRE (*hypoxia-responsive element*), situées au niveau des promoteurs et/ou enhancers des gènes cibles pour activer leur transcription. La liaison à l'ADN est possible notamment grâce à la basicité des domaines bHLH du dimère HIF. Ces gènes cibles incluent des facteurs contrôlant le cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, la formation de la matrice extracellulaire, l'angiogénèse, le transport du glucose et le métabolisme comme le VEGF, le transporteur 1 du glucose, le PDGF- β , l'endothéline-1, la transferrine ou encore l'érythropoïétine (Bardos and Ashcroft, 2004; Hickey and Simon, 2006).

Régulation

Il existe 3 isoformes de chacune des sous-unités α et β , chaque sous-unité α étant susceptible de dimériser avec n'importe laquelle des sous-unités β et inversement

Les sous-unités α :

Les sous-unités HIF- α sont donc au nombre de trois : HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α . Les fonctions précises de HIF-3 α ne sont pas clairement identifiées car encore trop peu étudiées. Cependant, cette isoforme pourrait agir comme un régulateur négatif des 2 autres isoformes (Maynard et al., 2007). Nous nous intéresserons donc principalement aux isoformes HIF-1 et 2 α . En plus des domaines bHLH et PAS, elles comportent un domaine de dégradation oxygène-dépendant (ODD) (Weikert et al.), 2 domaines de transactivation (N-TAD et C-TAD) et un signal de localisation nucléaire NLS leur permettant d'aller interagir avec les sous-unités β dans le noyau de façon autonome (Figure 4).

Les domaines de transactivation, N-TAD et C-TAD sont impliqués dans le recrutement de coactivateurs de la transcription et dans l'interaction du facteur de transcription avec la

machinerie transcriptionnelle. Le domaine C-TAD est également un site de régulation des facteurs HIF puisqu'il contient une asparagine qui peut être hydroxylée par FIH (*Factor Inhibiting HIF*). Cette hydroxylation a pour rôle d'inhiber la liaison de HIF- α avec CPB/p300 et ainsi de prévenir l'activation transcriptionnelle de ses cibles. De façon intéressante, il semble qu'en conditions normoxiques, l'isoforme HIF-2 α soit relativement résistante à l'inhibition de FIH comparé à HIF-1 α , probablement du fait de la différence des acides aminés autour du site d'hydroxylation (Yan et al., 2007). Les travaux de ces mêmes auteurs suggèrent fortement que les domaines N-TAD et C-TAD coopèrent pour activer la transcription des gènes cibles et que cette coopération est plus importante pour HIF-2 α que pour HIF-1 α (Yan 2007).

Le domaine ODD, est le siège de la principale régulation des sous-unités α . Il comporte des prolines qui, en présence d'oxygène, sont hydroxylées de façon à induire la dégradation de ces facteurs (Jaakkola et al., 2001; Masson et al., 2001). En effet, ils ne doivent normalement jouer leur rôle qu'en conditions hypoxiques. Ainsi, en conditions normoxiques, HIF-1 α sera hydroxylé sur les résidus Pro 402 et Pro 564 et HIF-2 α sur les résidus Pro405 et Pro 531 situés dans ce domaine ODD (Figure 4). Ces hydroxylations sont catalysées par des prolyl-hydroxylases spécifiques appelées PHD1, 2 et 3 (HIF-specific Prolyl Hydroxylase Domain protein) (Bruick and McKnight, 2001). De façon intéressante, PHD2 qui hydroxyle préférentiellement HIF-1 α et PHD3, qui hydroxyle les 2 isoformes, sont elles-mêmes induites par l'hypoxie de façon HIF-1 α et HIF-2 α dépendante respectivement. Comme énoncé plus haut, l'hydroxylation des prolines va induire la dégradation des sous-unités HIF-1 et 2 α . En effet, c'est ce qui va permettre au VHL de les reconnaître pour les diriger vers une dégradation par le protéasome 26S.

Ainsi, la régulation des facteurs de transcription HIF se fait via leurs sous-unités alpha à deux niveaux. Notons cependant que la régulation au niveau des domaines ODD est plus importante que celle au niveau des domaines C-TAD. En effet, l'absence de dégradation des sous-unités- α en présence d'oxygène (donc lorsque l'inhibition des domaines C-TAD fonctionne) est suffisante à induire l'expression des gènes cibles des facteurs HIF (Wiesener et al., 2001).

Les sous-unités β :

Cette sous-unité β communément appelée HIF- β est aussi nommée ARNT pour *hydrocarbon receptor nuclear translocator* car elle avait déjà été identifiée comme interagissant avec le facteur de transcription AhR (*Arylhydrocarbon receptor*). Il existe 2 autres isoformes de

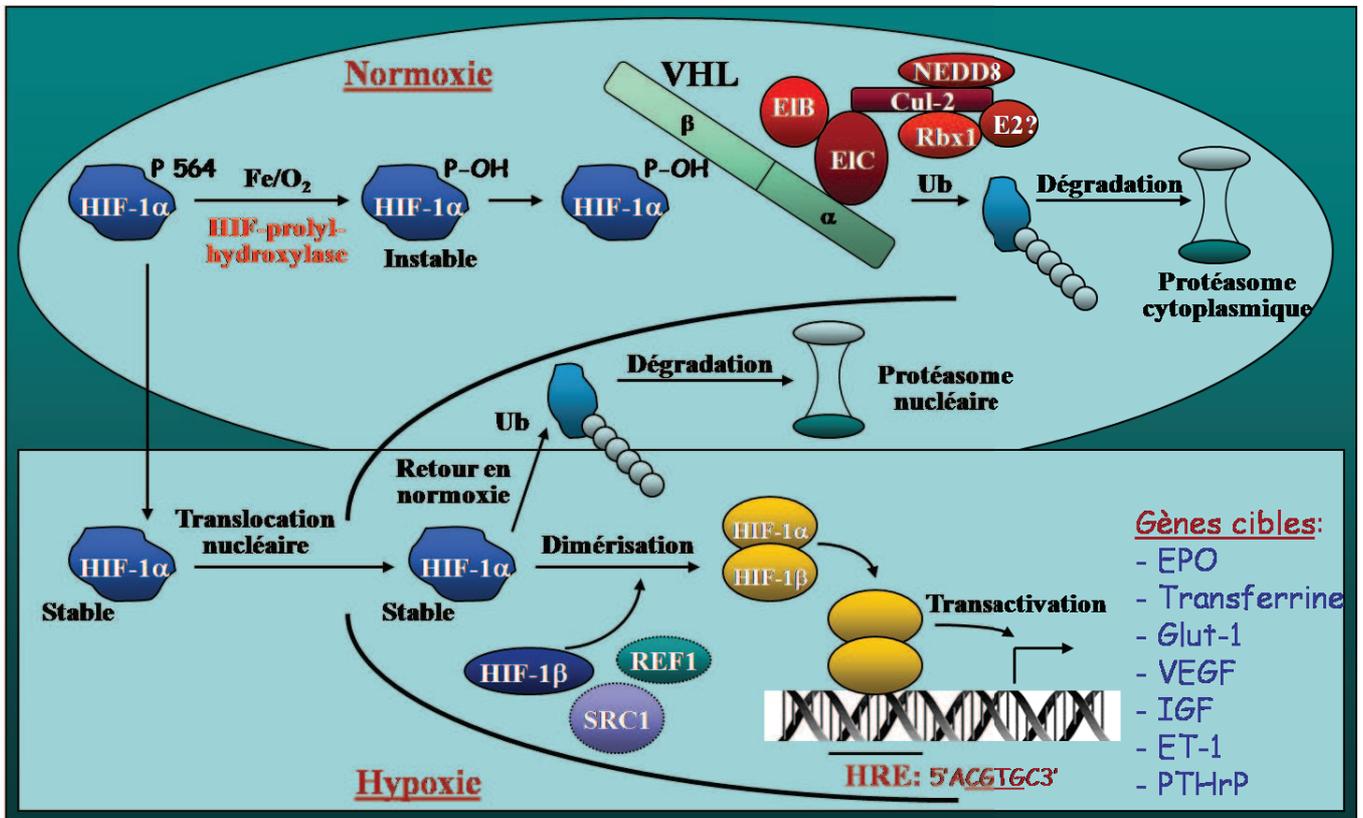


Figure 5 : le système VHL/HIF. Mécanisme de régulation des facteurs HIF- α par le VHL en conditions normoxiques et conséquences de leur stabilisation en conditions hypoxiques et/ou en l'absence d'un VHL fonctionnel

sous-unité β , ARNT2 et ARNT3 qui se lient également aux sous-unités HIF- α (Hirose et al., 1996; Takahata et al., 1998). L'expression des protéines ARNT2 est cependant limitée à certains tissus comme le cerveau ou le rein contrairement à HIF-1 β qui est ubiquitaire. Quant à ARNT3, il n'interagit que faiblement avec les sous-unités HIF- α , son implication dans la réponse à l'hypoxie n'a pas été démontrée. L'expression de ces sous-unités étant constitutive, elles ne sont pas sujettes à une régulation particulière.

2.3.2 Mécanisme moléculaire

La principale activité biologique du pVHL est la dégradation dépendante de l'oxygène des facteurs induits par l'hypoxie HIF- α . En effet, nous venons de voir que pVHL, par association avec notamment la culline 2 et les élongines B et C forme un complexe à activité ubiquitine-ligase E3, or les facteurs HIF- α sont la principale cible de ce complexe. Le rôle majeur du pVHL est donc de reconnaître ces facteurs HIF- α qui seront alors polyubiquitinylés puis dégradés par le protéasome 26S (Haase, 2006).

Les facteurs HIF ont normalement pour rôle d'aider la cellule à résister aux conditions hypoxiques, leur régulation est donc logiquement conditionnée par la présence d'oxygène : ils doivent être hydroxylés pour être reconnus par le pVHL. Ainsi, en conditions hypoxiques, ou en l'absence d'un pVHL fonctionnel, ce qui rappelle le cas dans la majorité des CCC, ces facteurs ne seront pas dégradés. Ils vont donc s'accumuler dans le cytoplasme et pourront alors entrer dans le noyau où ils vont interagir avec les facteurs HIF-1 β et jouer leur rôle de facteurs de transcription (Figure 5).

Parrallèlement à cette régulation transcriptionnelle, le système VHL/HIF peut également réguler ces mêmes cibles au niveau post-transcriptionnel, c'est le cas par exemple pour le VEGF. D'autres cibles, comme les TGF- α et β sont régulées exclusivement de façon post-transcriptionnelle par ce système, au niveau de la stabilité de leur messager (Gnarra et al., 1996; Knebelmann et al., 1998).

2.3.3 Cibles du système

Le système étant basé sur la non-dégradation des facteurs HIF- α et donc leur activation, les cibles de ce système VHL/HIF sont les produits des gènes cibles des facteurs HIF-1 et 2 α (Figure 6). Ainsi, lorsque le VHL est inactivé, de nombreux gènes cibles vont être activés (Hickey and Simon, 2006). Les protéines ainsi surexprimées vont notamment intervenir dans :

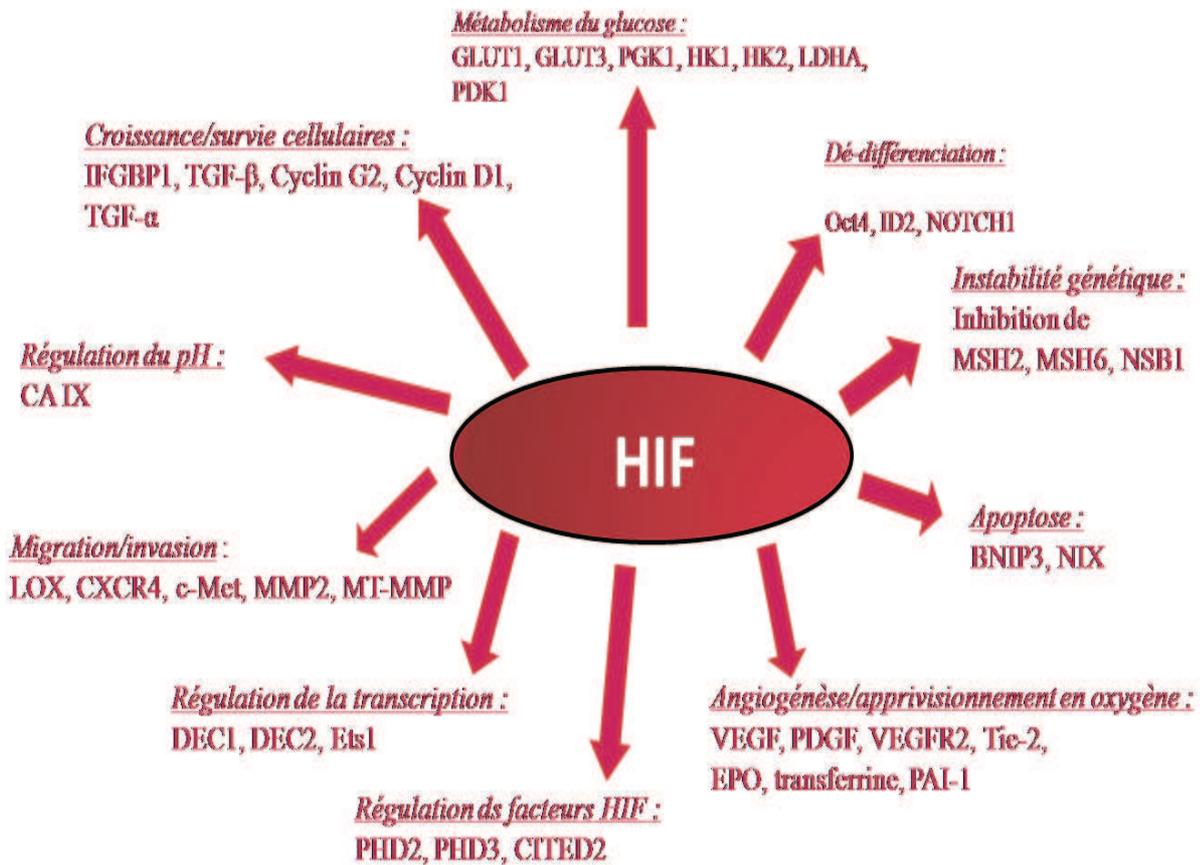


Figure 6 : Les cibles des facteurs HIF-1 α et HIF-2 α . Les facteurs HIF- α régulent de nombreuses cibles jouant un rôle dans divers mécanismes contribuant à la survie tumorale

- l'angiogenèse avec le VEGF, le PDGF- β
- la croissance cellulaire et l'apoptose avec les TGF- α et β et la PTHrP
- le métabolisme du glucose (Glut1)
- l'érythropoïèse (EPO)
- la formation de la matrice extracellulaire (fibronectine)
- la survie cellulaire avec IGF-2, IGF-BP2 et NOS2
- l'équilibre acido-basique (anhydrase carbonique 9 et 12)
- le métabolisme des lipides (leptine)

Toutes ces voies cellulaires vont favoriser la croissance tumorale.

Les 2 sous-unités HIF-1 et 2 α , bien que présentant de grandes similitudes tant au niveau de leur structure, de leur fonction que de leur régulation, n'ont pourtant pas des rôles redondants. En effet, si leurs gènes cibles sont en grande partie communs et potentiellement activables par l'une ou l'autre des isoformes de manière équivalente *in vitro*, les études d'inactivations génétiques ont révélé des différences *in vivo* en identifiant HIF-1 α comme le principal médiateur de la réponse à l'hypoxie et comme le facteur de transcription prédominant dans de nombreux types cellulaires (Hu et al., 2003; Sowter et al., 2003). Cependant, dans le CCC, notamment les CCC déficients en VHL, il apparaît que HIF-2 α est souvent majoritairement exprimé et qu'il joue un rôle oncogénique beaucoup plus important que HIF-1 α . Ceci est illustré par le fait que l'effet suppresseur de tumeurs du VHL peut-être « annulé » par l'expression d'un variant HIF-2 α capable de se soustraire à la dégradation par le pVHL mais pas par un variant similaire de HIF-1 α (Kondo et al., 2003; Kondo et al., 2002; Maranchie et al., 2002). Inversement, l'inhibition de HIF-2 α mais pas de HIF-1 α par siRNA dans des cellules de CCC VHL(-/-) permet de supprimer leur tumorigénèse *in vivo*. Enfin, Raval et al (Raval et al., 2005) ont montré que dans des cellules de CCC, les 2 isoformes avaient des effets opposés, HIF-2 α favorisant la croissance cellulaire contrairement à HIF-1 α qui la ralentirait.

2.4 Autres rôles du VHL

Si le rôle du VHL dans la dégradation des facteurs HIF- α et le lien de ce système avec le développement de tumeurs est aujourd'hui bien établi, beaucoup d'arguments prônent également pour d'autres fonctions du VHL qui seraient HIF-indépendantes. Tout d'abord, la corrélation qui existe entre le génotype et le phénotype des patients atteints de la maladie de von Hippel-Lindau suggère fortement que le pVHL a des rôles indépendants des facteurs HIF

(Tableau 5). En effet, chez les patients atteints du type 2C, pVHL n'a pas perdu sa capacité à dégrader les facteurs HIF- α or les patients développent tout de même des phéochromocytomes, ceci probablement à cause du gain ou de la perte d'une fonction supplémentaire. De même, les patients du type 2A, et ceux du type 2B, ont tous un pVHL qui a perdu son habilité à dégrader les facteurs HIF- α pourtant, ils ne présentent pas le même risque de développer un CCR, suggérant donc qu'une fonction alternative du pVHL, affectée dans un groupe mais pas dans l'autre est également impliquée dans le développement de ces tumeurs. Enfin une ou des fonctions alternatives du pVHL HIF-indépendantes, pourraient expliquer que chez la souris exprimant un VHL sauvage, la surexpression de formes non dégradables de HIF-1 α et donc de ses protéines cibles, induise une prolifération des vaisseaux cellulaires mais sans développement de tumeurs (Elson et al., 2001).

Ainsi, bien que les mécanismes de ces différentes fonctions ne soient pas clairement établis à l'heure actuelle, pVHL semble impliqué dans la formation de la matrice extracellulaire, la régulation du cycle cellulaire, la stabilité des ARNm HIF-indépendante ou encore la régulation de la transcription. En effet, hormis HIF- α , le VHL interagit avec d'autres protéines dont certaines seront adressées vers une dégradation par le protéasome et d'autres pas. Ces protéines sont répertoriées dans le tableau 5.

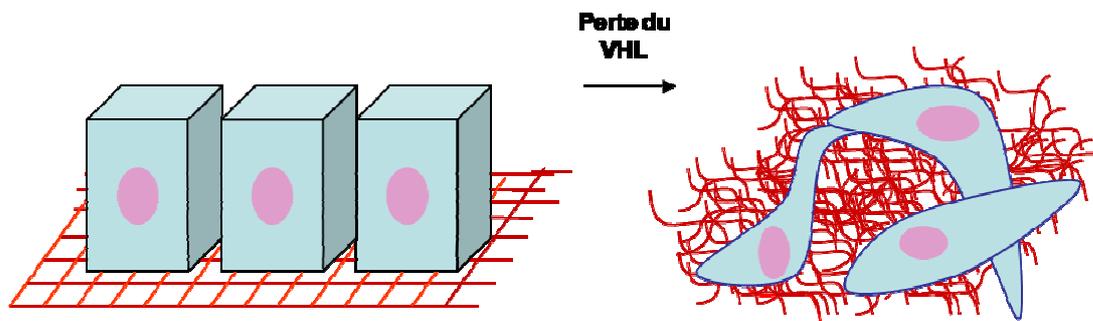
2.4.1 Interactions avec la matrice extracellulaire et le cytosquelette

Le pVHL peut se lier directement avec la fibronectine, une glycoprotéine interagissant avec les intégrines pour relier les cellules aux protéines structurales de la matrice extra-cellulaire (MEC). De façon intéressante, les cellules déficientes pour le VHL présentent une MEC désorganisée, défaut qui est réversible lorsque l'on restaure un pVHL fonctionnel dans ces mêmes cellules (Ohh et al., 1998) (Figure 7). Le mécanisme par lequel l'interaction entre pVHL, une protéine cytoplasmique et la fibronectine, une protéine sécrétée peut influencer l'assemblage de la matrice extra-cellulaire n'est cependant pas clair. D'autres conséquences de l'inactivation du VHL, comme une expression altérée des intégrines, une surexpression des métalloprotéases de la matrice ou une expression moindre de TIMP-2 (un antagoniste des métalloprotéases de la matrice) pourraient contribuer à ce phénotype. Bien que mal comprise, cette fonction du VHL est tout à fait intéressante. En effet, comme le comportement des cellules épithéliales est influencé par les interactions avec la MEC, l'altération de celle-ci pourrait contribuer à la tumorigénèse des cellules déficientes en VHL.

Protéines associées au VHL	Fonction
Elongin B/p14	Composant du complexe ubiquitin-ligase; ? régulation de la transcription et de l'élongation
Elongin C/p18	Composant du complexe ubiquitin-ligase; ? régulation de la transcription et de l'élongation
Cullin 2	Composant du complexe ubiquitin-ligase
Fibronectin	Assemblage de la matrice extracellulaire; ? mécanisme
Rbx1 (Roc1)	Composant du complexe ubiquitin-ligase
HIF α	Cible d'ubiquitination
PKC λ and PKC ξ	Inhibition de l'activité kinase; ? Cible d'ubiquitination
PKC δ	Inhibition de l'activité kinase
Sp1	Inhibition de l'activité transcriptionnelle de Sp1
CCT complex	Assemblage/repliement du complexe ubiquitin-ligase
hnRNPa2	Inhibition de hnRNPa2 qui contrôle le <i>turn-over</i> des ARNm; ? Cible d'ubiquitination
FIH-1	Inhibition de la fonction transactivatrice des facteurs HIF- α . ? VHL agit comme un corépresseur
VDU-1 and VDU-2	? Cible d'ubiquitination; Enzyme de déubiquitination de HIF
Jade-1	Stabilisation de Jade-1; possible suppresseur de tumeur
Rpb1	? Cible d'ubiquitination; contrôle de la transcription
VHL α K	Inhibition de la fonction transactivatrice des facteurs HIF- α . ? VHL agit comme un corépresseur
Rpb7	? Cible d'ubiquitination ; contrôle de la transcription
TBP-1	Recrutement des cible d'ubiquitination de pVHL ubiquitylation vers le protéasome

Tableau 5 : Protéines interagissant avec pVHL. Fonction de ces interactions. Kaekin 2007

De plus, pVHL interagit également avec les microtubules pour les stabiliser en inhibant leur dépolymérisation. Hergovich et al (Hergovich et al., 2003) ont montré que cette propriété semble indépendante de l'activité E3 ubiquitin-ligase du VHL puisque les mutants VHL incapables de lier l'élongine C conservent la capacité de stabiliser les microtubules. De façon intéressante, la perte de cette fonction semble distinguer les types 2A et 2B de la maladie de von Hippel-Lindau.



Morphologie de la cellule	Epithéliale	Mésenchymale
Matrice Extracellulaire	Organisé	Désorganisé
E-cadhérine	Positif	Négatif
Cytosquelette	Stable	Instable
Adhésion	Croissante	Décroissante
Mobilité	Décroissante	Croissante

Figure 7 : Désorganisation de la matrice extracellulaire en l'absence d'un VHL sauvage
D'après Kaelin et al (2007)

2.4.2 Autres fonctions

D'autres protéines interagissant avec pVHL ont été identifiées (Kaelin, 2007) (Tableau 5). Parmi celles qui sont reconnues (ou soupçonnées de l'être) pour être polyubiquitinylées et dégradées par le protéasome on retrouve :

- les PKC γ et PKC δ lorsqu'elles sont hyperphosphorylées et donc activées
- les protéines VDU1 et VDU2 (VHL-interacting deubiquitin enzyme) qui déubiquitinent HIF- α

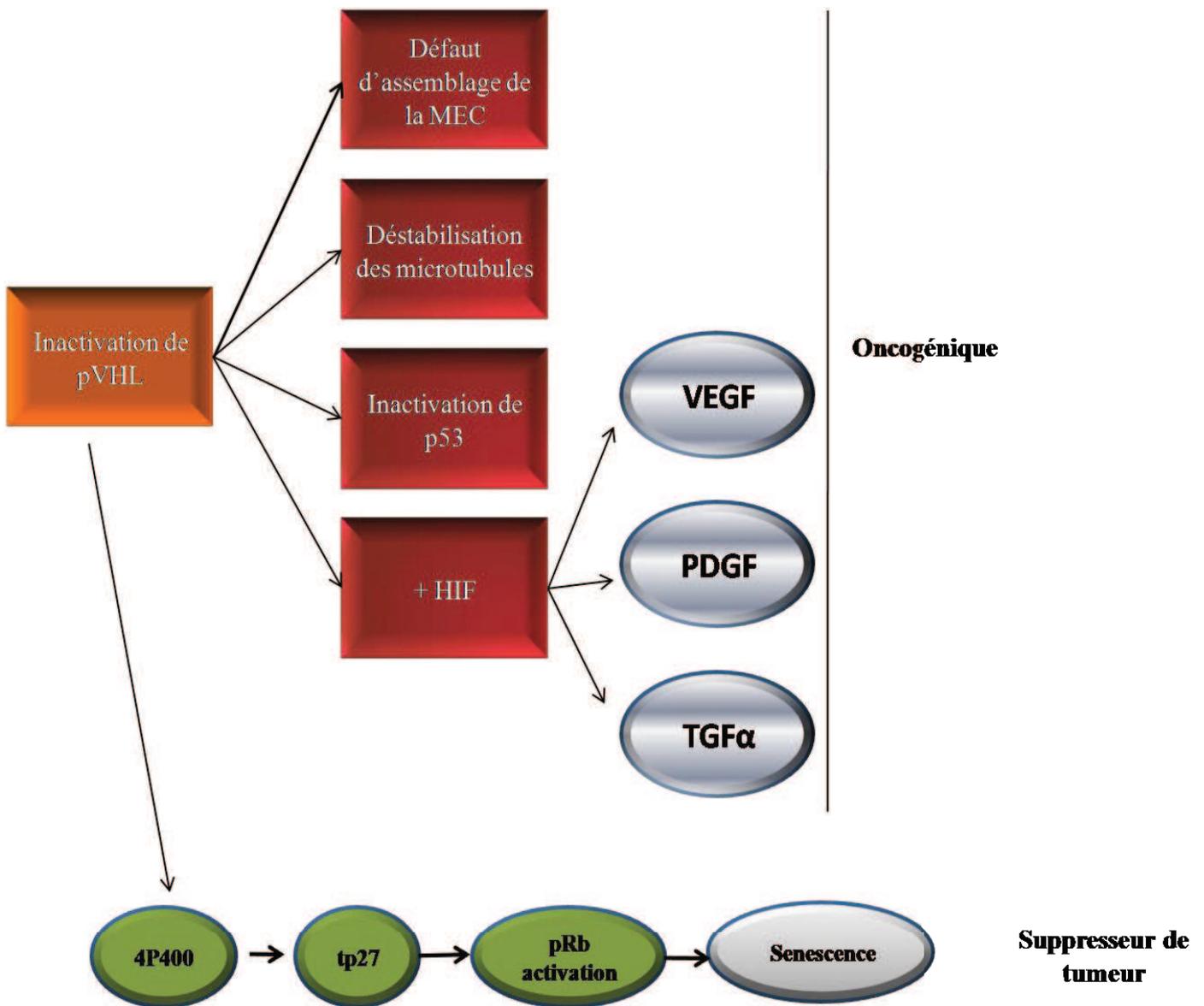


Figure 8: Effets pro- et anti-oncogéniques de la déficience en VHL. La déficience en VHL induit des défauts cellulaires impliqués dans l'oncogénèse mais peut également inhiber la croissance tumorale en induisant la sénescence cellulaire. D'après Kaelin et al. (2007)

- des protéines intervenant dans la régulation de la transcription comme Rpb1 et 7
- des protéines de stabilisation/déstabilisation de l'ARN comme hnRNPa2

D'autres protéines interagissent avec pVHL sans pour autant être dégradées :

- PKC γ et PKC δ , dont l'activité catalytique est alors inhibée
- le facteur de transcription Sp1
- FIH-1 et VHLaK (pVHL-associated KRAB-A domain-containing protein) pour coréprimer les facteurs HIF
- HuR1 qui intervient dans la stabilisation des ARNm

2.4.3 pVHL et sénescence

Une étude récente de Young et al (Young et al., 2008) a démontré une nouvelle fonction surprenante du VHL. En effet, ils ont montré que dans des fibroblastes d'embryons de souris (MEF), la perte du VHL était à l'origine d'un important mécanisme suppresseur de tumeur *in vivo*, la sénescence. De fait, les MEF inactivées pour VHL montraient un important taux d'arrêt de croissance cellulaire et exprimaient des marqueurs de la sénescence comme SABG (*Senescence Associated beta-galactosidase*) et SAHF (*senescence-associated heterochromatic foci*). De plus, ces travaux ont montré que l'induction de cette sénescence est indépendante de HIF mais passe par une induction de la voie RB après la stabilisation de l'inhibiteur de kinase cyclin-dépendant p27^{KIP}. Cette nouvelle fonction du VHL reste à être démontrée dans les cellules humaines, mais pourrait expliquer pourquoi les lésions associées à la maladie de von Hippel-Lindau sont restreintes à certains tissus en particulier alors que le VHL est ubiquitaire. En effet, il est tout à fait possible que la perte du VHL entraîne une sénescence et donc empêche la formation de tumeurs dans la majorité des tissus, alors que dans certains tissus particuliers comme le rein, les effets oncogéniques du VHL prennent le dessus.

Ainsi, le VHL joue un rôle central dans le développement des CCC en majeure partie du fait de son implication dans la dégradation des facteurs de transcription HIF- α . (figure 8)

3- La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne

(PTHrP)

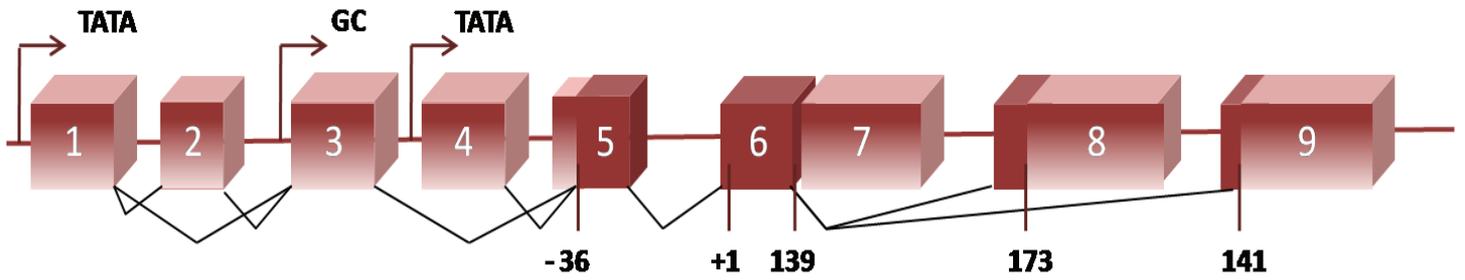
La PTHrP (*parathyroid hormone-related protein*) est une polyprotéine qui a été identifiée en 1987 comme étant le facteur circulant d'origine tumorale, responsable du syndrome paranéoplasique d'hypercalcémie humorale maligne, ou HHM (Burtis et al., 1987). Elle présente une grande homologie de séquence avec la PTH dans sa partie N-terminale, ce qui lui permet d'interagir avec le même récepteur, le RPTH1. Contrairement à la PTH qui est sécrétée et exprimée exclusivement par la glande parathyroïdienne, la PTHrP est ubiquitaire et est exprimée aussi bien au cours du développement que chez l'adulte.

3.1 Son gène

3.1.1 Structure

Chez l'homme, le gène de la PTHrP est un gène unique qui est situé sur le bras court du chromosome 12 et dont la structure a été rapportée au début des années 1990 (Ikeda et al., 1988). Il s'étend sur plus de 15 kb d'ADN génomique et contient 9 exons ainsi que 3 promoteurs P1, P2 et P3 (Figure 9A). Les promoteurs P1 et P3 sont des boîtes «TATA» classiques nécessaires pour la transcription par l'ARN polymérase II, alors que le promoteur P2 est une séquence riche en éléments «GC» contenant de nombreux sites de liaison pour les facteurs de transcription (Mangin et al., 1989, 1990; Vasavada et al., 1993). On retrouve également des sites régulateurs comme des « enhancers », des « silencers », des sites de liaison pour des facteurs de transcription (AP1, AP2 et Sp1), des sites CRE (*cAMP responsive element*) et des sites GRE (*glucocorticoïde responsive element*). Tous ces éléments suggèrent une régulation complexe de l'expression du gène de la PTHrP. En effet, bien que ces trois promoteurs soient actifs dans la plupart des cellules normales et tumorales, des expressions tissus-spécifiques ont été rapportées. De plus, l'utilisation alternative de ces 3 promoteurs va donner des ARN pré-messagers contenant 9, 7 ou 6 exons selon que la transcription est initiée au niveau de P1, P2 ou P3 respectivement. Ces ARN pré-messagers vont être le siège d'un épissage alternatif important (Gillespie and Martin, 1994; Thiede et al., 1988).

A



B

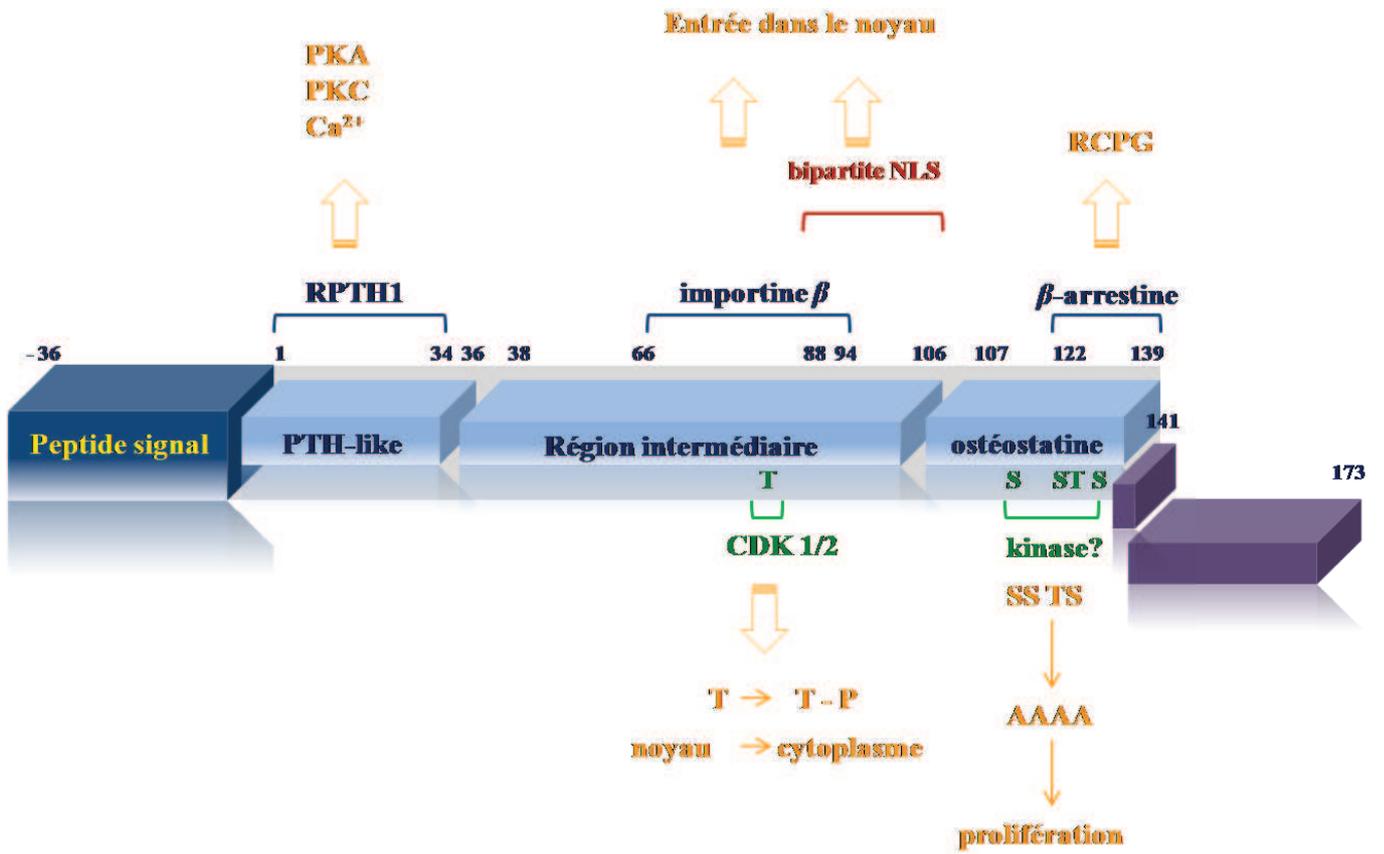


Figure 9 : Structure de la PTHrP. (A) Le gène de la PTHrP comprend 3 promoteurs et 9 exons. Par épissage alternatif, une quinzaine d'ARNm vont être générés, codant tous pour une protéine de 139, 141 ou 173 acides aminés . (B) La PTHrP est une polyprotéine qui va subir des modifications post-traductionnelles et qui contient de nombreux sites fonctionnels.

3.1.2 Produits

Ainsi, par épissage alternatif, une quinzaine d'ARNm codant pour 3 isoformes de 139, 141 ou 173 acides aminés vont être générés. Outre les différences dans les exons non traduits en 5', tous ces ARNm contiendront les exons 5 et 6, portant la quasi-totalité de la séquence codante de la PTHrP, ainsi qu'un des exons en 3' : l'exon 7, le 8 ou le 9. Selon l'exons incorporé (le 7, le 9 ou le 8), l'ARNm en question codera pour l'isoforme 139, 141 ou 173 respectivement (Philbrick et al., 1996; Southby et al., 1996; Southby et al., 1995). De façon intéressante, ces 3 exons portent majoritairement des régions non codantes qui constituent les régions 3'UTR de ces messagers et interviennent dans la régulation de leur stabilité. En effet, une particularité de ces régions 3'UTR est qu'elles contiennent de multiples séquences riches en AU (Luparello et al.) dans lesquelles on retrouve plusieurs copies du motif consensus AUUUA. Ces séquences sont impliquées dans le *turn-over* rapide des ARNm et sont généralement retrouvées dans la grande majorité des ARNm de protéines jouant un rôle dans la différenciation et la prolifération cellulaire, telles que les cytokines, les facteurs de croissance ou les proto-oncogènes. Ceci est en accord avec la demi-vie courte des l'ARNm de la PTHrP rapportée comme allant de 30 min à quelques heures (Martin et al., 1997). Ces différentes isoformes sont exprimées de façon tissus-spécifique, un point important sur lequel je reviendrai plus tard. Notons que dans les autres espèces, le gène de la PTHrP est plus simple, ne codant par exemple que pour un seul isoforme (139 ou 141) chez les rongeurs ou pour deux (139 et 141) chez le poulet. L'isoforme 173 est en effet spécifique à l'Homme (Philbrick et al., 1996).

3.1.3 Régulation

La structure complexe du gène de la PTHrP contenant 3 promoteurs, de nombreux sites de régulation et subissant un important épissage alternatif, illustre le niveau de complexité de sa régulation. En effet, la transcription de ce gène est sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels on retrouve notamment :

- le calcium
- l'AMPc
- les esters de phorbol
- les facteurs de croissance et les cytokines (EGF, TNFs, TGFs, ILs...),
- les facteurs de transcription comme NFκB

- les hormones peptidiques comme les vasoconstricteurs (angiotensine II)
- divers composés stéroïdiens (glucocorticoïdes, vitamine D3, oestrogènes...),

La transcription du gène de la PTHrP peut être régulée par ces différents facteurs de façon dépendante des conditions physiopathologiques. Par exemple, le promoteur P3, qui contient un site de liaison au facteur de transcription Ets1 décrit comme un proto-oncogène, est très actif dans les cancers (Southby et al., 1995). De façon intéressante, Hamzaoui et al (Hamzaoui et al., 2007) ont montré que Ets1 active le promoteur P3 dans des lignées cellulaires de cancer du sein mais pas dans les lignées non cancéreuses, et ce également lorsqu'il est surexprimé. De plus, l'influence de divers facteurs comme le TGF- β ou les esters de phorbol sur la régulation de la PTHrP requiert la présence de Ets1 ou Ets 2 ainsi que l'intégrité de leur site de liaison sur le gène (Lindemann et al., 2001; Lindemann et al., 2003) . Notons également que la présence de deux types de promoteurs différents « GC » et « TATA » suggère qu'un type de promoteur puisse être utilisé pour une expression domestique et l'autre pour une expression régulée

•

3.2 La protéine

Ces 3 isoformes de la PTHrP ont une grande partie de leur séquence en commun. Ils contiennent en effet une séquence signal « prépro » identique de 36 acides aminés (aa -36 à -1), qui va permettre leur transport et leur maturation dans le réticulum endoplasmique, et portent en commun leurs 139 premiers acides aminés (Philbrick et al., 1996). Ces 139 acides aminés correspondant à l'isoforme 139 comportent une séquence bipartite de localisation nucléaire (bNLS). Les isoformes 141 et 173 ont donc respectivement 2 et 32 aa supplémentaires en C-terminal. En N-terminal, 8 des 13 premiers acides aminés de la PTHrP sont identiques à ceux de la PTH et la structure tridimensionnelle de la région 14-34 des 2 protéines est similaire, ce qui permet à la PTHrP d'interagir avec le récepteur de la PTH, le RPTH1. La séquence 1-111 est néanmoins très conservée entre les différentes espèces telles que l'homme, la souris, le rat et le poulet. La région C-terminale de la PTHrP (111-139) présente quand à elle une homologie mais à un degré moindre entre les espèces alors que la partie C-terminale extrême (141-173) est spécifique à l'homme (Figure 9B).

3.2.1 Une polyprotéine aux rôles divers

Ces isoformes sont le siège d'importantes modifications post-traductionnelles. Elles contiennent en effet de nombreux sites mono- ou multi basiques (résidus K/R) qui sont des sites de protéolyse et qui vont donc être clivés par des membres de la famille des prohormones convertases tels que PC1/2/3 et la furine. Ceci va générer divers peptides biologiquement actifs qui subiront des modifications supplémentaires à savoir des O-glycosylations ou des amidations (Orloff et al., 1994). Ainsi, plusieurs formes de sécrétions de la PTHrP ont été identifiées (Figure 9B):

- Le fragment N-terminal 1-36
- Le fragment intermédiaire 38-94/95 et/ou 101
- Le fragment C-terminal 107-139
- Le fragment C-terminal spécifique à l'homme 141-173
- Des combinaisons de ces formes

Action par voie auto/paracrine

Tous ces fragments sont des peptides de sécrétion qui agissent notamment par voie auto/paracrine. En effet, de nombreuses données bibliographiques vont dans le sens d'une action locale de la PTHrP.

Le fragment 1-36 est le fragment qui confère ses propriétés *PTH-like* à la PTHrP en interagissant avec son récepteur RPTH1. L'activation de ce récepteur, qui appartient à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) est responsable de la majorité des effets connus de la PTHrP. Ces effets sont le résultat de l'activation en aval des voies de la protéine kinase A, de la phospholipase C et/ou des voies dépendantes du calcium (Mannstadt et al., 1999). Les autres fragments interagissent également avec des récepteurs mais ceux-ci n'ont pas encore été clonés à ce jour. Il a cependant été montré que le fragment C-terminal (107-139), également appelé ostéostatine, peut interagir avec les arrestines- β , connues pour réguler l'internalisation et la désensibilisation des RCPG activés par un ligand (Conlan et al., 2002; Ferrari et al., 1999). Quant aux formes de combinaison, une a par exemple été identifiée dans l'HHM où un des fragments sécrétés par les tumeurs est un fragment N-terminal contenant également la région intermédiaire et dont on ne connaît pas l'extrémité C-terminale (Suehiro et al., 1994).

Parmi les principaux rôles de ces fragments de la PTHrP agissant par voie auto/paracrine, on retrouve :

- Le transport trans-épithélial du calcium
- La myorelaxation des muscles lisses
- La résorption osseuse
- La régulation de la différenciation cellulaire
- La régulation de la prolifération cellulaire

Cette dernière propriété de la PTHrP illustre particulièrement la complexité de son action. En effet, il a été démontré des rôles opposés de la PTHrP sur la prolifération cellulaire dépendants du type cellulaire et de la voie de signalisation activée en aval de l'interaction PTHrP/RPTH1. Ainsi par exemple, alors que la PTHrP inhibe l'apoptose dans les chondrocytes via une expression de Bcl-2, elle va la stimuler dans les pneumocytes de type 2 par un mécanisme impliquant la cascade PLC et l'activité caspase 3 (Amling et al., 1997; Hastings et al., 2003).

Action par voie intracrine

Une autre voie d'action de la PTHrP est la voie intracrine. En effet, la séquence bNLS de la PTHrP lui permet d'être dirigée vers le noyau et sa localisation nucléaire a été observée dans de nombreux types cellulaires (Fiaschi-Taesch and Stewart, 2003). Cette action intracrine de la PTHrP, initialement observée dans les chondrocytes par Henderson et al (Henderson et al., 1995) qui ont montré que la PTHrP nucléaire pouvait retarder la mort cellulaire en inhibant l'apoptose dans des conditions qui normalement l'induisent (ie privation de sérum), a depuis été démontrée dans d'autres types cellulaires, normaux ou tumoraux. De façon intéressante, l'action intracrine de la PTHrP peut réguler l'apoptose en l'inhibant ou en la stimulant comme démontré dans les cellules cancéreuses de la prostate ou les cellules épithéliales intestinales IEC-6 respectivement (Tovar Sepulveda and Falzon, 2002; Ye et al., 2001). De plus, (Massfelder et al., 1997) ont montré que dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), l'action intracrine de la PTHrP induit une survie cellulaire en stimulant la prolifération *in vitro* et *in vivo*. Dans cette étude, ils ont également démontré que la séquence

NLS est nécessaire et suffisante à la localisation nucléaire de la PTHrP et que c'est la partie carboxy-terminale de la PTHrP qui est responsable de l'activité stimulatrice de la prolifération de la PTHrP. Ainsi, l'action de la PTHrP nucléaire sur la survie, de même que les mécanismes impliqués, semblent dépendants du type cellulaire considéré. Il est important de préciser que des fragments de la PTHrP ne contenant pas la séquence NLS peuvent également être dirigés vers le noyau. En effet, la séquence 66-94 est reconnue par l'importine β . La région intermédiaire contient un site de phosphorylation par CDK1/CDK2 (Figure 9B) or, une fois phosphorylée, la PTHrP est retenue dans le cytoplasme. Son action intracrine semble donc être régulée par le cycle cellulaire (Lam et al., 1999a; Lam et al., 1999b).

De plus, d'autres rôles de la PTHrP intracrine sont suggérés, notamment dans la régulation de la transcription et/ou l'organisation nucléaire. De plus, la PTHrP est capable de se lier directement à l'ARN, grâce à un motif spécifique contenu dans sa séquence bNLS, et pourrait ainsi intervenir dans la régulation du métabolisme des ARN (Aarts et al., 1999). Cependant les modes d'action précis et les cibles potentielles de la PTHrP ne sont pas connus. Notons que la présence du récepteur RPTH1 a été mise en évidence dans le noyau et qu'un système actif PTHrP/ RPTH1 pourrait donc également exister à ce niveau (Clemens et al., 2001; Fiaschi-Taesch and Stewart, 2003).

Ainsi, la PTHrP peut agir aussi bien par voie auto/paracrine que par voie intracrine et avoir dans ces deux cas de figure, des effets opposés sur la croissance cellulaire en fonction du type cellulaire considéré. Cette action paradoxale de la PTHrP apparaît d'autant plus complexe puisque qu'elle peut avoir des actions opposées sur la prolifération d'un même type cellulaire selon qu'elle agit par l'une ou l'autre de ces voies. Par exemple et comme démontré par Massfelder et al ((Massfelder et al., 1997), la PTHrP a un effet anti-mitogénique lorsqu'elle agit par voie auto/paracrine et mitogénique lorsque son action passe par la voie intracrine dans les CMLV. L'importance de la PTHrP et de ses actions biologiques est illustrée par le décès *in utero* des souris invalidées pour le gène de la PTHrP ou du RPTH1.

3.2.2 Une cytokine

Plusieurs arguments sont en faveur d'une action *cytokine-like* de la PTHrP : elle présente dans sa séquence nucléotidique des motifs communs à la famille des gènes précoces immédiats ; son ARNm a une demie-vie courte et son expression peut être induite par des facteurs de croissance tels que le TGF- β 1 et l'EGF. De plus, si elle est capable d'agir comme une

hormone, elle se comporte également comme un régulateur local de fonctions tissus-spécifiques.

En effet, dans certaines conditions physiopathologiques ou à certaines périodes de la vie, les taux de PTHrP circulante peuvent être considérablement augmentés, lui permettant ainsi d'agir comme une hormone par voie endocrine. Ceci est notamment observé :

- Au cours de la vie fœtale pendant laquelle la PTHrP sécrétée par les glandes parathyroïdiennes régule le transport transplacentaire du calcium (Strewler, 2000).
- Au cours de l'allaitement, où d'importantes quantités de PTHrP sécrétée par les glandes mammaires sont retrouvées dans le lait et susceptibles de gagner la circulation générale (Strewler, 2000).
- dans l'HHM, lorsque la PTHrP sécrétée par les tumeurs exerce ses actions hypercalcémiantes sur l'os et le tubule rénal (Strewler, 2000).
- Dans l'insuffisance rénale où des formes carboxy-terminales de la PTHrP sont retrouvées dans la circulation à des doses corrélées inversement avec la filtration glomérulaire (Orloff et al., 1993).
- Au cours du diabète insulino-dépendant où la PTHrP circulante semble impliquée dans la régulation de l'homéostasie du calcium et compense l'effet de la diminution des taux sériques de PTH observée chez les diabétiques (Ishida et al., 1993).

A contrario, et comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent, la PTHrP agit localement comme un facteur de croissance en régulant la différenciation, la croissance et la mort cellulaire de nombreux types cellulaires tels que les cellules osseuses, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisse ou les chondrocytes.

Enfin, tout comme ceux des cytokines, le gène de la PTHrP fait partie de la famille des gènes à induction précoce dont les caractéristiques sont une induction rapide et transitoire entre autres par le sérum et les facteurs de croissance (Allinson and Drucker, 1992). Ces caractéristiques sont effectivement celles de la régulation de l'expression de la PTHrP puisque l'EGF, le TGF β , l'IGF-1 et l'insuline majorent les taux d'ARNm de la PTHrP (Falzon, 1996a; Kiriyaama et al., 1993). Les effets du TGF β ont été particulièrement bien étudiés. Une majoration de l'ARNm de la PTHrP induite par le TGF β a été observée dans de nombreux types de cellules normales (kératinocytes, chondrocytes, épithélium prostatique, myomètre, endomètre) ou cancéreuses (rénales, ovariennes, squameuses orales, du sein, ostéosarcomes) (Sellers et al., 2004a; Yasui et al., 1997). L'augmentation du taux d'ARNm par le TGF β est rapide (60 min) et relève d'une double action. En effet, une augmentation de la transcription

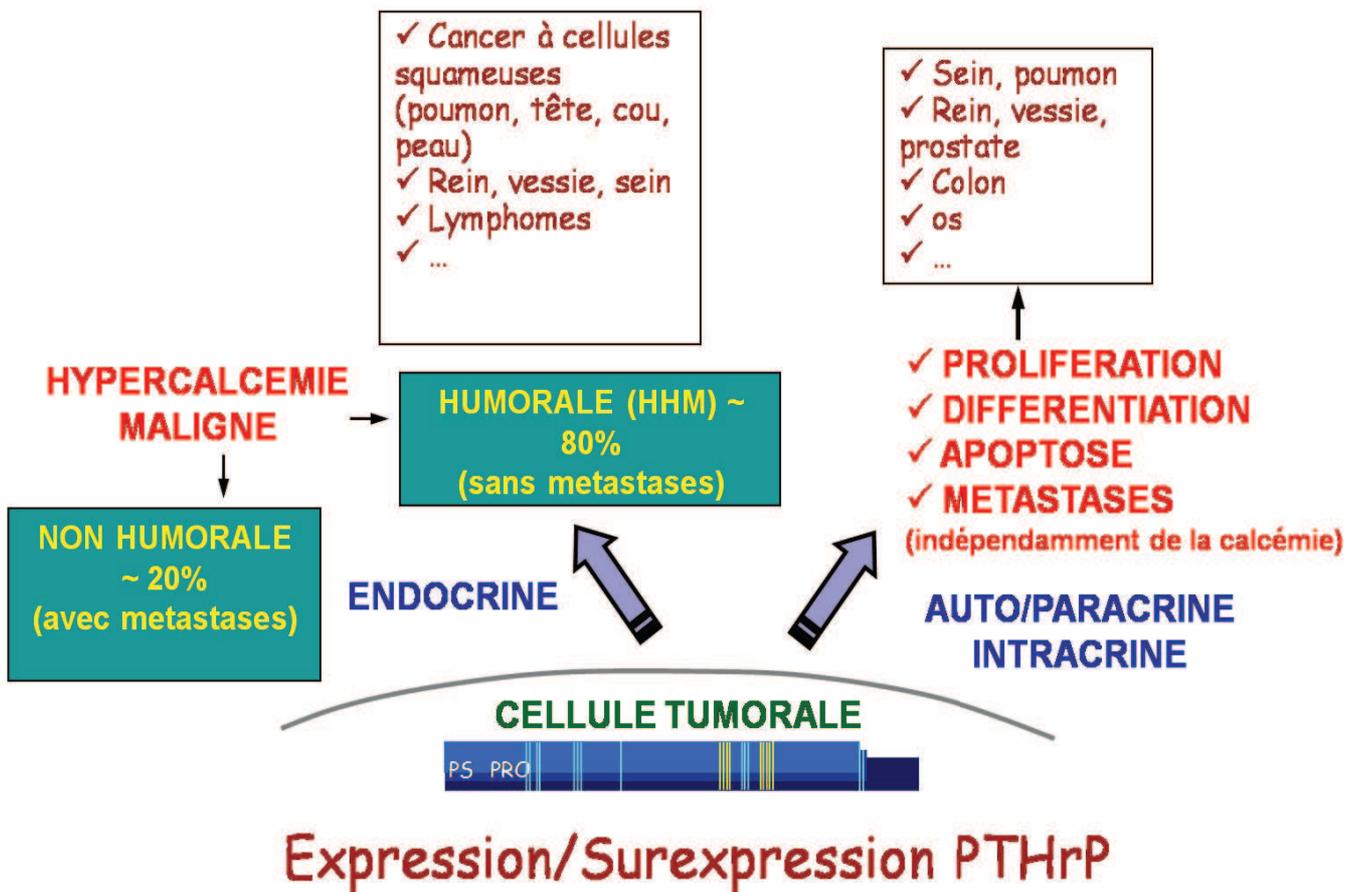


Figure 10 : Rôles de la PTHrP dans les cancers. La PTHrP est surexprimée dans de nombreux cancers. Elle est responsable du syndrome paranéoplasique d'hypercalcémie humorale maligne et favorise la croissance tumorale dans de nombreux cancers indépendamment de la calcémie. Sourbier et Massfelder, (2005)

du gène a été décrite *via* P1 et P2 sur des cellules cancéreuses squameuses (Southby et al., 1996) ou P3 sur des cellules cancéreuses du sein, mettant en jeu la voie signalétique de smad-3 en synergie avec Ets (Lindemann et al., 2001). Mais le TGF β stabilise également l'ARNm de la PTHrP, en particulier celui correspondant à l'isoforme 141 (Sellers et al., 2002). L'EGF partage avec le TGF β cette double activité sur les taux d'ARNm de la PTHrP mais stimule l'activité transcriptionnelle de P2 et P3 et stabilise l'ARNm de l'isoforme 139 (Heath et al., 1995). L'induction de l'ARNm de la PTHrP par le sérum a été décrite sur les kératinocytes, mais aussi sur les cellules musculaires lisses aortiques en culture et dans l'ostéosarcome. L'augmentation de l'ARNm de la PTHrP par le sérum est probablement due à l'interaction du sérum avec des « SRE » (*serum response element*) présents dans la région promotrice du gène de la PTHrP, mais une augmentation de la stabilité de l'ARNm a elle aussi été rapportée (Falzon, 1996b).

3.3 PTHrP et cancers

Diverses études menées chez le rat ou la souris ont démontré des propriétés de la PTHrP l'impliquant dans le développement et la croissance tumorale :

- Elle favorise l'incidence de la formation de tumeurs mammaires et de la peau chez la souris (Manenti et al., 2000; Wysolmerski et al., 1996).
- Son inhibition par ARN-antisens dans les cellules cancéreuses de Leydig H-500 diminue la taille des tumeurs formées par ces cellules lorsqu'elles sont inoculées chez le rat (Rabbani et al., 1995)
- Son inhibition par un anticorps spécifique chez la souris nude porteuse de cancer du sein métastasé à l'os ou de carcinome à cellules rénales en sous-cutané, supprime la croissance des tumeurs et le développement des lésions ostéolytiques (Guise et al., 1996; Massfelder et al., 2004).
- Les cellules de cancer de la prostate surexprimant la PTHrP ont une croissance plus rapide que les cellules contrôle chez le rat MatLyLu (Dougherty et al., 1999).

La pertinence de ces études est illustrée par le fait que la PTHrP est fréquemment surexprimée ou hypersécrétée dans de nombreux cancers dont les CCR. Pour exemples, il a été montré qu'elle est surexprimée dans 60% des cancers du sein, plus de 50% des cancers du poumon, 90% des cancers du colon et la quasi-totalité des cancers de la prostate. De plus, la

PTHrP semble jouer un rôle important dans la formation des métastases osseuses. En effet, *in vivo*, 92% des métastases osseuses de cancer du sein expriment la PTHrP contre 17% des métastases non-osseuses (Liao and McCauley, 2006).

Les études menées sur le rôle de la PTHrP dans ces cancers ont montré qu'elle stimule l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire et/ou l'apoptose et que ces effets sont le résultat de l'interaction de la PTHrP avec son récepteur RPTH1 et/ou de son action intracrine.

3.3.1 PTHrP et survie cellulaire

Dans les cancers, l'action de la PTHrP sur la survie cellulaire passe tout d'abord par son action auto/paracrine. Ceci est démontré par l'étude de Hoey et al (Hoey et al., 2003) qui montre que l'action mitogénique de la PTHrP sur les cellules de cancer du sein MCF-7 est augmentée quand le récepteur RPTH1 est surexprimé. De plus, l'expression de ce récepteur dans ces mêmes cellules est corrélée à l'expression du marqueur de prolifération Ki67 (Downey et al., 1997). Toujours dans ces cellules MCF-7, Birch et al (Birch et al., 1995) ont montré que la PTHrP 1-34 induit la prolifération cellulaire et une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Ce même peptide est capable de stimuler la croissance des cellules cancéreuses de la prostate PC-3 et LnCaP (Asadi et al., 2001) et des cellules cancéreuses du poumon BEN-57 (Burton and Knight, 1992). Dans ces dernières, cet effet passe par une inhibition de l'apoptose et est également observé avec la PTHrP 140-173. Enfin, au laboratoire, il a été montré que l'effet de la PTHrP sur la prolifération des tumeurs de CCC chez la souris nude pouvait être inhibé soit par un anticorps anti-PTHrP soit par un antagoniste du récepteur RPTH1.

Cependant, il est important de noter que la PTHrP peut également stimuler la survie cellulaire par la voie intracrine. Ceci a par exemple été démontré dans les cellules MCF-7 où la PTHrP inhibe l'apoptose via une surexpression de Bcl-2 en agissant par voie intracrine (Tovar Sepulveda and Falzon, 2002). Ainsi, toutes ces études démontrent que la PTHrP, en agissant par voie auto/paracrine et/ou intracrine est un facteur de survie cellulaire des cellules cancéreuses, et que cette propriété peut être due à une augmentation de la prolifération cellulaire ou à une inhibition de l'apoptose (Figure 10).

3.3.2 PTHrP et invasion

Pour que des cellules cancéreuses acquièrent un phénotype invasif, il est nécessaire qu'il y ait un dérèglement simultané de protéines impliquées dans l'adhésion, la migration et la protéolyse de la MEC (Price et al., 1997), or il a été démontré que la PTHrP interfère avec l'expression de certaines de ces protéines.

Dans les cellules MCF-7 et PC-3, la surexpression de PTHrP induit l'expression de nombreuses intégrines, notamment les intégrines $\alpha 6$ et $\beta 4$ dont l'expression élevée est corrélée au pouvoir invasif des cellules (Shen and Falzon, 2003; Shen et al., 2004). Cette propriété de la PTHrP nécessite l'intégrité de sa séquence NLS, suggérant que la PTHrP régule l'invasion des cellules cancéreuses par voie intracrine. Cependant, d'autres études ont montré des effets de la PTHrP sur l'invasion et l'expression de protéines impliquées dans ce processus, lorsqu'elle est ajoutée en exogène. Ainsi, les fragments (1-141) et (1-84) induisent l'expression des métalloprotéases MMP2, MMP3 et MMP9 dans les chondrocytes (Kawashima-Ohya et al., 1998) alors que dans les cellules cancéreuses du sein 8701-BC, la PTHrP (67-86) augmente l'invasion et l'expression du uPA (*urokinase plasminogen activator*), une sérine protéase impliquée dans la dégradation de la MEC (Luparello et al., 2003). A contrario, la PTHrP (38-94) semble inhiber la dégradation de la MEC dans certaines lignées cellulaires de cancer du sein (Luparello et al., 2001). Enfin, d'après une étude de (Manenti et al., 2000), il semble que la PTHrP carboxy-terminale soit également impliquée dans l'invasion (Figure 10)

3.3.3 Expression de la PTHrP dans les cancers

Comme déjà mentionné plus haut, le gène de la PTHrP est régulé aux niveaux transcriptionnels et/ou post-transcriptionnels par divers facteurs. Or, de manière intéressante, nombreux sont les facteurs qui induisent une expression de la PTHrP et qui sont également impliqués dans la cancérogénèse. Pour n'en citer que quelques-uns, nous retiendrons par exemple NF κ B, capable de se lier sur le promoteur P2 et d'induire son activité dans les leucémies lymphocytaires à cellules T (Nadella et al., 2007), ou TGF- β 1 et EGF déjà mentionnés. De façon intéressante, il a également été montré une régulation au niveau du profil d'expression des isoformes de l'ARNm de la PTHrP dans différents cancers. Ainsi par exemple, alors que seule l'isoforme 141 est exprimée dans le poumon sain, on retrouve les 3 isoformes dans les tissus tumoraux correspondants (Sellers et al., 2004b). De même dans le cancer du sein, où il semble que l'isoforme 139 soit fréquemment prédominant et que son

expression soit corrélée avec le développement de métastases osseuses (Bouizar et al., 1999). Cette différence d'expression est due, du moins en partie, à une régulation différentielle de la stabilité de ces différentes isoformes d'ARNm par les facteurs de croissance. Rappelons en effet que l'EGF intervient dans la stabilisation de l'isoforme 139 et le TGF- β 1 dans celle de l'isoforme 141.

Ainsi, les propriétés de facteur de survie de la PTHrP, associées à la modulation complexe de son expression par les facteurs de croissance et/ou angiogéniques, argumentent un rôle majeur pour la PTHrP dans la régulation du développement tumoral.

3.4 PTHrP et CCC

Le rein est une cible privilégiée des actions de la PTHrP dont l'expression a été observée dans les cellules musculaires lisses de l'arbre artériel pré- et post- glomérulaire, ainsi que dans les cellules endothéliales, les podocytes, les cellules épithéliales pariétales, les cellules des tubes proximaux et distaux et les tubes collecteurs (Clemens et al., 2001; Esbrit and Egido, 2000). En 1993, Gotoh et al (Gotoh et al., 1993) ont montré que la PTHrP est exprimée dans 95% des tumeurs de patients atteints de CCR, et que cette expression est notamment élevée dans les CCC, et ce quelle que soit la calcémie. Cette observation, associée au fait que la PTHrP a été identifiée comme un facteur stimulant la prolifération des cellules des tubules proximaux, à partir desquelles se développent les CCC, a conduit à émettre l'hypothèse qu'en plus de son rôle dans l'HHM, la PTHrP pouvait être impliquée dans la croissance cellulaire des CCC. Une première étude de Burton et al (Burton et al., 1990), a effectivement démontré que la croissance cellulaire de la lignée de CCC SKRC-1, qui sécrète un fort taux de PTHrP, est significativement inhibée après traitement par un antiserum PTHrP ou par un antagoniste du récepteur RPTH1.

Cet aspect de la PTHrP a été étudié par le laboratoire au sein duquel j'ai effectué ma thèse. Leurs résultats ont démontré plusieurs propriétés très intéressantes de la PTHrP dans le CCC (Massfelder et al., 2004; Talon et al., 2006).

3.4.1 Un facteur de survie

Les études menées au laboratoire ont démontré que la PTHrP joue un rôle crucial dans la croissance du CCC *in vitro* et *in vivo*. En effet, les travaux réalisés ont tout d'abord montré que l'inhibition de la PTHrP par un anticorps anti-PTHrP ou un antagoniste du récepteur

RPTH1 inhibait considérablement la croissance *in vitro* de 3 lignées cellulaires de CCC déficientes en VHL (786-0 ; UOK-126 et UOK-128) et ce, par une augmentation de l'apoptose. *In vivo*, chez la souris nude xénotransgénée en sous-cutanée, le traitement par un anticorps anti-PTHrP dirigé contre la partie N-terminale de la protéine entraîne une régression complète des tumeurs de 786-0 dans 70% des souris, et ce toujours via une induction de l'apoptose. Dans ce même modèle, le traitement par un antagoniste du récepteur RPTH1 n'entraînait pas de régression mais empêchait la croissance de ces tumeurs, encore une fois en stimulant l'apoptose. Ces résultats ont depuis été confirmés dans des cellules de CCC exprimant un VHL sauvage.

Ainsi, il apparaît que la PTHrP est un facteur de survie essentiel au CCC indépendamment du statut en VHL, et que cette dernière agit principalement par la voie auto/paracrine pour inhiber l'apoptose. Cependant, les effets obtenus par l'antagoniste du récepteur étant moindre que ceux obtenus avec le blocage de la PTHrP par un anticorps suggèrent que l'interaction PTHrP/RPTH1 n'est pas seule responsable de l'effet de la PTHrP

3.4.2 Un facteur antiangiogénique

De façon intéressante, il a été observé lors des études chez la souris nude xénotransgénée, que l'inhibition du système PTHrP/RPTH1 entraîne une augmentation de la densité microvasculaire des tumeurs, suggérant un rôle anti-angiogénique de la PTHrP dans le CCC. Ceci est en accord avec de précédentes observations qui ont montré des propriétés anti-angiogéniques de la PTHrP mettant en jeu l'activité de la protéine kinase A qui, à son tour, réduit l'activité de la petite GTPase Ras (Bakre et al., 2002). Notons cependant que la PTHrP peut également agir comme facteur angiogénique dans d'autres types cellulaires (Akino et al., 2000). De façon intéressante, il a été proposé dans le CCC, qu'une diminution de la densité microvasculaire est associée au développement de vaisseaux plus importants qui facilitent l'évolution métastatique (Delahunt et al., 1997). Ainsi, l'effet pro-angiogénique de blocage du système PTHrP/RPTH1 pourrait apporter un bénéfice thérapeutique supplémentaire à l'induction de l'apoptose des cellules tumorales.

3.4.3 Une cible du VHL

Au cours de ces travaux, il a également été montré que la PTHrP est une nouvelle cible du VHL qui régule négativement son expression. En effet, la réintroduction d'un VHL sauvage dans les cellules 786-0 déficientes pour le VHL diminue l'expression de la PTHrP tant au niveau de la protéine et de l'ARNm. Cette régulation ne se fait pas via une activation de la

transcription mais passe en réalité par une stabilisation des ARNm de la PTHrP en l'absence de VHL. En effet, la demie-vie de l'ARNm de la PTHrP, est diminuée de 50% sous l'effet du VHL, passant d'environ 40h à 20h dans les cellules 786-0 transfectées par un vecteur vide ou par un vecteur codant pour un VHL sauvage respectivement. De façon intéressante, il apparaît donc que la PTHrP est également une cible du système VHL/HIF et qu'elle est régulée exclusivement de façon post-transcriptionnelle par ce système, tout comme les TGF- α et β .

Ainsi, la PTHrP apparaît comme un acteur majeur de la survie cellulaire des CCC et constitue une cible thérapeutique potentielle tout à fait intéressante.

4- La stabilité des ARN messagers

4.1 Un mécanisme majeur de régulation post-transcriptionnelle

La régulation de l'expression des gènes est un processus essentiel au maintien de l'homéostasie des organismes de par son importance dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de la réponse aux stimuli externes.

S'il est admis depuis longtemps que la régulation de la transcription des gènes a une influence directe sur l'expression des protéines, et qu'elle constitue un des principaux mécanismes de régulation de l'expression génique, des modes de régulation post-transcriptionnelle en aval existent et ne doivent pas être négligés. Ils interviennent notamment dans la maturation des ARNm, dans leur transport intracellulaire, la régulation de leur traduction et enfin dans leur stabilité et leur turn-over, autant de processus clés dans la vie d'un ARNm (Dreyfuss et al., 1996) (Figure 11A). En effet, la transcription des gènes ne produit pas directement des ARNm matures mais des transcrits hnRNA (heterogeneous nuclear RNA), ou pré-messagers qui contiennent les introns ainsi que les exons codant pour les protéines. Ces transcrits vont donc subir un épissage par le spliceosome, un complexe macromoléculaire catalysant l'excision des introns. Pour certains transcrits, cet épissage sera alternatif, c'est-à-dire qu'il y aura une variations au niveau des exons finalement contenus dans l'ARNm mature. Ce processus permet d'obtenir, à partir d'un seul et unique gène, plusieurs isoformes d'une même protéine et/ou plusieurs isoformes d'ARNm selon que l'épissage alternatif incorpore différenciellement des exons portant des séquences codantes et/ou non traduites, respectivement (Kim et al., 2008; Zhang et al., 2004). Enfin, avant d'être traduits, ces ARNm matures vont se complexer avec des facteurs de liaison à l'ARN de façon à être exportés vers le cytoplasme via les pores nucléaires. Une fois dans le cytoplasme, l'ARNm mature pourra être traduit puis sera finalement dégradé, notamment par l'exosome, après une période plus ou moins longue définie par la durée de sa demi-vie et donc de sa stabilité. Cette demi-vie, différente d'un ARNm à un autre, peut également varier pour un même ARNm en réponse à diverses stimuli tels que les facteurs environnementaux, des facteurs de croissance, ou des hormones. Ainsi par exemple, la demi-vie de l'ARNm du VEGF normalement d'une quarantaine de minutes en conditions normoxiques, peut passer à près de 106min en conditions hypoxiques (Levy et al., 1996). De la même manière, c-myc peut voir la demi-vie de son ARNm diminuer jusqu'à 4 fois sous l'effet de l'ester de phorbol

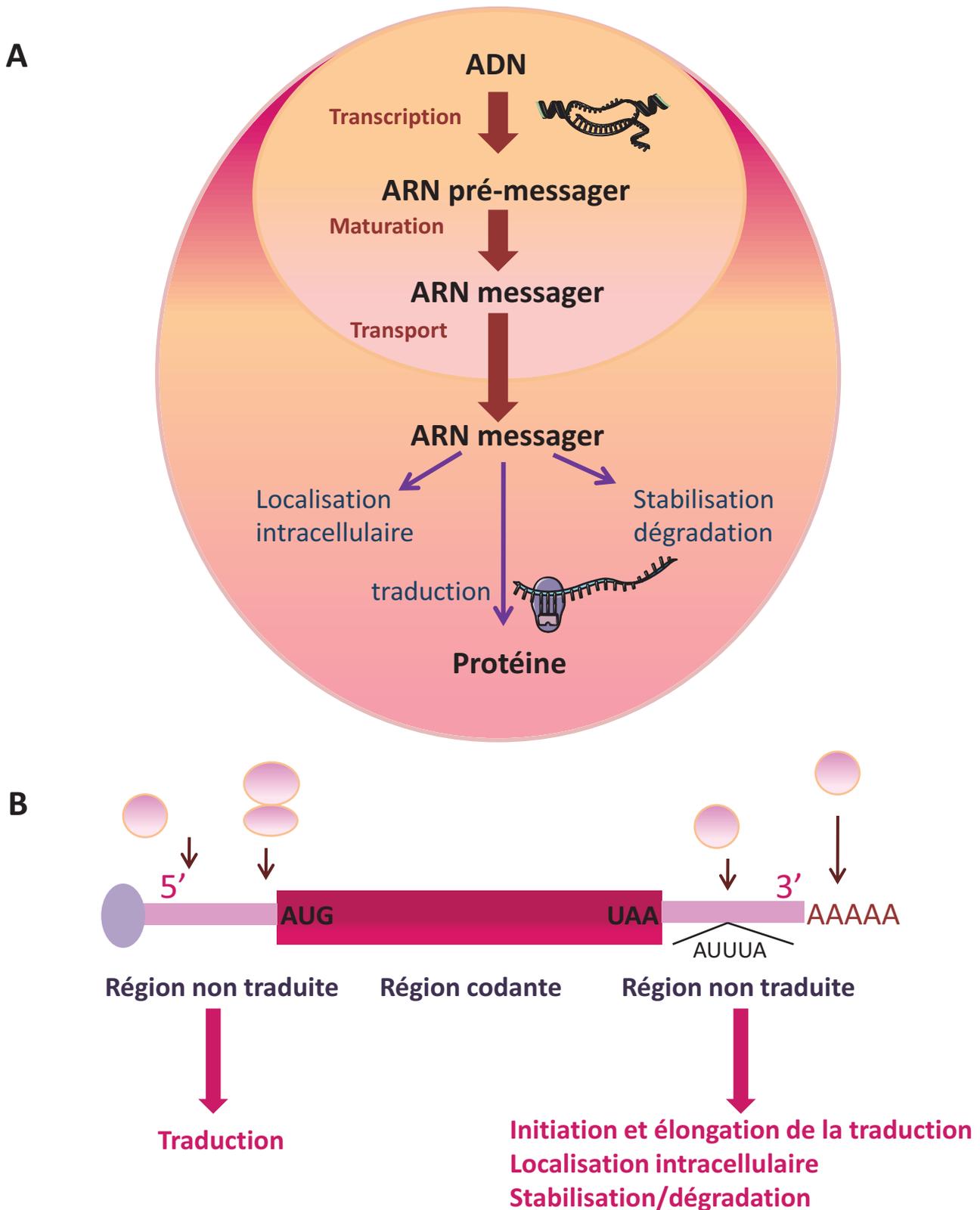


Figure 11 : A. Les différentes étapes de l'expression des ARNm contrôlées par leurs régions non traduites. Après transcription des gènes, maturation et transport hors du noyau des ARNm, les extrémités 5' et 3' non traduites interviennent et dirigent l'expression des ARNm au cours des trois étapes suivantes : (1) l'adressage intracytoplasmique des ARNm, (2) le contrôle de leur traduction et (3) leur stabilisation ou leur dégradation. **B. Mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle relayée par les régions non traduites des ARNm.** Les fonctions de régulation des régions non traduites sont le fruit d'interactions avec des protéines régulatrices agissant en *trans*.

TPA (Brewer and Ross, 1989). C'est à ce niveau de régulation en particulier que nous allons nous intéresser.

De nombreuses études menées depuis une vingtaine d'années ont mis en lumière l'importance du rôle de la stabilité des ARNm. En effet, si la régulation transcriptionnelle permet de réguler le taux *de novo* d'ARNm et par conséquent le nombre de matrices disponibles pour la traduction de protéines, leur stabilité détermine la période pendant laquelle ceux-ci sont disponibles pour la traduction et donc la quantité de protéines qui pourra être produite à partir de chacun de ces messagers. La régulation de la demi-vie des ARNm joue donc un rôle au moins aussi important que la régulation transcriptionnelle. La pertinence clinique de cette régulation post-transcriptionnelle via la régulation de la stabilité des messagers est illustrée par diverses pathologies associées à des mutations dans les séquences en *cis* ou des dysfonctionnements des protéines agissant en *trans* et sur lesquelles nous reviendrons plus tard.

4.2 Mécanisme de cette régulation

A l'image du contrôle de la transcription et de la traduction, la régulation de la demi-vie (et donc de la stabilité) des ARNm est en réalité un processus finement régulé faisant intervenir des séquences en *cis*, cibles de facteurs agissant en *trans* : les protéines de stabilisation/déstabilisation de l'ARNm (Figure 11B).

4.2.1 Les éléments en cis

Les éléments agissant en *cis* dans la régulation de la stabilité des ARNm sont des séquences contenues dans les régions non traduites des ARNm, les régions UTR, qui peuvent se trouver en 5' ou en 3' des séquences codantes. Ce sont ces éléments qui interviennent dans la détermination de la demi-vie basale d'un ARNm, de sa stabilisation ou sa déstabilisation en réponse à différents stimuli, et parfois même de la manière dont il sera dégradé (Eberhardt et al., 2007). Les nombreuses études visant à caractériser ces éléments agissant en *cis* en ont identifié un grand nombre. Quelques exemples sont répertoriés dans le tableau ci-dessous. Ils sont le plus souvent situés dans les régions 3'UTR. En ce qui nous concerne, nous allons nous intéresser tout particulièrement aux éléments riches en AU (Luparello et al.) qui sont les plus répandues.

ARE : Ces régions consensus riches en AU ont initialement été identifiées dans les régions 3'UTR des l'ARNm du TNF chez l'homme et la souris ainsi que dans les ARNm de la lymphotoxine, du CSF (colony stimulating factor), de l'interleukine-1 et de la fibronectin (Caput et al., 1986). Elles ont été décrites pour la première fois en 1986 par (Shaw and Kamen, 1986) comme des éléments déstabilisateurs de l'ARNm. Ces auteurs ont en effet constaté qu'en introduisant une séquence AU de 51 nucléotides issue du gène GM-CSF humain dans la région 3'UTR de l'ARNm de la globine β de rat, cet ARNm normalement très stable se trouvait considérablement déstabilisé. Les ARE ont depuis été identifiées dans les régions 3'UTR d'un grand nombre d'ARNm aux demi-vies courtes incluant entre autres des ARNm codant pour des cytokines, des proto-oncogènes, des médiateurs de l'inflammation ou encore des facteurs de croissance (Eberhardt et al., 2007) (Tableau 6). Ce sont des séquences nucléotidiques longues de 50 à 150 nucléotides riches en A-U, qui ont été divisées en 3 classes (Chen and Shyu, 1994, 1995). Les ARE de classe I contiennent plusieurs copies dispersées du motif pentamérique AUUUA dans un environnement riche en U. Celle de classe II comportent au moins 2 nonamères UUAUUUA(U/A)(A/U) qui se chevauchent, quant à celles de classe III, elles sont moins bien caractérisées. Ce sont des régions riches en U mais qui ne contiennent pas le motif pentamérique AUUUA. Il est intéressant de noter que la plupart des ARNm contenant des ARE de classe II codent pour des cytokines alors que les protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire contiennent majoritairement des ARE de classe I et parfois de classe III (Tableau 6). Ainsi, bien que les ARE n'aient pas été classées en fonction de leur activité biologique, il est possible qu'elles regroupent ensemble des ARNm contrôlés par des voies de signalisation similaires ou des ARNm codant pour des protéines aux fonctions associées.

4.2.2 Les facteurs agissant en trans

Les études de REMSA (*RNA electrophoretic mobility shift assay*) et d'UV cross-linking ARN-protéines ont permis d'identifier plus d'une quinzaine de protéines capables d'interagir avec les AREs. Cependant, seules quelques unes d'entre elles ont été identifiées comme jouant réellement un rôle dans la stabilité des ARNm avec lesquels elles interagissent. Voici les principales protéines de liaison aux ARE intervenant dans la régulation de la stabilité des ARNm :

- **Les protéines de la famille Hu :** ces protéines, au nombre de 4 (HuR/HuA ; HEL-N1 ; HuC et HuD) font partie de la super famille des protéines ELAV (*Drosophila*

embryonic lethal abnormal vision)-like (Antic and Keene, 1997). HuR est une protéine ubiquitaire, contrairement aux 3 autres dont l'expression est presque exclusivement limitée aux neurones. Ces protéines sont très conservées et comportent 3 domaines de liaison à l'ARN RRM (RNA recognition motif), 2 dans leur domaine N-terminal et 1 dans leur domaine C-terminal, les deux domaines étant séparés d'une région charnière de 50 à 70 acides aminés peu conservés (Lopez de Silanes et al., 2005; Sakai et al., 1999). Les protéines Hu ciblent les ARE de classe I, II ou III indifféremment. Elles sont principalement nucléaires mais peuvent également passer dans le cytoplasme, où elles ont alors pour effet de stabiliser les ARNm cibles auxquels elles sont liées (Chen et al., 2002; Fan and Steitz, 1998). Ce déplacement vers le cytoplasme est favorisé par divers stimuli .

- **La tristetraproline (TTP) :** cette protéine est la représentante de la petite famille des protéines à doigt de zinc CCCH (Cys-Cys-Cys-His). Elle est majoritairement cytoplasmique et entraîne la destabilisation de ses ARNm cibles en favorisant leur dégradation. De façon intéressante, elle cible exclusivement des ARE de classe II (Blackshear, 2002; Cao et al., 2004).

- **Les protéines AUF-1 «A+U-rich-element RNA-binding factor 1» :** il en existe 4 isoformes différentes nommées d'après leur taille p37, p40, p42 et p45 et comportent 2 RRM dans leur domaine N-terminal (Wagner et al., 1998). Elles se lient aux ARE de classe I et II et sont majoritairement nucléaires mais sont déplacées vers le cytoplasme pour jouer leur rôle qui peut être stabilisateur et/ou destabilisateur en fonction des isoformes impliquées et du type cellulaire (Xu et al., 2001).

4.2.3 Interaction des éléments cis et trans

L'interaction entre les protéines de liaison aux AREs et les AREs nécessite une reconnaissance de la structure primaire des ARNm cibles mais est également dépendante de structures secondaires telles que les tige-boucles. Les propriétés stabilisatrices ou destabilisatrices qui découlent de ces interactions dépendent respectivement de la capacité des protéines de liaison à inhiber ou à favoriser la dégradation des ARNm cibles. Les mécanismes impliqués sont loin d'être totalement élucidés mais semblent complexes et divers. Ainsi, il a par exemple été démontré que les ARNm contenant des AREs sont cibles de dégradation par l'exosome mais que ce dernier est incapable d'interagir directement avec ces ARNm. Il ne peut les reconnaître que par l'intermédiaire de protéines interagissant avec les AREs, ce qui

Famille	Gènes régulés	Classe d'ARE dans leur région 3'UTR
<i>Cytokines, chemikines et facteurs de croissance</i>	VEGF INF- $\alpha/\beta/\gamma$ IL-1 $\beta/2/3/6/8/10$ GM-CSF TNF- α/β	Classe I (γ) et IIB (α) IIC (β) Classe IIC (2 ;3) Classe IIA Classe IIA (α) et IIC (β)
<i>Proto-oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs régulateurs du cycle cellulaire</i>	Bcl-2 c-fos c-jun c-myc CyclinA/B/D1 P21 PTH P53	ARE Classe IIC ARE Classe I Classe III Classe I Classe I Classe I Classe III
<i>Enzymes et protéines de la matrice extracellulaire</i>	COX-2 uPA Urokinase PAI-1/2 iNOS	Classe IIC Classe I Classe I
<i>Récepteurs et protéines membranaires</i>	Récepteur à l'angiotensine II Récepteur aux androgènes EGFR GLUT-1	Classe III
<i>Divers</i>	HIF-1 α Hsp70	Classe III

Tableau 6 : Liste non exhaustive de gènes régulés via les AREs.

laisse imaginer que des protéines déstabilisatrices favorisent la dégradation des ARNm en recrutant l'exosome alors que les protéines stabilisatrices en seraient incapables (Chen et al., 2001). En accord avec cette hypothèse que les protéines déstabilisatrices accélèrent la dégradation des ARNm en favorisant leur reconnaissance par des protéines de dégradation, il a été montré que TTP peut interagir *in vitro* avec l'exosome et la PARN (poly(A) déanylase ribonucléase) (Chen et al., 2001; Lai et al., 2003). Un autre modèle proposé est que l'interaction des protéines avec les AREs engendre un remodelage de structures locales des ARNm, favorisant ainsi leur liaison d'autres facteurs agissant en trans tels que des ribonucléases. (Wilson et al., 2001). Enfin, une observation intéressante dans le cas des protéines Hu est qu'elles reconnaissent les ARE via leurs 2 premiers RRM alors que le 3^{ème} RRM reconnaît la queue poly(A) (Ma et al., 1997). Ceci laisse supposer que la liaison de ces protéines Hu sur les ARNm les stabiliserait en inhibant leur déanylation.

Ainsi, la stabilisation/déstabilisation des ARNm contenant des ARE apparaît complexe et implique divers mécanismes. La complexité de cette régulation est d'autant plus illustrée par le fait qu'un même ARNm peut être la cible à la fois de protéines stabilisatrices et déstabilisatrices comme démontré par Lal et al (Lal et al., 2004) dans le cas des ARNm de p21 et de la cyclin D1 sur lesquels HuR et AUF-1 peuvent se lier. Ainsi, la durée de la demi-vie basale ou régulée d'un ARNm peut être le résultat d'interactions concertées de plusieurs éléments en cis distribués tout au long des régions UTR d'un ARNm.

Il est également important de noter que les protéines de liaison aux AREs sont dans certains cas capables de réguler la traduction des ARNm cibles. Ainsi, il a par exemple été montré que la liaison de HuR en 3'UTR de l'ARNm de p53 est positivement corrélée à une augmentation de la traduction de ce même ARN (Mazan-Mamczarz et al., 2003). Inversement, une surexpression de HuR chez la souris peut empêcher la réponse inflammatoire *in vivo* en inhibant la traduction de cytokines (Katsanou et al., 2005).

4.3 Gènes régulés par les ARE et mécanismes de régulation

Cette régulation de la stabilité des ARNm par les ARE permet un fin contrôle des réponses cellulaires aux divers signaux intra- et extracellulaires lors des variations des conditions environnementales. Ceci notamment grâce au fait que de ARE sont présentes dans un grand nombre d'ARNm codant pour des protéines régulatrices intervenant dans divers mécanismes. La plupart de ces ARNm ont des demi-vies courtes et codent pour des gènes de réponse

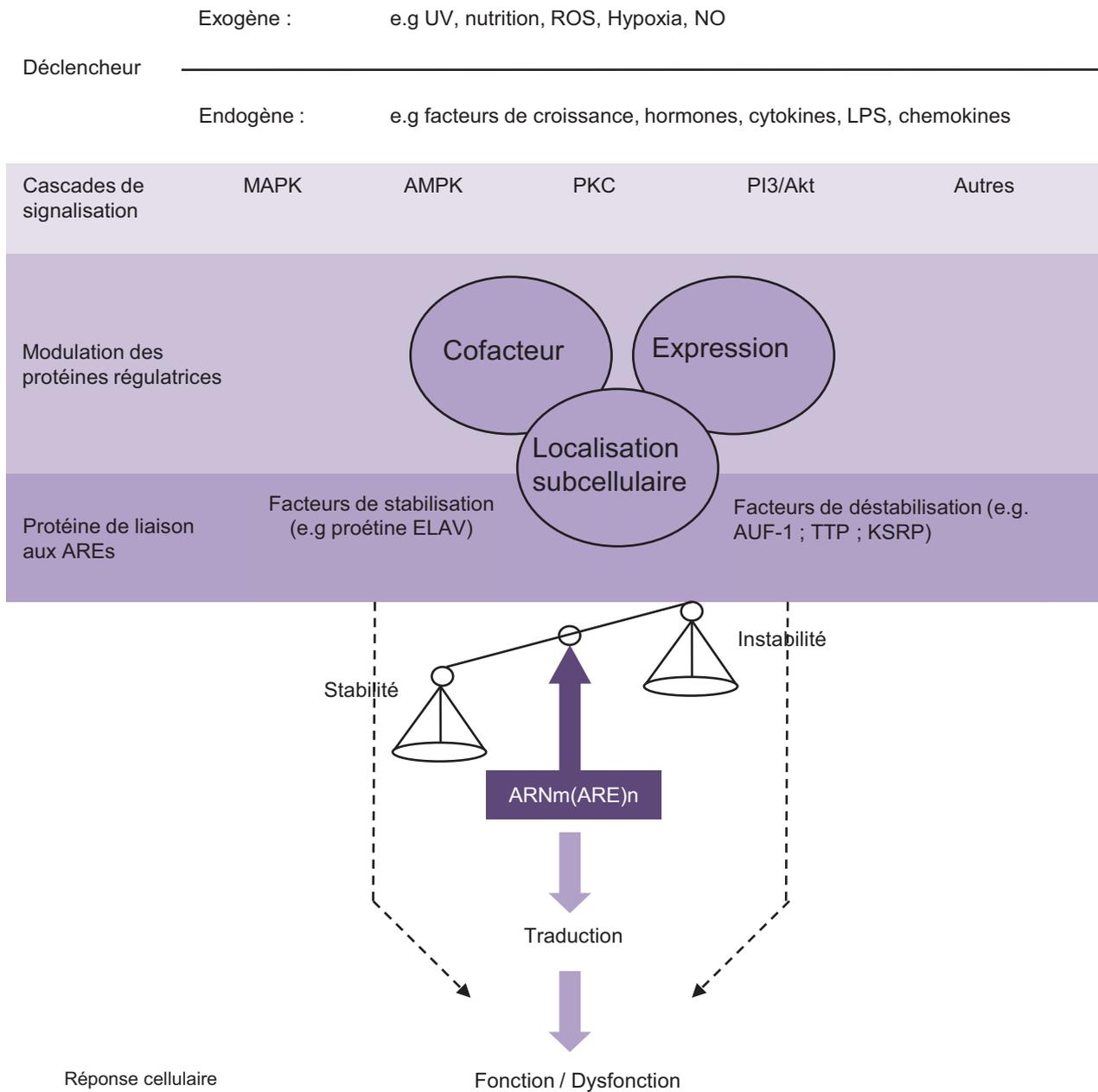


Figure 12 : Voies de signalisation et facteurs de régulation de la stabilité des ARNm via les ARES. D'après Eberhardt et al (2007)

précoce (Eberhardt et al., 2007). Une liste non exhaustive des gènes régulés par les ARE est présentée dans le tableau 6.

Cette grande diversité de gènes dont l'expression est régulée par la stabilité de leurs ARNm, permet à la cellule de répondre rapidement à divers stimuli. Ces stimuli qui ont une influence sur la stabilité des messagers sont très nombreux et la liste ne cesse d'augmenter. On distingue les stimuli intrinsèques que sont les cytokines, les facteurs de croissance, les hormones et les médiateurs du stress cellulaire, des stimuli environnementaux tels que l'hypoxie, les chocs thermiques ou la privation en nutriments (DiDomenico et al., 1982; Guhaniyogi and Brewer, 2001).

Les effets de ces stimuli convergent tous vers quelques cascades de signalisation qui vont induire un grand nombre de signaux capables de réguler les différentes protéines de liaison aux AREs (Eberhardt et al., 2007). Les principales voies de signalisation impliquées sont les voies des MAP kinase, de l'AMPK, de la PKC et de la PI3K/Akt. Si les événements moléculaires par lesquels ces cascades de signalisation régulent la stabilité des ARNm sont peu connus, on distingue 3 modes de régulation (Figure 12) :

- Une régulation de l'expression des protéines stabilisatrices/déstabilisatrices
- Des altérations de l'affinité de ces protéines pour les AREs
- Une modification de leur localisation subcellulaire

4.4 Pertinence clinique : stabilité des ARNm et cancer.

La dérégulation de l'expression génique est un point commun des cellules cancéreuses qui acquièrent ainsi un nouveau profil d'expression des protéines leur permettant de prendre le pas sur les cellules saines. Au regard des gènes régulés via les AREs et des voies de signalisation impliquées dans la régulation des protéines de liaison aux AREs, de nombreuses études se sont intéressées à la stabilité des ARNm dans les cancers et il est aujourd'hui bien établi que la régulation de la stabilité des ARNm est un mécanisme largement impliqué dans l'acquisition et le maintien du phénotype tumoral des cellules cancéreuses. En effet, on s'aperçoit que de nombreux ARNm codant pour des proto-oncogènes, des facteurs de croissance ou encore des facteurs angiogéniques sont anormalement stabilisés dans de nombreuses tumeurs (Benjamin and Moroni, 2007). C'est par exemple de cas des interleukines, des cyclines, du VEGF ou encore du TGF- β . L'augmentation de la demi-vie de

ces ARNm peut être due à des mutations des séquences en cis comme dans les myélomes et les leucémies à cellules T, où la mutation de *c-myc* par translocation ou perte de sa région 3'UTR rend son ARNm jusqu'à 7 fois plus stable (Aghib et al., 1990; Hollis et al., 1988). Une autre cause peut être une expression anormalement élevée des protéines de liaison, c'est ce qui est observé dans les tumeurs du cerveau où HuR est exprimé constitutivement et stabilise entre autres les ARNm du VEGF, de COX-2 et du TNF- α (Nabors et al., 2001).

5- Objectifs

Dans un contexte bibliographique où il est établi que le VHL est l'acteur majeur de la régulation des facteurs HIF et que ce système VHL/HIF régule de façon transcriptionnelle et/ou post-transcriptionnelle de nombreuses molécules dont des facteurs de croissance largement impliqués dans la croissance tumorale, mes travaux de thèses s'inscrivent dans la continuité des travaux récents du laboratoire identifiant la PTHrP comme un facteur de survie essentiel du CCC humain et comme une cible du gène suppresseur de tumeur VHL qui régule la stabilité de son ARNm.

A partir de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la régulation post-transcriptionnelle de la PTHrP et d'autres cibles comme le VEGF ou le TGF- β par le système VHL/HIF, ferait intervenir des protéines stabilisatrices/déstabilisatrices de l'ARNm qui seraient elles-mêmes des cibles du système VHL/HIF. L'objectif de ma thèse était donc d'identifier ces protéines pour étudier leur impact sur la croissance cellulaire du CCC.

Sachant que la PTHrP est exprimée en 3 isoformes de 139,141 et 173 acides aminés et que les ARNm à l'origine de ces isoformes possèdent des régions 3'UTR différentes mais qui toutes portent des séquences AUUUA intervenant dans la régulation de la stabilité des messagers, le premier objectif était d'étudier l'expression de ces isoformes dans le CCC humain *in vitro* et *in vivo*. Une fois ce profil d'expression établi, les objectifs étaient d'identifier les protéines de liaison à l'ARNm de la PTHrP, de vérifier leur implication dans la régulation de la stabilité d'autres ARNm cibles du système VHL/HIF et d'étudier leur impact sur la croissance cellulaire du CCC.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1 - Matériel

1.1 Lignées cellulaires

Nous avons utilisé sept lignées humaines de CCC soit déficientes en VHL (lignées 786-0, UOK-126, UOK-128 et A498) soit exprimant un VHL sauvage (lignées ACHN, Caki-1 et Caki-2). L'ensemble de ces lignées a été obtenu chez ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA), à l'exception des lignées UOK-126 et UOK-128 qui nous ont été généreusement fournies par le Dr Patrick Anglard de l'U575 (Strasbourg, France). Nous avons également utilisé des clones de cellules 786-0 transfectées par une construction pCR3.1-Uni codant pour le VHL(1-213) humain, par cette même construction codant pour le Δ VHL(1-116) humain, ou par le vecteur seul. Ces clones étaient déjà disponibles au laboratoire. Toutes les lignées sont maintenues dans du milieu DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle Medium », Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (FBS, Invitrogen) et d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline, 100 U/ml et streptomycine, 0.1 mg/ml ; Invitrogen). Pour les cellules 786-0 transfectées, 500 μ g/ml de G-418 (GIBCO) ont été rajoutés au milieu de culture pour la sélection. Dans tous les cas, les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 10% de CO₂ dans l'air.

1.2 Tissus

Pour confirmer la pertinence *in vivo* des résultats obtenus *in vitro* dans les lignées cellulaires, nous avons également utilisé des fragments de tissus tumoraux et de tissus sains correspondants, issus de patients opérés de CCC sporadiques. Ces échantillons, obtenus grâce à une collaboration avec le Service de Chirurgie Urologique du Nouvel Hôpital Civil (NHC) de Strasbourg (HUS) (Prs Didier Jacqmin et Hervé Lang), sont congelés dans l'azote liquide immédiatement après le prélèvement et conservés ainsi jusqu'à leur utilisation. Le consentement éclairé de chaque patient a été recueilli.

2- Etude de l'expression des ARNm

2.1 Extraction des ARNm

L'ARN total est extrait des cellules en culture et des tissus humains par la technique au TRIzol (Invitrogen) selon le protocole défini par le fournisseur. Le TRIzol est une solution mono-phasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui permet de lyser les cellules et de dissoudre les composants cellulaires tout en préservant l'intégrité des ARN. Brièvement, les tissus (50 à 100mg) sont broyés à l'aide d'un potter dans 1 ml de TRIzol et les cellules lysées dans ce même réactif. Afin d'assurer une dissociation des complexes nucléoprotéiques, les échantillons sont laissés à reposer pendant 5 minutes à température ambiante. Après addition de 200 µl de chloroforme, le mélange est agité vigoureusement à la main pendant 15 secondes et incubé pendant 10 min à température ambiante. Une séparation de phase est effectuée par centrifugation à 4°C pendant 15 min à 12000 g, puis les ARN contenus dans la phase aqueuse sont récupérés et précipités par addition de 500µl d'isopropanol. Les tubes sont alors agités, incubés à température ambiante pendant une dizaine de minutes puis centrifugés à 12000g pendant 10 minutes à 4°C. Les culots sont alors lavés à l'éthanol 75%, séchés à l'air, puis repris dans 10 à 50 µl d'eau bidistillée à 0,1% de diéthyl-pyrocabonate, un inhibiteur de nucléase. Les concentrations sont déterminées par densité optique à 260 nm et la pureté des échantillons d'ARN est calculée par le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm. Un rapport égal ou supérieur à 1,7 indique l'absence de contamination de la préparation d'ARN par l'ADN.

2.2 Transcription reverse

L'obtention des ADNc totaux est réalisée par transcription reverse (RT) sur 5µg d'ARN total. Après une première incubation des ARN en présence d'1 µM d'amorces non spécifiques p(dT)₁₅ (Roche Diagnostics, Meylan, France) à 65°C, le mélange réactionnel est complété avec 400U de transcriptase reverse (Invitrogen), 10U d'inhibiteur d'ARNase (Invitrogen), 1 mM de désoxynucléotides triphosphates (dNTP, Roche) et de l'eau ARNase free qsp 40µl. La réaction se fait pendant 1h à 37°C. La transcription réverse est stoppée en chauffant les échantillons à 99°C pendant 5 minutes.

2.3 Quantification des ARNm

2.3.1 Etude de l'expression relative des cibles : PCR semi quantitative en temps réels

Les ADNc obtenus par transcription reverse ont été quantifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réels en utilisant. Les ADNc spécifiques des ARNm étudiés ont été amplifiés en utilisant le kit «LightCycler-FastStart DNA Master SYBR (syber) Green » (Roche Diagnostics). Des courbes standards ont été obtenues pour les cibles recherchées ainsi que pour le gène domestique GAPDH (glycéraldéhyde phosphate deshydrogénase) par dilutions en cascade des échantillons mélangés d'ADNc, en accord avec l'un des protocoles préconisés par le fournisseur du kit (Roche Diagnostics). Le milieu réactionnel (20µ) contient 4 mM MgCl₂, 0.5 µM de chaque couple d'amorces sens-antisens spécifiques de chaque gène recherché , 0.2 µM de sonde SYBR verte, 0.4 µM de sonde d'hybridation, 1 x de tampon de réaction « FastStart » (ADN polymérase, dNTPs, tampon), et 2 µl d'ADNc, selon les recommandations du fournisseur. Après une première dénaturation à 95°C pendant 10 min, la PCR est réalisée en 45 cycles de dénaturation (10 s à 95°C), d'amorçage (5 s à 60°C) et de polymérisation (12 s à 72°C). Chaque amplicon a été vérifié sur gel d'agarose à 2%. Un contrôle négatif était systématiquement réalisé en remplaçant l'ADNc par de l'eau stérile de qualité PCR. Chaque échantillon a été analysé 3 fois et quantifié avec le logiciel d'analyse pour LightCycler (Roche Diagnostics). L'expression relative des différents gènes a été calculée en rapportant les taux d'ARNm à ceux de la GAPDH considérée comme gène domestique.

2.3.2 Etude du profil d'expression des isoformes de la PTHrP : PCR quantitative en temps réels

Pour établir un profil d'expression des isoformes de la PTHrP, il était nécessaire de pouvoir quantifier chacune des isoformes afin de les comparer. Les amorces sens et antisens utilisées pour les réactions de PCR ont été choisies dans les exons non traduits en 3' spécifiques de chaque isoforme, à savoir les exons 7, 9 et 8 pour les isoformes 139, 141 et 173, respectivement. Pour l'analyse de l'expression de la PTHrP totale, les amorces utilisées ont été choisies dans l'exon VI du gène de la PTHrP qui est commun aux diverses isoformes . Les réaction de PCR ont été réalisées comme décrit pour la PCR semi-quantitative, à la différence qu'après avoir été vérifié sur gel d'agarose à 2%, chaque amplicon (hormis celui de la GAPDH) a été extrait du gel (Gel extraciton kit –QIAGEN), puis réamplifié par PCR avec les

mêmes amorces et selon les mêmes conditions que ci-dessus en concentrations connues pour servir de « calibrateur » afin de quantifier l'expression des diverses cibles. L'expression relative des diverses isoformes de la hPTHrP et de la hPTHrP totale dans chaque lignée et cellules transfectées a alors été calculée en quantifiant leurs taux d'expression grâce aux calibrateurs. Ces concentrations ont ensuite été normalisées par rapport à l'expression de la hGAPDH dans l'échantillon correspondant. Les résultats ont été exprimés soit en fM soit en pourcentage des diverses isoformes par rapport à la concentration mesurée en PTHrP commune totale.

Cibles	Primer sens (5'-3')	Primer antisens (5'-3')
PTHrP totale	CGGTGTTCTGCTGAGCTA	TGCCAGATGGTGAAGGA
Isoforme 139	TCTCAGCCGCCGCCTCAAAA	AGAGAAGCCTGTTACCGT
Isoforme 141	ACTCGCTCTGCCTGGTTA	CAATGCCTCCGTGAATCG
Isoforme 173	GGATAAGTAGTACAGCTTCAG	GGCAATAAAGTAGGGTCC
VEGF	AGGCCAGCACATAGGAGAGA	TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT
TGF-β	AAGTTAAAAGTGGAGCAGC	CACTTGCAGTGTGTTATCC
GAPDH	GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GCAGTGATGGCATGGACTG

3- Recherche des protéines de liaison à l'ARNm de la

PTHrP

3.1 Génération des sondes ARN

Trois fragments ADN se chevauchant et reprenant l'ensemble de la séquence de l'exon IX spécifique de l'isoforme 141 de la hPTHrP, ainsi qu'un fragment correspondant à l'ensemble de l'exon IX, ont été générés par PCR (Figure 13) dans le milieu suivant : amorces sens et antisens spécifiques (0.15 μM), dNTP (0.4 mM), Taq DNA polymérase (5 U, rajoute un A en 3' du fragment PCR) (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), MgCl₂ (5 mM) et 0.5 μg d'ADNc de la lignée cellulaire 786-0. Les cycles PCR ont été programmés comme suit : 94°C pendant 3 min, 3 cycles à 94°C pendant 15 s, 54°C pendant 1 min et 74°C pendant 1 min ;

puis 20 cycles à 94°C pendant 15 s, 65°C pendant 1 min et 74°C pendant 1 min suivis d'une phase d'extension à 74°C pendant 10 min. La séquence de reconnaissance de l'ARN polymérase T3 a été rajoutée en 5' de chaque amorce sens afin de s'assurer de la transcription du brin ADN sens lors de l'étape de transcription *in vitro* décrite ci-dessous et ce quelle que soit l'orientation du fragment PCR dans le vecteur. Le site de restriction BamH1 a également été rajouté en 5' de chaque amorce antisens (se retrouvant ainsi en 3' du fragment PCR généré) afin de permettre la linéarisation du vecteur en aval du fragment PCR avant l'étape de transcription *in vitro*. Les fragments PCR obtenus, dont les tailles sont de 200pb (141-1), 237pb (141-2), 209pb (141-3) et 510pb (141-c) en tenant compte des séquences T3 et BamH1 rajoutées, ont ensuite été sous-clonés par clonage T/A dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega, France) selon le protocole du fournisseur. Une « maxiprep » (Qiagen, Courtaboeuf, France) de chaque construction a été réalisée après transformation de bactéries Escherichia coli DH5 α compétentes (Invitrogen) afin de disposer d'une quantité suffisante de chaque construction. L'exactitude de la séquence des trois fragments de l'exon IX du gène de la hPTHrP (identification JO3580, Genbank, NIH) a été vérifiée par séquençage (Genosphere Biotechnologies, Paris, France).

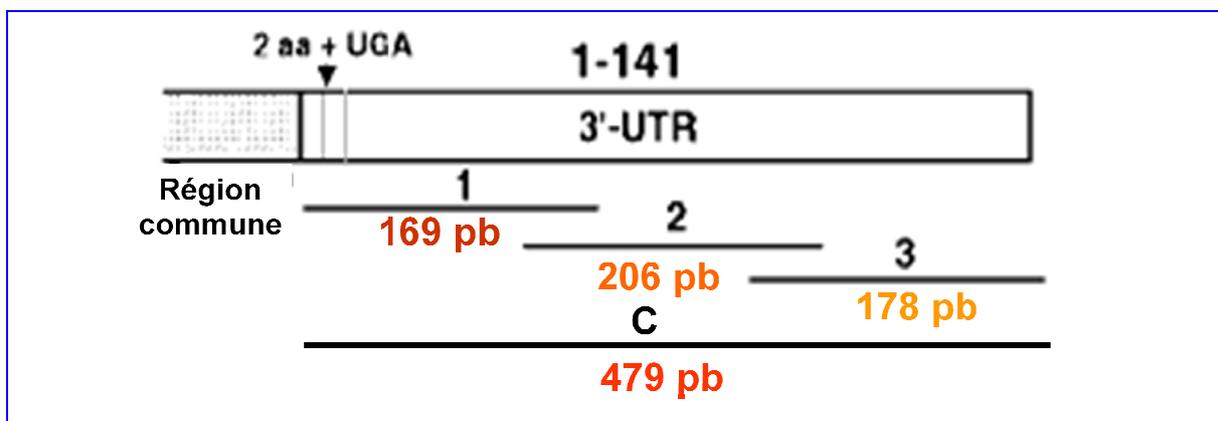


Figure 13 : Sondes ARN générées par PCR.

3.2 Transcription *in vitro*

Dix μ g de chacune des quatre constructions contenant les sondes ADN correspondants à l'exon IX du gène de la hPTHrP ont été linéarisés par digestion enzymatique par BamH1 (Euromedex), déposés sur gel d'agarose 2% et purifiés sur colonne à l'aide du kit GelExtract (Qiagen) selon le protocole du fournisseur. Chaque sonde ADN de l'exon IX du gène de la hPTHrP a alors été transcrite en ARN dans un milieu réactionnel de 100 μ l

contenant (concentration finale) : tampon de transcription T3 (1x, Promega), DTT (10mM), inhibiteur d'ARNase (100U, Invitrogen), rNTP (ATP, 0.5mM ; GTP, 0.5mM ; UTP, 0.5mM ; CTP, 0.33mM et biotine-14-CTP, 0.17mM ; Invitrogen), vecteur linéarisé (5µg) et ARN polymérase T3 (40U, Promega), pendant 2h à 37°C. Les réactions de transcription ont ensuite été traitées à la DNase I (Amersham Biosciences, Orsay, France) afin de digérer le vecteur linéarisé. Pour cela 30U de DNase I ont été ajoutées à chaque réaction de transcription, et le tout incubé pendant 15 min à 37°C. Finalement, les ARNs ont été purifiés sur colonne « NucAway Spin Columns » (Ambion, Huntington, UK) qui éliminent, outre les sels et la DNase I, les nucléotides non incorporés. Pour cela, les colonnes Ambion sont tout d'abord hydratées avec de l'eau traitée au diéthyl-pyrocarbonate (DEPC, inhibiteur d'ARNase) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), centrifugées à 750g pendant 2 min puis les échantillons déposés sur la colonne. Après une brève centrifugation à 750g, 2 min, les ARNs sont récupérés puis stockés à -20°C jusqu'à l'étape de « cross-linking » aux UV décrite ci-dessous. La taille des ARNs obtenus correspondants aux 3 sondes ADN de l'exon IX du gène de la hPTHrP a été vérifiée sur gel d'agarose 2% préparé à l'eau traitée au DEPC. La taille des ARNs obtenus est de 169 (r141-1), 206 (r141-2), 178 (r141-3) et 476 (r141-c) bases.

3.3 UV cross-linking ARN-protéines

Une réaction de « cross-linking » aux UV a été réalisée pour chaque sonde ARN avec avec différents extraits protéiques de cellules exprimant ou non un VHL, sauvage ou muté. Pour chaque réaction de « cross-linking », 100µg de protéines d'extrait cellulaire sont incubés avec 50µl d'ARN biotinylé purifié dans 200µl final de tampon de liaison de l'ARN contenant (en mM final) : tampon HEPES (20), MgCl₂ (3), KCl (40), DTT (1) et glycérol 5%. Après une incubation de 15 min à température ambiante, de l'héparine (Sigma) à 5mg/ml dans de l'eau traitée au DEPC est ajoutée aux milieux réactionnels qui sont incubés à nouveau 15 min à température ambiante. Les milieux d'incubation sont déposés dans une plaque 96 puits qui est irradiée aux UV pendant 5 min à la puissance maximale dans un spectrolinker XL-1000 UV crosslinker (Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA).

3.4 Purification des complexes

Les complexes ARN biotinylés-protéines sont purifiés par une technique de séparation utilisant des sphères paramagnétiques (MagneSphere) couplées à la streptavidine (Promega). Les sphères sont contenues dans des tubes à raison de 0.6ml permettant d'isoler jusqu'à 1mg

d'ARN. Les sphères sont tout d'abord isolées à l'aide d'un portoir magnétique (Promega) puis lavées 3 fois dans 300µl de tampon SSC (« standard sodium citrate ») 0.5x contenant NaCl 75 mM et citrate de sodium (sel déshydraté trisodique) 7.5 mM dans de l'eau traitée au DEPC, pH 7.2. Les sphères sont ensuite resuspendues dans 60µl de tampon SSC 0.5x. Trente µl de sphères sont alors ajoutés à chaque réaction de « cross-linking » et le tout incubé pendant 10 min à température ambiante en mélangeant toutes les 2 min par inversion des tubes. Les sphères, qui sont cette fois liées aux complexes ARN biotinylés- protéines, sont à nouveau isolées à l'aide du portoir magnétique puis lavées 4 fois dans du tampon SSC 0.1x. Après le lavage final, les sphères sont resuspendues dans 200µl de tampon de liaison de l'ARN (composition donnée au paragraphe précédent), puis incubées pendant 30 min à 37°C en présence d'un mix d'ARNase A et T1. Cette étape permet de digérer les extrémités des ARN liés à la streptavidine et ainsi de libérer les complexes ARN-protéines qui se retrouvent alors libres dans le surnageant. Les complexes ARN-protéines sont alors isolés par capture des sphères à l'aide du portoir magnétique et le surnageant récupéré et utilisé pour l'électrophorèse.

3.5 SDS-PAGE et révélation

Les protéines sont dénaturées par incubation dans le tampon de Laemmli (0,0025% bleu de bromophénol, 5% SDS, 12,5% β-mercaptoéthanol, 160 mM Tris et 25% glycérol), 6 min à 100°C puis déposées et séparées sur gel d'acrylamide à 10% par migration à 150V pendant 2h. Après la migration, les protéines sont révélées au nitrate d'argent en utilisant le kit de marquage ProteoSilver plus (Sigma-Aldrich)) exactement selon le protocole décrit par le fournisseur. Dans ce protocole, après les étapes de fixation (30 min dans une solution éthanol 40% vol/vol et acide acétique glacial : 10% vol/vol), de sensibilisation (30% dans une solution éthanol 30% vol/vol ; glutardialdéhyde 0.125% poids/vol ; thiosulfate de sodium 0.2% poids/vol et acétate de sodium 6.8% poids/vol) et de lavage (eau distillée 3 fois 5 min), le gel est incubé dans une solution de nitrate d'argent (nitrate d'argent : 0.25% poids/vol ; formaldéhyde 0.015% poids/vol) pendant 20 min. Après 2 lavages à l'eau distillée pendant 1 min, le gel est développé (entre 2 et 5 min dans une solution carbonate de sodium 2.5% poids/vol et formaldéhyde (0.008% poids/vol) puis bloqué dans une solution d'EDTA dihydrate (1.5% poids/vol).

4- Etude de l'expression protéique

4.1 Extraction des protéines

4.1.1 Protéines totales

A partir des cellules

Les cellules sont lavées 2 fois dans du tampon PBS 1x et 2 ml de tampon de lyse est rajouté, de composition suivante : 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.02% azide de sodium, 100 µg/ml PMSF, 100 µg/ml aprotinine et 1% NP-40 (Sigma-Aldrich). Les flacons de culture sont alors placés à +4°C pendant 30 min puis les cellules grattées du support, permettant d'obtenir le lysat cellulaire correspondant. Les lysats sont centrifugés à 14 000 g pendant 10 min à 4°C et les surnageants conservés à -80°C.

A partir des tissus

Les fragments de tissus (50-100mg) sont broyés au potter dans 1 ml de tampon A, riche en inhibiteurs de protéases (10% glycérol, 20 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA, 10 mM orthovanadate de sodium, 10 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml aprotinine). L'homogénat est centrifugé à 27000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot membranaire remis en suspension dans du tampon B (tampon A, additionné extemporanément de 1% NP-40, 0,1% SDS et 1% désoxycholate). Après 30 minutes d'incubation sous agitation à 4°C et une nouvelle centrifugation à 30000 g pendant 30 minutes à 4°C, le surnageant contenant les protéines est récupéré et conservé à -80 °C.

4.1.2 Protéines nucléaires-cytoplasmiques

Pour l'extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques, les cellules sont rincées au PBS, trypsinisées puis récupérées par centrifugation (1500rpm, 5 minutes). Elles sont alors remises en suspension et incubées sur glace pendant 10 minutes dans 500µl d'un premier tampon A hypotonique (10 mM HEPES [pH7,9], 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 µg/ml leupeptine, 1 µg/ml aprotinine, 0,5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). La lyse est effectuée par ajout de 50µl de tampon A contenant 2,5% de NP-40. Les noyaux sont ensuite récupérés par centrifugation (3500 rpm, 4 min, 4°C) et les surnageant soumis à 5 cycles de congélation/décongélation suivis d'une dernière centrifugation (3500 rpm, 10 minutes, 4°C). Les culots précédemment obtenus et contenant les noyaux remis en suspension dans un tampon C (20 mM HEPES [pH 7.9], 0.45 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 µg/ml leupeptine, 1 µg/ml

aprotinine, 0,5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) et agités à 4°C pendant 30 minutes. Après centrifugation à 14000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, les surnageants contenant des protéines nucléaires sont récupérés et conservés à -80°C. Le même protocole a été utilisé pour extraire les protéines nucléaires cyto-plasmiques à partir des tissus après que ceux-ci aient été broyés.

Les protéines (obtenues à partir de cultures cellulaires ou de tissus) sont dosées sur un aliquot du surnageant selon la méthode de Lowry et al (Lowry et al., 1951).

4.2 Western blot

Les protéines sont dénaturées par incubation dans le tampon de Laemmli (0,0025% bleu de bromophénol, 5% SDS, 12,5% β -mercaptoéthanol, 160 mM Tris et 25% glycérol), 6 min à 100°C. Les extraits protéiques (10 à 30 μ g) sont déposés et séparés sur gel d'acrylamide à 10%. La migration est effectuée à 150 V pendant 2h. Les protéines sont ensuite transférées avec un système Biorad sur une membrane PVDF pendant 1h à 100 V. Après transfert, la membrane est rincée pendant 10 minutes dans du tampon salin Tris (TBS), pH7,5, contenant 0,1% de tween-20 (TBST), puis saturée pendant 1h sous agitation à température ambiante dans du TBST contenant 5% de lait écrémé. La membrane est alors incubée sous agitation, à 4°C, pendant la nuit avec l'anticorps primaire dilué dans le TBST contenant 5% de lait écrémé ou pendant 1 h à température ambiante, toujours sous agitation. Les différents anticorps utilisés sont répertoriés plus bas. La membrane est ensuite lavée trois fois avec du TBST, puis incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. Après 3 lavages avec du TBST, le marquage est révélé par chimioluminescence avec un kit de détection (Immobilon western substrate, millipore). Les temps d'exposition dépendent de l'intensité du signal.

Les membranes PVDF peuvent être utilisées plusieurs fois grâce au kit ReblotPlus (Millipore, France). Brièvement, les membranes sont incubées sous agitation dans la solution de reblot 1X de façon à retirer les anticorps sans détruire les protéines fixées sur les membranes. Après 2 lavages dans du TBST contenant 5% de lait écrémé, la procédure de marquage est reprise à partir de la saturation.

Anticorps utilisés et concentrations :

- Anticorps monoclonal de souris anti-HuR (Tebubio), 1/1000
- Anticorps monoclonal de souris anti- β -actine (Sigma), 1/5000
- Anticorps polyclonal de lapin anti-Lamin B (Upstate), 1/2000

- chèvre anti-lapin (Amersham), 1/20000
- chèvre anti-souris (Amersham), 1/20000

4.3 Elisa

Les expressions de VEGF et TGF- β 1 dans les surnageants de culture de cellules 786-0 transfectées par un siCtl ou siHuR, ont été analysées par kit Elisa (GE Healthcare Europe, Orsay, France) selon les recommandations du fournisseur.

VEGF : 50 μ l d'échantillon sont incubés pendant 2h dans une plaque 96 puits coatée avec un anticorps anti-VEGF. Après rinçage de la plaque, un second anticorps biotinylé puis un réactif streptavidin-HRP sont ajoutés et incubés. La réaction est initiée par ajout du substrat TMB et se fait pendant 30 min dans le noir. La réaction est alors arrêtée par une solution stop et la DO lue à 450nm. Tous les échantillons sont dosés en double et leur concentration est calculée par rapport à une courbe standard réalisée à partir de VEGF recombinant.

TGF- β 1 : Avant de doser le TGF- β 1 dans les surnageants de culture, celui-ci doit être libéré de toute association avec d'autres protéines. Pour cela, les échantillons sont pré-traités pendant 1h par ajout de 10% de HCL 1N. Avant la mesure, les échantillons sont rendus neutres par 10% de NaOH 1N. Les échantillons sont incubés dans une plaque coatée avec un anticorps anti-TGF- β 1. L'ajout d'un second anticorps conjugué à une HRP et du substrat TMB déclenche la réaction. La DO est lue à 450nm. De même que pour le VEGF, les échantillons sont dosés en double par rapport à une courbe standard.

5- Etude de l'inhibition de HuR sur la croissance cellulaire

5.1 In vitro

5.1.1 Transfection des cellules par siARN

Les cellules 786-0 ont été « reverse transfectées » par des duplexes de siARN spécifiques pour HuR (Ambion, Courtaboeuf, France) ou non spécifiques (Qiagen), avec la lipofectamine RNAimax (Invitrogen) en accord avec les recommandations du fournisseur. Brièvement, les duplexes siARN (concentration finale 50nM) sont dilués dans du DMEM sans sérum ni antibiotiques et incubés pendant 10 minutes à température ambiante dans les puits de plaques 96, 24 ou 6 puits, en présence de l'agent de transfection. Les cellules sont alorsensemencées

en quantité adéquate dans du milieu supplémenté de 10% de sérum, toujours sans antibiotiques. Le nombre de cellulesensemencées dépend des plaques de culture utilisées, il est calculé de manière à ce que les cellules atteignent 30 à 50% de confluence une fois adhérentes. Les cellules ainsi transfectées sont utilisées pour analyses 24, 48, 72 et 96h après transfection.

5.1.2 La densité cellulaire

La densité cellulaire a été déterminée par comptage manuel à 24, 48, 72 et 96h après transfection. Les cellules en culture sont rincées au PBS puis détachées grâce à l'action de la trypsine. Elles sont alors comptées à l'aide d'une cellule de Neubauer.

5.1.3 La prolifération cellulaire

Pour la mesure de la prolifération cellulaire, les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 2000 cellules par puits. La prolifération cellulaire est mesurée à l'aide du kit BrdU cell proliferation assay (Calbiochem). Brièvement, le BrdU (5-bromo-2'-déoxyuridine) est un analogue structural de la thymidine qui va s'incorporer à l'ADN lors de la réplication. Il est ajouté au milieu de culture pendant 24h puis les cellules sont fixées et perméabilisées. Enfin, le marquage à l'aide un anticorps primaire anti-BrdU et d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase permet, après ajout du substrat de quantifier l'incorporation de BrdU par colorimétrie.

5.1.4 La mort cellulaire induite

FACS (Fluorescence activated cell sorting): L'apoptose a été mesurée in vitro par cytométrie de flux. Après traitement des cellules, les cellules mortes contenues dans les surnageants de culture ainsi que les cellules adhérentes sont récupérées et lavées par plusieurs cycles de rinçages au PBS et de centrifugation (1800rpm, 2min 4°C). Les culots ainsi obtenus (contenant les corps cellulaires du surnageant et les cellules adhérentes) sont remis en suspension et incubés 10 minutes dans l'obscurité dans un tampon d'incubation (140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES) contenant 0,5% d'annexine V couplée à FITC (Roche) et 1 µg/ml d'iodure de propidium (Sigma). Les cellules sont ensuite centrifugées et fixées avec du formol 1% (4°C, entre dix min et 5 jours) et peuvent être conservées une semaine. Le jour de l'analyse par FACS, les échantillons sont centrifugés puis les culots repris dans du tampon d'incubation. L'annexin V marque la phosphatidylsérine et sert donc de marqueur de l'apoptose précoce puisque les cellules ne sont pas perméabilisées. Quant à l'iodure de

propidium, il s'agit d'un agent intercalant de l'ADN qui permet de distinguer l'apoptose de la nécrose.

5.2 In vivo

5.2.1 Le modèle de souris nude xénogreffée.

L'étude réalisée chez la souris nude a été menée dans le respect des règles bioéthiques et de la législation française. Les xénogreffes de CCC humain ont été faites sur des souris « *nude* » athymiques SWISS nu(-/-) (Charles River) âgées de 7 semaines. Les souris ont été maintenues dans des conditions aseptisées ; la nourriture, l'eau et la litière ont été autoclavées et les manipulations ont été effectuées sous une hotte stérile dans une pièce dédiée à l'expérimentation animale. L'implantation des lignées tumorales (786-0) chez les souris anesthésiées à l'isoflurane (anesthésie gazeuse) est réalisée à partir de cellules en phase exponentielle de croissance (80% de confluence). Environ 10 millions de cellules sont injectées en sous-cutané dans le dos des souris, alors âgées de 8 à 9 semaines. Lorsque les tumeurs ont atteint un volume suffisant (environ 100 mm³), soit 4 à 5 semaines plus tard, les souris sont réparties au hasard en groupes de volume moyen équivalent : un groupe contrôle et un groupe traité. Le traitement est réalisé par injections intra-tumorales de siHuR ou siCtl à raison de 10nmol/kg, 2 fois par semaine, pendant 3 semaines. Dans le même temps, le volume des tumeurs est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse puis calculé selon la formule : longueur x largeur x épaisseur x 0.5236. A l'issue des protocoles, les souris sont anesthésiées puis sacrifiées. Le sang et les tumeurs sont alors récupérés. Un certain nombre de paramètres physiologiques (électrolytes, créatinine, urée ...) ont été mesurés dans le plasma. Toutes les tumeurs sont découpées en 2 parties : une partie est congelées dans l'azote liquide afin d'en extraire ensuite les protéines, l'autre partie est fixée et conservée dans la paraffine pour des analyses ultérieures d'immunohistochimie.

5.2.2 Mesure de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été évaluée au niveau des tumeurs sous-cutanées à l'aide d'un anticorps anti-Ki67 (Mib-1, Dako) utilisé à une dilution de 1/100, pendant 4H à température ambiante, après démasquage antigénique par chauffage. Le comptage est ensuite effectué sur 15 champs représentatifs observés au grossissement x 40 (0,25 mm² chacun). Les résultats sont exprimés en % (nombre de cellules marquées sur nombre de cellules totales).

5.3.3 Mesure de la mort cellulaire induite

La mort cellulaire induite a été évaluée grâce à la technique du TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nicked end labeling). Le kit « *in situ* cell death detection kit, POD » de Roche a été utilisé en suivant les instructions du fournisseur pour marquer les extrémités 3'-OH libres de l'ADN par la terminal transférase (TdT). Le comptage du ratio cellules marquées par rapport au nombre total de cellules a été réalisé sur 15 champs les plus marqués (0,25 mm² chacun) examinés au microscope à grandissement x40.

5.2.4 Mesure de la vascularisation

Pour l'étude de la vascularisation, nous avons utilisé l'anticorps anti-facteur VIII polyclonal de lapin anti-humain (A0082, Dako, France) à une dilution de 1/200 et l'anticorps monoclonal de souris anti-CD31 (JC70A, Dako, France) à une dilution de 1/40, après démasquage antigénique par protéase (protéinase K), incubés pendant 30 mn. Le comptage de la densité vasculaire et du nombre d'intersections vasculaires est réalisé au microscope optique sur 5 et 4 champs respectivement, observés au grandissement x 40 (0,25 mm²).

6- Statistiques

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm s.e.m. Elles sont comparées en utilisant une analyse multifactorielle de la variance, basée sur le test de Student-Newman-Keul pour les comparaisons multiples. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque p est inférieur à 0,05.

*Chapitre 3 : Etude de
l'expression et de la
stabilisation des ARNm
de la PI3Kp*

1- Publication

von Hippel-Lindau tumor suppressor gene-dependent mRNA stabilization of the survival factor parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma by the RNA-binding protein HuR

Carcinogenesis. 2008 Dec 4. [Epub ahead of print]

von Hippel-Lindau tumor suppressor gene-dependent mRNA stabilization of the survival factor parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma by the RNA-binding protein HuR

Sabrina Danilin,¹ Carole Sourbier,¹ Lionel Thomas,¹ Sylvie Rothhut,¹ Véronique Lindner,² Jean-Jacques Helwig,¹ Didier Jacqmin,³ Hervé Lang,³ and Thierry Massfelder^{1,*}

¹INSERM U727, Section of Renal Pharmacology and Physiopathology, Strasbourg, 67085 France, University Louis Pasteur, School of Medicine, Strasbourg, 67085 France; ²Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Department of Pathology, Strasbourg-Hautepierre, 67200 France and ³Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Department of Urology, Strasbourg, 67091 France

Running title: PTHrP mRNA stabilization by HuR in RCC

*To whom correspondence and reprint should be addressed: Tel : 333-90-24-34-56; Fax : 333-90-24-34-59; E-mail: thierry.massfelder@medecine.u-strasbg.fr

Abbreviations: RCC, renal cell carcinoma; CRCC, conventional RCC; PTHrP, parathyroid hormone-related protein; VHL, von Hippel-Lindau

Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene-dependent mRNA stabilization of the survival factor parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma by the RNA-binding protein HuR

Sabrina DANILIN, Carole SOURBIER, Lionel THOMAS, Sylvie ROTHHUT, Véronique LINDNER, Jean-Jacques HELWIG, Didier JACQMIN, Hervé LANG and Thierry MASSFELDER

Carcinogenesis Advance Access, 2008, diffusé en ligne le 04 décembre 2008

Pages 72-97 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgn275>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

1- Résumé

La PTHrP est un facteur de survie essentiel au CCC humain et est exprimée de façon tissu-spécifique et/ou conditions-spécifique sous forme de 3 isoformes de 139, 141 et/ou 173 acides aminés. Dans le CCC, son expression est négativement régulée par le gène suppresseur de tumeur VHL et ce, spécifiquement au niveau de la stabilité de son ARNm, tout comme celle d'autres facteurs de croissance cibles de système VHL/HIF tels que le TGF- β 1,. Notre but était donc d'analyser l'épissage alternatif que subit l'ARN pré-messager de la PTHrP dans le CCC, puis d'identifier les protéines de liaison à l'ARN qui sont cibles du système VHL/HIF et qui sont impliquées dans la stabilité de la PTHrP. A partir i) d'un panel de lignées cellulaires de CCC exprimant ou non un VHL fonctionnel, ii) de cellules 786-0 déficientes en VHL transfectées par un VHL sauvage ou muté et iii) de fragments de CCC humains et de tissus sains correspondants, nous avons montré par PCR quantitative en temps réel, que l'isoforme 141 est prédominant dans toutes les lignées cellulaires utilisées, déficientes ou non en VHL, ainsi que dans les fragments tumoraux, représentant de l'ordre de 80% des ARNm de la PTHrP. Nous avons également observé que la présence d'un VHL sauvage diminue de 50% l'expression de l'ensemble des isoformes de la PTHrP. Enfin, nous avons identifié 8 protéines de liaison à la région 3'UTR de l'ARNm de l'isoforme 141 dont l'abondance est dépendante de l'expression du VHL. Parmi ces protéines, nous avons identifié celle d'un poids moléculaire de 30kDa comme étant la protéine HuR, une protéine de liaison à l'ARN au rôle stabilisateur. De façon intéressante, HuR a déjà été montrée comme stabilisant les ARNm codant pour des protéines impliquées dans la transformation maligne telles que le VEGF ou le TGF- β 1. Nos travaux l'impliquent également dans la surexpression de la PTHrP dans le CCC humain. Le ciblage de ces protéines de liaison à l'ARNm régulées par le système VHL/HIF apparaît donc comme une nouvelle option thérapeutique à explorer.

2- Discussion

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'expression ainsi qu'à la stabilisation des ARNm de la PTHrP, dans le but d'identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la surexpression de cette protéine aux propriétés cytokine-like dans les CCC humains. Rappelons en effet que la PTHrP est régulée au niveau post-transcriptionnel par le VHL, tout comme une majorité des cibles du système VHL/HIF tels que le VEGF, l'EGF ou le TGF- β . Les protéines impliquées dans la régulation post-transcriptionnelle de la PTHrP pourraient donc également être responsables de la stabilisation des ARNm des autres facteurs de croissance surexprimés en l'absence de VHL. Ainsi, une fois ces protéines identifiées, leur blocage pourrait permettre de rééquilibrer un système dérégulé dans la majorité des CCC et constituer une nouvelle approche thérapeutique pour ce cancer réfractaire aux thérapies.

La PTHrP est exprimée sous forme de 3 isoformes d'ARNm qui codent pour des protéines de 139, 141 ou 173 acides aminés. Ces 3 isoformes partageant la majorité de leur région codante mais différant dans leur régions 3'UTR intervenant dans le *turn-over* des ARNm, nous nous sommes tout d'abord intéressés à leur profil d'expression dans le CCC.

Nos résultats, obtenus *in vitro* sur des lignées cellulaires et *in vivo* sur des fragments de CCC humains et de tissus sains correspondants, ont révélé que dans le CCC humain, l'isoforme 141 est majoritairement exprimée, représentant 70 à 80% de l'ensemble des ARNm de la PTHrP. Suivent les isoformes 173 puis 139 correspondant respectivement à environ 20% et 5% isoformes de la PTHrP. De façon intéressante, ce profil est identique dans tous les échantillons tumoraux de patients ainsi que dans toutes les lignées cellulaires testées, et seules les concentrations en ARNm de la PTHrP varient. Celles-ci varient tout d'abord en fonction du statut en VHL, comme observé dans les différentes lignées de CCC ainsi que dans les cellules 786-0 transfectées ou non par un VHL sauvage. Nous observons en effet que le VHL diminue de 50% l'expression de l'ensemble des isoformes de la PTHrP, ce qui est en accord avec les précédents travaux du laboratoire identifiant la PTHrP comme une nouvelle cible du VHL (Massfelder et al., 2004). Une variation parfois importante des concentrations en ARNm de la PTHrP est également retrouvée entre les différents patients. Cette variation peut d'une part être due au statut en VHL des patients, qui n'est pas connu, mais aussi à l'hétérogénéité inter-individus de l'expression de la PTHrP. Malgré ces différences, une surexpression des ARNm de la PTHrP dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains correspondant est retrouvée chez la majorité des patients (8 sur 10), confirmant les observations de (Gotoh et al.,

1993) que la PTHrP est surexprimée dans la majorité des CCC humains. Nous avons également observé une expression des ARNm de la PTHrP plus importante dans les stades pT1 que dans les stades pT3, ce qui suggère que la PTHrP joue un rôle plus important dans les stades précoces. De plus, les profils d'expression des ARNm de la PTHrP étant similaires dans les tissus sains et les tissus tumoraux, la transformation de ces cellules ne semble pas être à l'origine d'une expression préférentielle de l'une ou l'autre des isoformes contrairement à ce qui a pu être démontré dans d'autres types de cancers. Sellers et al ont notamment montré que les cellules cancéreuses du poumon expriment les 3 isoformes de la PTHrP alors que dans le poumon sain, seule l'isoforme 141 est retrouvée (Sellers et al., 2004b).

Enfin, les concentrations en ARNm de la PTHrP observées dans les clones Δ VHL, qui rappelons le, sont incapables de reconnaître les facteurs HIF- α pour les adresser vers une dégradation par le protéasome, sont identiques aux concentrations dans les cellules 786-0 déficientes en VHL. Ce résultat démontre clairement que la PTHrP n'est pas seulement une cible du VHL mais bel et bien une cible du système VHL/HIF. Elle fait donc parti des cibles de ce système qui sont régulées exclusivement de façon post-transcriptionnelle, tout comme les TGF- α et - β .

La large prédominance de l'isoforme 141 nous a amené à poursuivre nos travaux sur cet isoforme en particulier pour rechercher les protéines de liaison à l'ARNm de la PTHrP susceptibles de réguler sa stabilité. De telles protéines ont déjà été observées comme se liant sur les régions 3'UTR des isoformes 139 et 141, certaines présentant des poids moléculaires identiques et d'autres semblant spécifiques de l'une ou l'autre des isoformes. Ces protéines n'ont pas été identifiées, mais il apparaît que leur liaison sur les ARNm des isoformes 139 et 141, et par conséquent la stabilité de ces isoformes, soit régulée par l'EGF et le TGF- β respectivement (Heath et al., 1995; Sellers et al., 2002). Par la technique d'UV cross-linking ARN-protéines, nous avons pu identifier 8 protéines de liaison à la région 3'UTR de l'ARNm de la PTHrP avec des poids moléculaires allant de 20 à 70kDa. Nos tentatives de situer plus précisément les sites de liaison de ces protéines en utilisant 3 sondes chevauchantes et recouvrant la totalité de la région 3'UTR de l'isoforme 141 ont échoué. Il apparaît donc que la liaison de ces protéines requière que l'ARNm adopte une certaine structure secondaire. Afin de définir précisément à quel niveau de la région 3'UTR de l'isoforme 141 se lie HuR, nous avons également généré 3 sondes ARN chevauchantes et recouvrant l'ensemble de cette régions 3'UTR

Parmi elles, celle de 30kDa a été identifiée comme étant la protéine HuR, dont le rôle de stabilisation des ARNm n'est plus à démontrer (Brennan and Steitz, 2001). Il a en effet été démontré que cette protéine est largement impliquée dans la stabilisation de nombreux ARNm contenant des éléments riches en AU et codant pour divers facteurs de croissance tels que le VEGF, le transporteur du glucose GLUT-1, l'EGF, l'érythropoïétine ou encore les facteurs de transcription HIF-1 α et le TGF- β . Autant de facteurs impliqués dans la croissance du CCC humain et autant de cibles du système VHL/HIF. De plus, HuR, par l'intermédiaire de son RRM1, peut interagir avec le domaine de liaison à l'élongine du VHL.

Toutes ces propriétés de HuR vont dans le sens de notre hypothèse de départ selon laquelle des protéines de liaison à l'ARN ayant des propriétés stabilisatrices/déstabilisatrices réguleraient la stabilité des messagers des cibles post-transcriptionnelles du système VHL/HIF. De façon à confirmer cette idée, et de vérifier l'implication de HuR dans la stabilisation des ARNm de la PTHrP, nous avons mesuré les taux d'ARNm de la PTHrP, du VEGF et du TGF- β dans des cellules transfectées par un siARN HuR. Nous avons effectivement observé des inhibitions substantielles des concentrations de ces ARNm, démontrant d'une part que HuR stabilise bien l'ARNm de la PTHrP, et d'autre part que dans le CCC HuR intervient également dans la stabilisation des ARNm du VEGF, une cible à la fois transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du système VHL/HIF, et du TGF- β 1, une cible exclusivement post-transcriptionnelle de ce même système.

Ainsi, il apparaît que la protéine HuR intervient dans la régulation de l'expression de diverses cibles du système VHL/HIF. Elle pourrait donc constituer une nouvelle cible thérapeutique permettant de contrer l'expression aberrante des nombreux facteurs de croissance, angiogéniques et autres, surexprimés lors de la déficience en VHL. C'est pourquoi nous avons poursuivi ces travaux par l'étude de l'impact de l'inhibition de HuR sur la croissance du CCC humain.

*Chapitre 4 : Etude de
l'implication de la
protéine stabilisatrice des
ARNm HuR sur la survie
du CCC humain*

1- Résumé

Malgré l'apparition des thérapies ciblées, le CCC reste un cancer réfractaire aux thérapies et qui développe de nombreuses résistances. La protéine de liaison à l'ARN HuR régule la stabilité ainsi que la traduction de nombreux ARNm impliqué dans la transformation maligne. Par l'étude de l'expression de cette protéine dans notre panel de lignées cellulaires de CCC *in vitro* ainsi que *in vivo* dans des fragments de tumeurs de patients atteint de CCC et les tissus sains correspondants, nous avons montré qu'elle est surexprimée dans les tumeurs et que sa localisation cytoplasmique est plus fréquente dans les stades précoces. Aucune différence d'expression et de localisation subcellulaire de HuR n'a été observée en relation avec le statut en VHL des cellules. Nous montrons également que l'inhibition de HuR par siARN dans les cellules 786-0 entraîne une diminution substantielle de la croissance cellulaire via une inhibition de la prolifération et une induction de l'apoptose *in vitro*. De plus, l'injection intratumorale de siARN HuR chez la souris nude xénogreffée en sous-cutané inhibe fortement la croissance tumorale de plus de 60% et ce, également via une inhibition de la prolifération cellulaire et une induction de l'apoptose. Enfin, cette inhibition de HuR *in vitro* et *in vivo* entraîne une diminution de l'expression du VEGF et du TGF- β 1 dont les ARNm sont stabilisés par HuR. Ces résultats suggèrent que HuR joue un rôle central dans la tumorigénèse des CCC et que son blocage pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique.

2- Introduction

Dans la première publication, nous avons montré que la protéine HuR participe à la stabilisation de l'ARNm de la PTHrP sous l'influence du VHL et que son inhibition diminue également de façon considérable les taux d'ARNm des facteurs de croissance TGF- β 1 et VEGF. Tout comme les autres membres de la famille des protéines ELAV, HuR comporte 3 domaines de liaison à l'ARN (RRM *RNA Recognition Motif*) qui lui permettent de se lier aux ARNm cibles et de réguler leur dégradation et/ou leur traduction. En conditions normales, HuR est à 99% nucléaire cependant, en réponse à divers stimuli comme des facteurs de croissance ou de stress, elle va transloquer vers le cytoplasme où elle prévient la dégradation des ARNm auxquels elle est liée (Abdelmohsen et al., 2007; Lopez de Silanes et al., 2005). Parmi les cibles de HuR, on retrouve des ARNm codant pour des protéines qui interviennent notamment dans la croissance cellulaire (EGF et les cyclines), la survie cellulaire (Bcl-2 ou Mcl-1), l'invasion (MMP-9), mais aussi l'angiogénèse (VEGF ; HIF-1 α) ou l'échappement à la réponse immunitaire (galectin-1) (Galban et al., 2008; Lopez de Silanes et al., 2005). Il apparaît donc que cette protéine HuR intervient dans tous les traits phénotypes caractéristiques des cellules tumorales, ce qui argumente son rôle établi dans la transformation maligne des cancers du sein, du colon, du poumon et des ovaires (Blaxall et al., 2000; Denkert et al., 2004; Erkinheimo et al., 2003; Lopez de Silanes et al., 2005).

De plus, l'observation que HuR augmente l'expression des facteurs de transcription HIF-1 α , via la stabilisation de son ARNm et/ou l'augmentation de sa traduction, est particulièrement intéressante dans le cas des CCC (Galban et al., 2008; Sheflin et al., 2004). En effet, ces facteurs HIF-1 α sont exprimés constitutivement dans la majorité des CCC du fait de la déficience en VHL. On peut alors supposer qu'en stabilisant HIF-1 α , HuR contribue au maintien des voies de prolifération, de survie cellulaire et d'angiogénèse induites par ces facteurs. Autre fait intéressant, Datta et al (2005) ont montré que le VHL, via son domaine de liaison à l'élongine, peut interagir avec le RRM 1 de HuR qui, ainsi séquestré, voit sa fonction de stabilisation des ARNm inhibée. Ces auteurs ont également établi que cette association entre le VHL et HuR est inhibée en conditions hypoxiques. Ce lien avec le VHL et les facteurs HIF-1 α , 2 acteurs centraux de la tumorigénèse des CCC, ainsi que ses effets stabilisateurs de nombreux ARNm, suggèrent un rôle crucial pour HuR dans le développement des CCC. Cette hypothèse, supportée par l'observation de (Lopez de Silanes et al., 2005) que HuR est préférentiellement cytoplasmique dans 9 échantillons de CCC

étudiés comparé aux tissus sains correspondants, n'a cependant encore jamais été étudiée. Ainsi, à l'heure actuelle, aucune donnée quant à un rôle potentiel de HuR dans la croissance du CCC n'est disponible, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Notre objectif était donc de déterminer si oui ou non la protéine HuR est impliquée dans la croissance cellulaire du CCC et si tel est le cas, quels mécanismes sont mis en jeu. Lors de nos travaux, nous avons montré qu'HuR est surexprimée dans les CCC et sujet à une translocation nucléaire-cytoplasmique dans les stades tumoraux précoces. Nous avons également établi que HuR est impliquée dans la croissance tumorale et la régulation post-transcriptionnelle de facteurs impliqués dans la croissance cellulaire et l'angiogénèse, et dans l'activation de voies cruciales à la tumorigénèse des CCC. HuR pourrait donc être un nouveau candidat pour le développement de thérapies ciblées dans le traitement de ce cancer.

3- Résultats

Expression et localisation sub-cellulaire de HuR dans les lignées cellulaires et tissus de CCC humain.

Par western blot, nous avons montré que HuR est exprimé dans toutes les lignées cellulaires indépendamment du statut en VHL. En effet, aucune différence d'expression n'a été observée entre les lignées exprimant un VHL sauvage (Caki-1 ; Caki-2 ; ACHN) et les lignées déficientes en VHL (786-0 ; UOK-1 ; UOK-2 ; A-498) (Figure 1A). La localisation sub-cellulaire n'a pas été étudiée dans ces lignées car les lignées saines correspondantes ne sont pas disponibles. Cependant, étant donné la capacité du VHL à séquestrer HuR (Datta et al., 2005), nous avons évalué l'influence du VHL sur l'expression et sa localisation sub-cellulaire de HuR dans les lignées 786-0 déficientes en VHL non transfectées (wild type, wt), ou transfectées de façon stable par un vecteur codant soit par un VHL sauvage (786-0 VHL) soit pour un VHL tronqué (786-0 Δ VHL). Dans ces clones, et en accord avec les observations faites par (Datta et al., 2005), nous n'avons trouvé aucune différence dans l'expression totale et sub-cellulaire de HuR (Figure 1B).

L'expression totale et sub-cellulaire de HuR a également été évaluée dans des extraits protéiques obtenus à partir de tissus tumoraux de stades pT1 et pT3 et des tissus sains correspondants. La comparaison des tissus sains et tumoraux d'un même patient a montré que HuR est surexprimé dans 87% des tumeurs de stade pT1 (6 échantillons sur 7) et 100% des

tumeurs de stade pT3 (8 sur 8 échantillons) (Figure 2). Dans les tumeurs de stade pT1, l'abondance nucléaire de HuR est plus importante que dans les tissus non tumoraux correspondant et ce, dans tous les cas. Quant à l'expression cytoplasmique, elle est augmentée dans 4 tumeurs (58%), égale dans 1 (14%) et plus faible dans 2 (28%) (Figure 2A). Dans les tumeurs pT3, bien que la surexpression nucléaire de HuR dans les tissus tumoraux comparés aux tissus sains correspondants soit retrouvée dans 88% des cas (7 cas sur 8), seule 1 tumeur montrait une surexpression cytoplasmique. En effet, les taux de HuR cytoplasmiques dans les échantillons tumoraux était égaux dans 4 tumeurs et plus faibles dans 3 en comparaison aux tissus sains correspondants (Figure 2B).

Ces résultats suggèrent fortement que HuR est surexprimé dans les tumeurs de CCC par rapport aux tissus sains. Cette surexpression semble être indépendante du VHL mais liée au stade tumoral.

Effet de l'inhibition de HuR sur la prolifération cellulaire

Pour étudier le rôle de HuR dans la carcinogénèse du CCC humain, nous avons inhibé son expression par la technique de siARN spécifique de HuR. Cette transfection transitoire des cellules de CCC avec un siHuR résulte en une inhibition temps dépendante de son expression pour atteindre une inhibition quasi-complète 96h après transfection (Figure 3A).

HuR ayant d'ores et déjà été impliqué dans la prolifération cellulaire dans divers cancers mais jamais dans le CCC, nous avons donc les effets de son inhibition sur la croissance cellulaire. Comme illustré dans la figure 3B, le knockdown de HuR entraîne une inhibition temps dépendante de la densité cellulaire, jusqu'à -60% à 96h. L'effet de HuR sur la prolifération cellulaire a été évalué par incorporation de BrdU, il apparaît effectivement que les cellules transfectées par un siHuR prolifèrent moins vite que celles transfectées par un siCtl (Figure 4A). HuR est donc bien impliqué dans la prolifération des cellules tumorales de CCC.

Effet de l'inhibition de HuR sur la mort cellulaire induite.

Outre son rôle dans la régulation de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, HuR contrôle également la protection à l'apoptose des cellules. Nous avons donc regardé si l'inhibition de HuR induit l'apoptose dans le CCC humain par la technique du FACS. Nous avons ainsi établi que l'inhibition de HuR induit l'apoptose de 25% des cellules tumorales à 72 et 96h après transfection (Figure 4B). Aucune nécrose n'a été observée. HuR est donc un médiateur de la prolifération cellulaire mais est également impliqué dans la croissance cellulaire via une induction de la survie cellulaire dans le CCC humain.

Effet de l'inhibition intratumorale de HuR dans le CCC humain in vivo

Pour vérifier *in vivo* la pertinence de nos résultats obtenus *in vitro*, nous avons utilisé des souris nude xénogréffées en sous cutané avec des tumeurs de cellules 786-0. Les souris ont été séparées en 2 groupes de 10, recevant soit un siCtl soit un siHuR, par injection intratumorale. L'inhibition intratumorale de HuR inhibe fortement la croissance des tumeurs, de l'ordre de 70% par rapport au groupe siCtl (Figure 5). De façon intéressante, nous avons pu observer des régressions partielles chez certaines souris. Toutes les souris ont vu leur poids rester constant, sans aucune différence entre les 2 groupes.

A la fin du traitement, les tumeurs ont été récupérées et les protéines extraites. Les analyses par western blot ont montré que l'expression de HuR était effectivement substantiellement diminuée dans les tumeurs traitées par siHuR comparé aux tumeurs ayant reçu le siCtl, confirmant le ciblage de HuR par siARN *in vivo*.

Les analyses immunohistochimiques ont révélé que l'index prolifératif (Ki67) est de l'ordre de 40 et 70% dans les tumeurs traitées par siHuR ou siCtl respectivement. Quant à l'index apoptotic déterminé par TUNEL, il est 2 fois plus élevé dans le groupe siHuR que dans le groupe siCtl. L'évaluation de la néovascularisation est en cours.

Ainsi, ces résultats démontrent que HuR joue également un rôle crucial dans la croissance du CCC humain *in vivo*. Comme observé *in vitro*, cet effet passe par une stimulation de la prolifération cellulaire ainsi qu'une inhibition de l'apoptose.

Effet de l'inhibition de HuR sur l'expression des cibles en aval in vitro et in vivo

Nous avons mesuré l'expression du VEGF, une cible connue de HuR dans les surnageants de cellules 786-0 transfectées par un siCtl ou par un siHuR ainsi que dans les protéines des tumeurs de souris xénogréffées. Les résultats montrent que l'inhibition de HuR diminue de 40% l'expression du VEGF dans les surnageants cellulaires, et ce à partir de 48h post-transfection. Dans les tumeurs de souris traitées par siHuR, l'expression du VEGF était diminuée de 30% par rapport aux souris contrôle. Dans ces tumeurs, nous avons également observé une diminution de plus 40% de l'expression du TGF- β 1. L'expression de cette cible post-transcriptionnelle de HuR est en cours d'analyse dans les surnageants des lignées cellulaires inhibées pour HuR.

4- Discussion

Les séquences riches en AU contenues dans les régions 3'UTR des ARNm labiles sont largement impliquées dans la régulation du *turn-over* des ARNm, en interagissant avec les protéines de stabilisation/déstabilisation de l'ARNm. Il existe de nombreuses protéines de liaison aux éléments riches en AU dont la plupart sont des protéines de déstabilisation qui favorisent la dégradation des ARNm, et certaines, comme HuR stabilisent les ARNm et augmentent leur traduction. De façon intéressante, tout comme les autres membres de la famille des protéines ELAV, HuR est principalement nucléaire mais subit une translocation nucléaire-cytoplasmique en réponse à divers stimuli, ceci grâce à un domaine HNS présent dans sa région basique. Ce déplacement nucléo-cytoplasmique est lié à sa fonction stabilisatrice des ARNm et modulatrice de la traduction et est régulé au moins par 4 voies de signalisation, à savoir les voies MAPK, AMPK, PKC et PI3K/Akt. Cette dernière présente un intérêt particulier puisqu'elle a été montrée comme constitutivement activée et impliquée dans la survie cellulaire dans le CCC humain lors de précédents travaux du laboratoire (Sourbier et al., 2006). De la même manière, l'activation des voies de la PKC et des MAPK ainsi que leur implication dans la croissance des cellules tumorales ont déjà été rapportées dans le CCC humain. Bien que les mécanismes précis du déplacement nucléo-cytoplasmique de HuR ne soit pas totalement élucidés, de récents travaux prônent pour un rôle important de la phosphorylation de HuR par la PKC, la ChK2 et probablement d'autres kinases. Les mécanismes de la stabilisation des ARNm par HuR ne sont eux non plus pas totalement connus mais sont liés à sa capacité à les protéger de la machinerie de dégradation ou à empêcher la liaison de protéines déstabilisatrices. La régulation de la demi-vie des ARNm est un mécanisme très important dans la transformation maligne des cellules puisque les ARNm concernés par cette régulation codent principalement pour des oncogènes, des facteurs de croissance, des facteurs de survie ainsi que des facteurs angiogéniques et des protéines essentielles à la migration cellulaire et à l'invasion. Chez l'homme, le gène HuR est localisé sur le chromosome 19p13.2, un locus associé à diverses translocations à l'origine d'une augmentation du caractère oncogénique des cellules tumorales bien qu'aucune mutations du gène HuR n'ait encore été rapportées dans les cancers. Cependant, depuis que la propriété de HuR à stabiliser les ARNm a été découverte il y a une dizaine d'années, beaucoup d'études ont clairement montré une corrélation entre son expression cytoplasmique et le caractère tumoral des cellules ainsi que la survie des patients, comme dans les cancers du sein, du poumon, du colon ou des ovaires (Blaxall et al., 2000; Denkert et al., 2004; Erkinheimo et al.,

2003; Lopez de Silanes et al., 2005). La surexpression de HuR, ainsi que l'activation de son déplacement cytoplasmique ont été observées dans de nombreuses conditions de stress dans le rein comme par exemple en cas d'acidité métabolique ou lors d'une déplétion en ATP (Ibrahim et al., 2008; Jeyaraj et al., 2006). Dans cette étude, nous montrons tout d'abord que HuR est exprimé dans le CCC humain *in vitro* et *in vivo*, ainsi que dans les tissus sains, en accord avec son expression ubiquitaire (Lopez de Silanes et al., 2005). Dans tous les stades tumoraux, nous avons également observé une expression de HuR total et nucléaire significativement plus importante que dans les tissu sains. Dans le cytoplasme, une plus forte expression de HuR dans les tumeurs par rapport aux tissus sains est observée dans les stades précoces mais pas dans les stades avancés, suggérant que l'activation de HuR par déplacement cytoplasmique joue un rôle important dans l'initiation du phénotype malin des cellules de CCC. Nos résultats confortent et complètent les observation précédentes (Lopez de Silanes et al., 2003) qui ont étudié la localisation subcellulaire de HuR dans un panel de tumeurs humaines (182 tumeurs et 135 tissus sains correspondants au total) dont 9 CCR et qui ont observé par immunohisto

chimie que l'expression relative de HuR dans les tumeurs par rapport aux tissus sains était de 0,8 dans le noyau et 1,6 dans le cytoplasme. Cependant dans cette étude, le sous-type des CCR analysés n'est pas précisé, le stade inconnu et l'analyse de la distribution de HuR n'a pas été faite cas par cas. Par conséquent, le déplacement apparent de HuR vers le cytoplasme est difficile à interpréter et pourrait refléter l'analyse d'un groupe de CCR hétérogènes. La question de savoir si l'expression et/ou la distribution de HuR a une pertinence pronostique dans le CCC, comme cela a déjà été montré dans les types de cancers cités précédemment est en cours d'investigation dans notre laboratoire sur une puce à tissu construite à partir de 241 tumeurs et des tissus sains correspondants.

Dans le CCC humain, il a été montré que HuR est impliquée dans l'augmentation VHL-dépendante de la traduction de p53, or plus récemment, il a été décrit que le VHL peut interagir avec HuR (Datta et al., 2005). Cette interaction a lieu entre le domaine de liaison à l'élongine du VHL et le RRM1 de HUR et a pour conséquence d'inhiber la stabilisation HuR-dépendante de l'ARNm du VEGF et donc l'expression du VEGF. Ces 2 effets ont été observés *in vitro* et sont en accord avec la fonction suppresseur de tumeur du VHL dans le CCC. L'augmentation de la traduction de p53 via la liaison de HuR dans sa région 3'UTR a également été observée dans les cellules de carcinome colorectal RKO exposées aux UV (Mazan-Mamczarz et al., 2003). Cette localisation cytoplasmique de HuR a été montrée

comme induite par une exposition aux UV dans différents types cellulaires, suggérant un rôle de HuR dans la régulation de la réponse cellulaire aux UV via la stabilisation d'ARNm spécifiques comme celui codant pour p21 (Wang et al., 2000). Cependant dans cette dernière étude, un lien avec le VHL n'a pas été recherché.

Au cours de nos travaux, nous n'avons pas observé de différence d'expression de HuR en relation avec le statut en VHL des cellules, ni dans notre panel de lignées cellulaires de CCC, ni dans les cellules 786-0 déficientes en VHL et transfectées par un VHL sauvage ou un VHL muté. Ces résultats ne corroborent pas ceux obtenus par Galban et al (2003) dans ces mêmes cellules 786-0 mais sont en accord avec ceux de Datta et al, toujours dans ces mêmes cellules. En effet, Galban et al montraient que la réintroduction du gène VHL dans les cellules 786-0 était à l'origine non seulement d'une augmentation de l'expression totale de HuR mais également d'une augmentation de sa présence cytoplasmique. Il apparaît donc évident que ces différences d'expression et de localisation subcellulaire de HuR observées par nous-mêmes et Datta et al et ceux obtenus par Galban et al demandent les études supplémentaires.

Une des observations les plus importantes faites lors de nos travaux est la démonstration que HuR participe à la croissance cellulaire du CCC humain. Ceci a été observé *in vitro* mais également *in vivo* chez la souris nude xéno greffée. A notre connaissance, ceci est la première démonstration d'un effet anti-tumoral de l'inhibition de HuR *in vitro* et *in vivo*, mettant en évidence l'importance de HuR dans la carcinogénèse des CCC. Bien que cela puisse paraître surprenant étant donné les propriétés biologiques de HuR, l'impact de son inhibition sur la croissance tumorale n'a jamais été étudié dans nombre de cancers. En effet, une large majorité des études portant sur HuR se sont focalisées sur sa capacité à stabiliser et/ou à transcrire les ARNm codant pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie, la migration l'invasion, l'angiogénèse et l'immunosuppression ou sur son rôle pronostique en terme de survie des patients dans différents cancers. Ces études ont apporté de forts arguments quant à son rôle potentiel à promouvoir la croissance tumorale, mais ces arguments restent indirects et seules quelques études décrivent des régulations post-transcriptionnelles impliquant HuR avec comme conséquence un effet *in vitro* sur la prolifération, la survie et l'invasion cellulaire notamment dans les cancers du sein et du colon. De plus, l'implication de HuR dans un modèle *in vivo* n'a encore jamais été décrit à l'exception des travaux de Lopez et Silanes (2003) sur le cancer du colon. Dans ces travaux, les auteurs montrent que les cellules RKO, surexprimant HuR après transfection, prolifèrent plus rapidement *in vitro* et que les tumeurs obtenues chez la souris nude par xéno greffe se développent plus rapidement et

atteignent un volume plus important alors que ces mêmes cellules transfectées avec un HuR antisens prolifèrent moins vite et donnent des tumeurs moins importantes. Dans cette étude les auteurs ont utilisé des cellules transformées *in vitro* avant d'être implantées chez la souris nude.

Dans la présente étude, nous avons utilisé des siARN spécifiques de HuR pour l'inhiber dans les cultures cellulaires ainsi que dans des tumeurs xénotransplantées. L'effet anti-tumoral de l'inhibition de HuR était obtenu via une inhibition de la prolifération ainsi qu'une augmentation de l'apoptose, ce qui est cohérent avec les cibles connues de HuR. En effet, HuR stabilise entre autres les ARNm des cycline A, B1, D1, de myc et de fos, impliqués dans la division cellulaire, mais stabilise également ceux de Bcl-2, Pro α et COX 2 intervenant dans l'apoptose. L'effet de cette inhibition de HuR sur l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt, NF- κ B et MAPK est en cours d'étude. Les résultats préliminaires sont encourageants puisqu'il semble en effet y avoir une inhibition de l'activation constitutive de ces voies de signalisation qui sont largement impliquées dans la tumorigénèse des CCC (Huang et al., 2008; Sourbier et al., 2007; Sourbier et al., 2006). Si tel est le cas, l'inhibition de ces voies pourrait être due à l'inhibition des facteurs de croissance tels que EGF, PDGF, VEGF et TGF- β 1 et/ ou de leurs récepteurs connus pour être impliqués dans la croissance des CCC. En effet, HuR joue un rôle important dans la surexpression de tels facteurs dont le VEGF et le TGF- β 1 or nous avons montré que leur expression est diminuée dans les tumeurs de souris nude xénotransplantées et inhibées pour HuR. VEGF voit également son expression diminuer *in vitro* après l'inhibition de HuR. Ainsi, cibler HuR semble affecter le phénotype tumoral des cellules non seulement via une diminution de l'expression de ses cibles, mais également via une inhibition des voies de signalisation activées par directement ou indirectement par les produits de ces cibles.

Nos résultats obtenus *in vivo* par injection intratumorale de siHuR démontrent la faisabilité mais aussi et surtout l'efficacité d'une telle approche à cibler HuR. D'un point de vue thérapeutique, les applications de l'injection intratumorale de siARN semblent limitées du fait du mode d'administration lui-même. Cependant et de façon très intéressante, (Meisner et al., 2007) ont récemment décrit des inhibiteurs de HuR de bas poids moléculaires. Il s'agit de la déhydromucétatine, du MS-444 et de l'okicénone, des molécules déjà décrites comme des agents anti-tumoraux via l'inhibition d'autres protéines. Bien que cette constatation pose la question de la spécificité de ces composés, ils pourraient s'avérer être des outils utiles pour le design de nouvelles drogues anti-HuR utilisables en thérapies.

Ainsi, notre étude met en évidence le rôle important que joue la protéine de liaison à l'ARN HuR dans la tumorigénèse des CCC et montre que le ciblage de cette protéine par siARN ou plus vraisemblablement par des composés chimiques seuls ou en combinaison avec d'autres molécules anti-cancéreuses, pourrait s'avérer être une nouvelle option prometteuse dans le traitement de ce cancer qui reste majoritairement réfractaire aux thérapies. De plus, le fait que le composé MS-444 ait été démontré comme non toxique pour la souris nude malgré l'expression ubiquitaire de HuR suggère que cette protéine n'est pas essentielle à la survie des cellules chez l'adulte, ce qui est favorable à l'inhibition de HuR comme approche anti-cancéreuse.

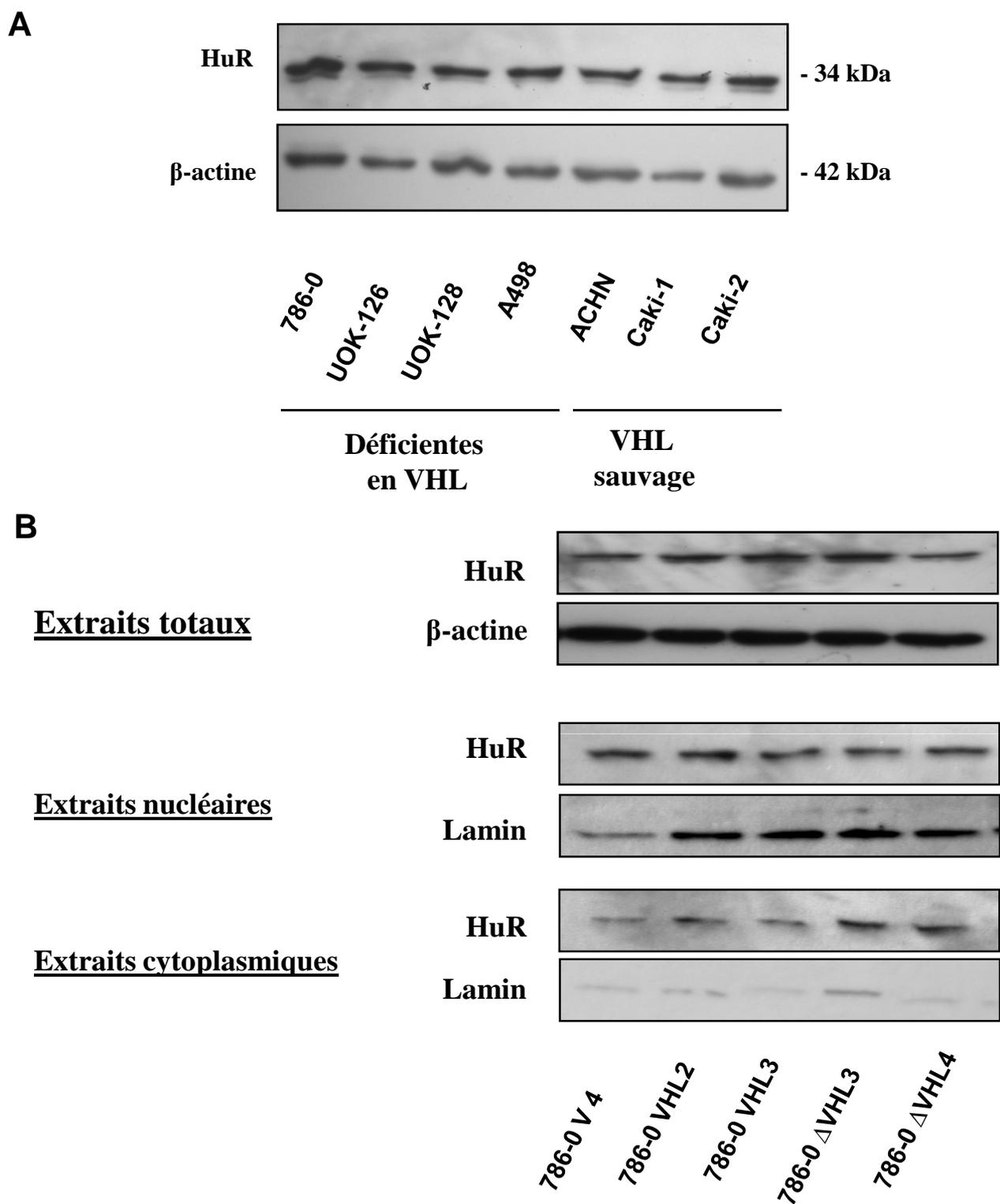


Figure 1 : HuR est exprimée dans le CCC humain indépendamment du statut en VHL *in vitro*. (A) Analyse par western blot de l'expression totale de HuR dans les lysats de lignées cellulaires de CCC. La β -actine a été utilisée comme gène domestique. (B) Analyse par western blot de l'expression totale et subcellulaire de HuR dans les cellules 786-0, 786-0 V , 786-0 VHL et 786-0 Δ VHL. La lamin B1 a été utilisée pour vérifier la bonne séparation des protéines nucléaires et cytoplasmiques. Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

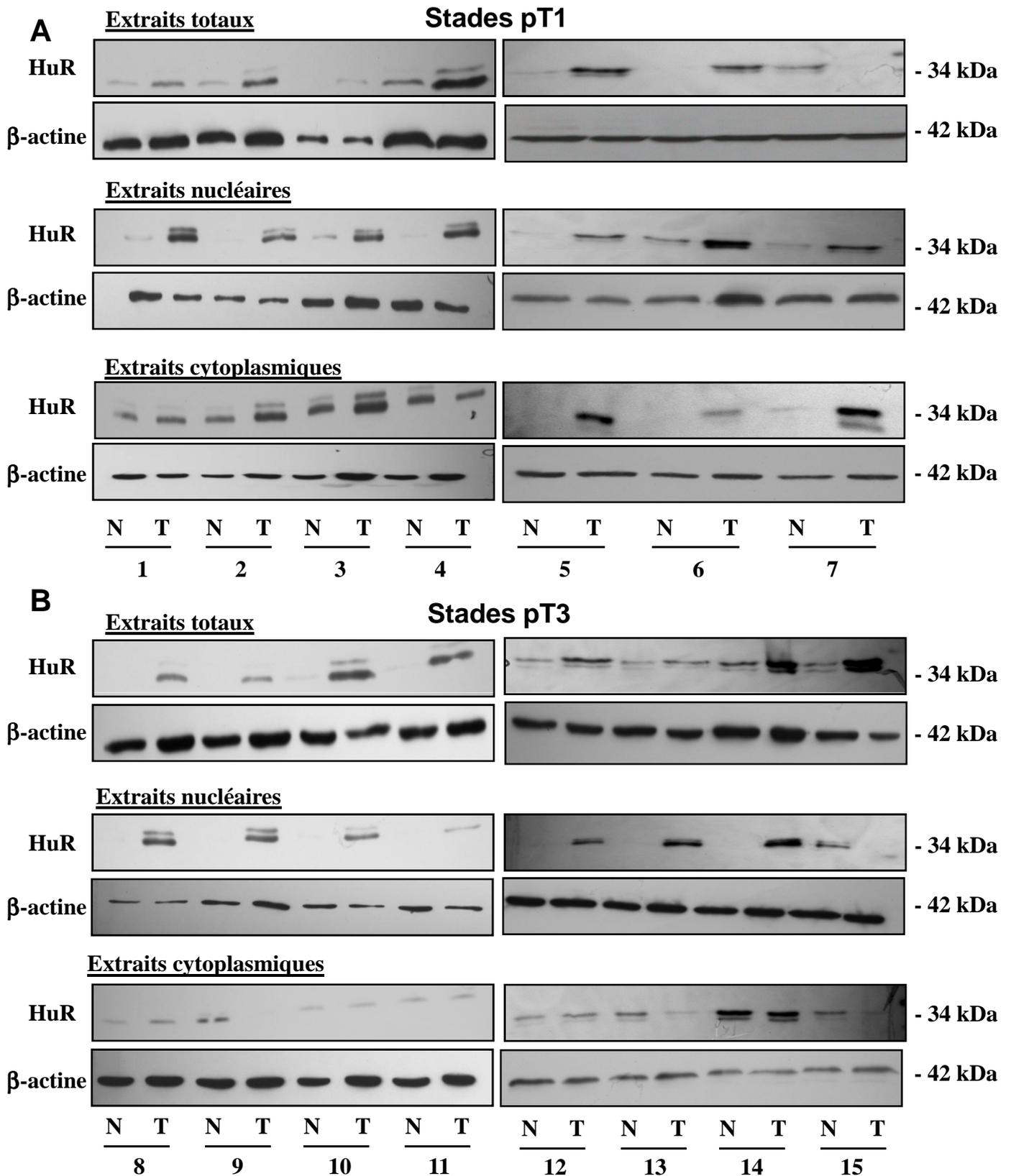


Figure 2 : HuR est surexprimé dans les tumeurs de CCC humain et activé dans les stades précoces. Analyse par western blot de l'expression de HuR dans des lysats cellulaires totaux, nucléaires ou cytoplasmiques de fragments tumoraux (issus de patients ayant des tumeurs de stade pT1 ou pT3) et des tissus sains correspondants. Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

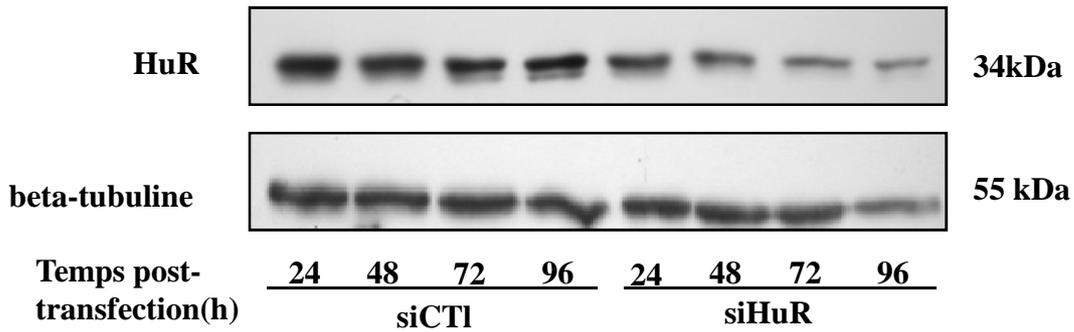
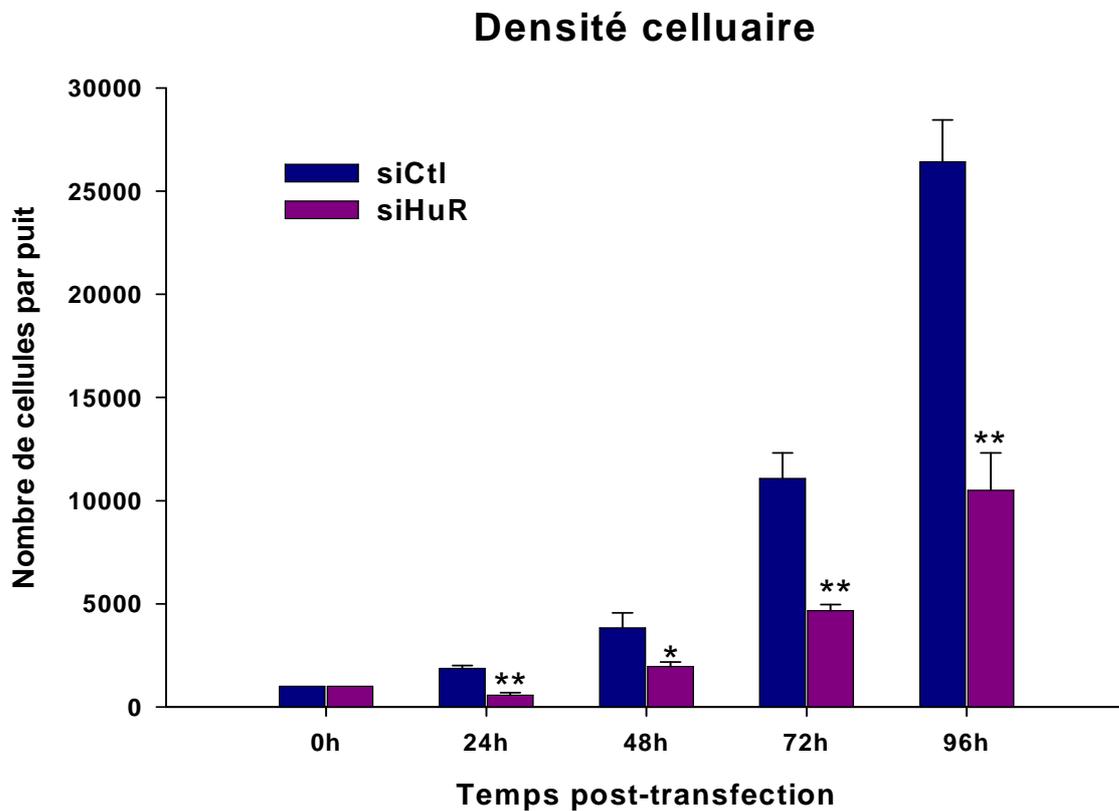
A**B**

Figure 3 : L'inhibition de HuR inhibe la croissance cellulaire *in vitro*. (A) Analyses par western blot de l'expression totale de HuR dans les cellules 786-0 transfectées par un siCtl ou un siARN de 0 à 96h comme indiqué dans la figure. Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes. (B et C) Effets de la transfection des cellules 786-0 par siCtl ou siHuR sur leur prolifération. (B) Les cellules ont été transitoirement transfectées par siCtl ou siHuR de 0 à 96h et les cellules adhérentes sont comptées à 24, 48, 72 et 96h post-transfection. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=6, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ par rapport au siCtl.

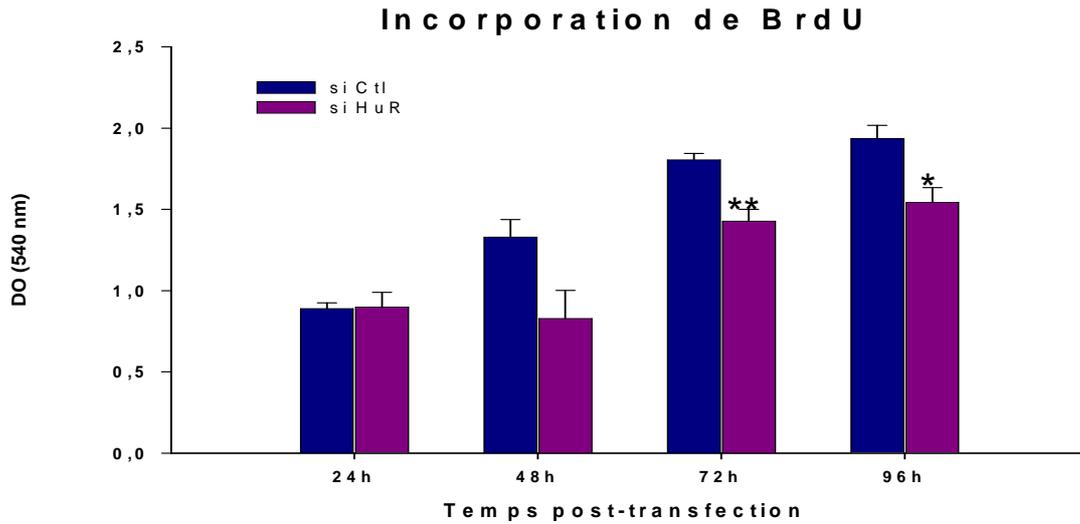
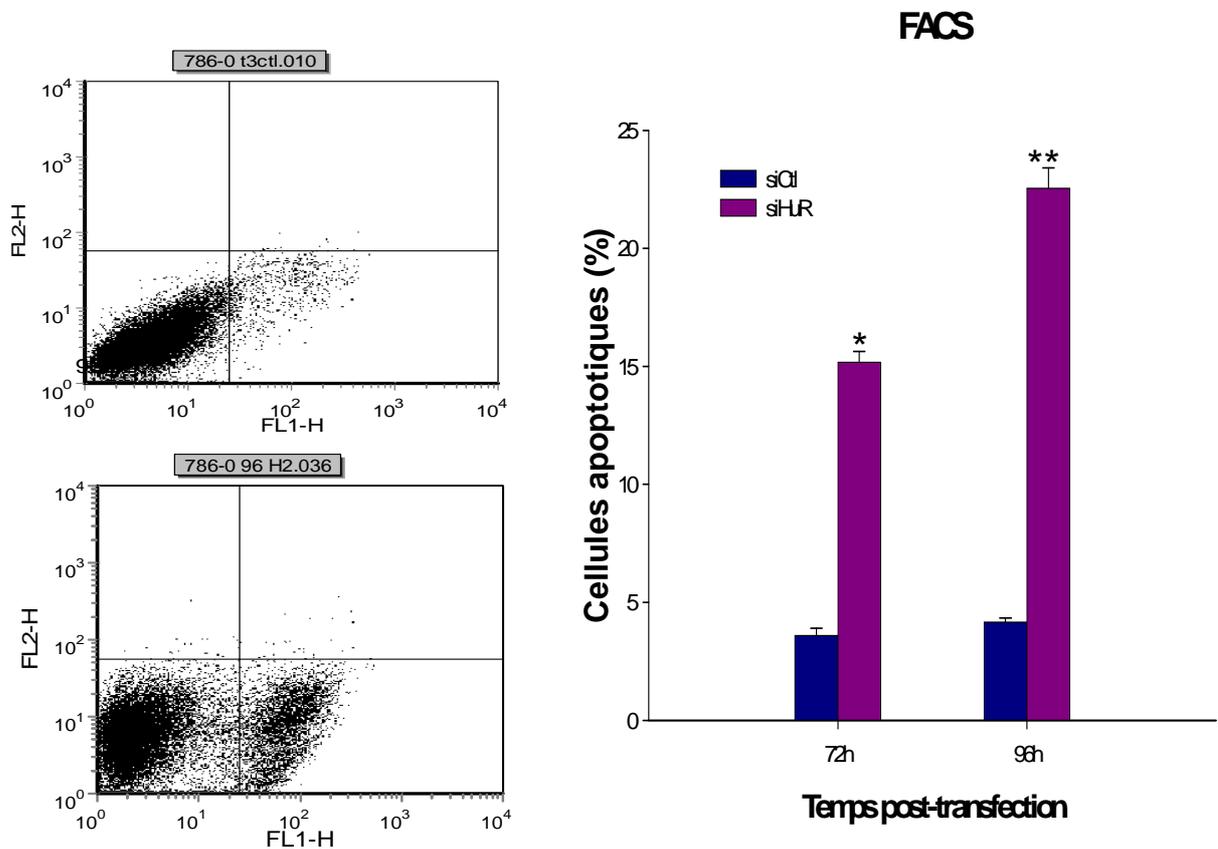
A**B**

Figure 4 : L'inhibition de HuR diminue la prolifération cellulaire et induit l'apoptose *in vitro*. (A) Les cellules ont été transitoirement transfectées par siCtl ou siHur de 0 à 96h et l'incorporation de BrdU a été mesurée à 24, 48, 72 et 96h post-transfection. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, $n=4$, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ par rapport au siCtl. (B) Analyses par FACS à 72 et 96h post-transfection des cellules 786-0 transfectées par siCtl ou siHuR. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, $n=3$, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ par rapport au siCtl. (B) Exemples d'analyse par FACS. Aucune nécrose n'a été observée

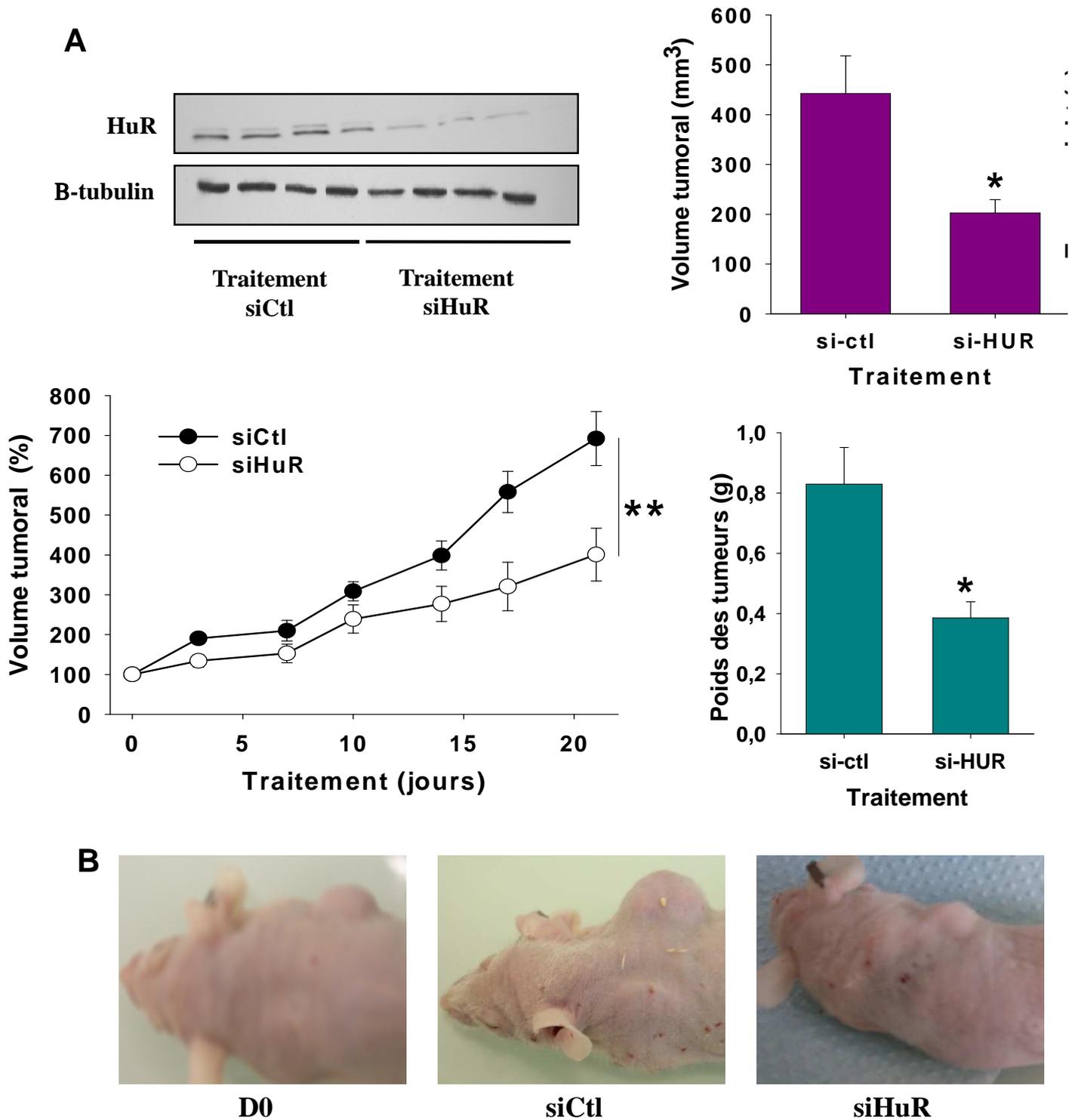


Figure 5 : L'inhibition de HuR inhibe la croissance tumorale du CCC *in vivo* chez la souris nude. (A) Analyse par western blot de l'expression de HuR dans les lysats cellulaires de tumeurs 786-0 xéno greffées chez la souris nude puis traitées par transfection de siCtl ou siHuR. Les résultats présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes. La croissance des tumeurs chez les souris nude xéno greffées et traitées pendant 21 jours par siCtl ou siHuR (10nmol/kg, 2 fois/semaine) en injection intratumorale. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=9 pour chaque groupe, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ par rapport au siCtl. A la fin du traitement, les souris sont sacrifiées et les tumeurs prélevées, pesées et mesurées. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=9 pour chaque groupe, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ par rapport au siCtl. (B) Photographies des tumeurs implantées dans une souris représentative du premier jour de traitement (gauche, jour 0), dans une souris représentative du groupe traité par siCtl (milieu, jour 21) et dans une souris représentative du groupe traité par siHuR (droite, jour 21).

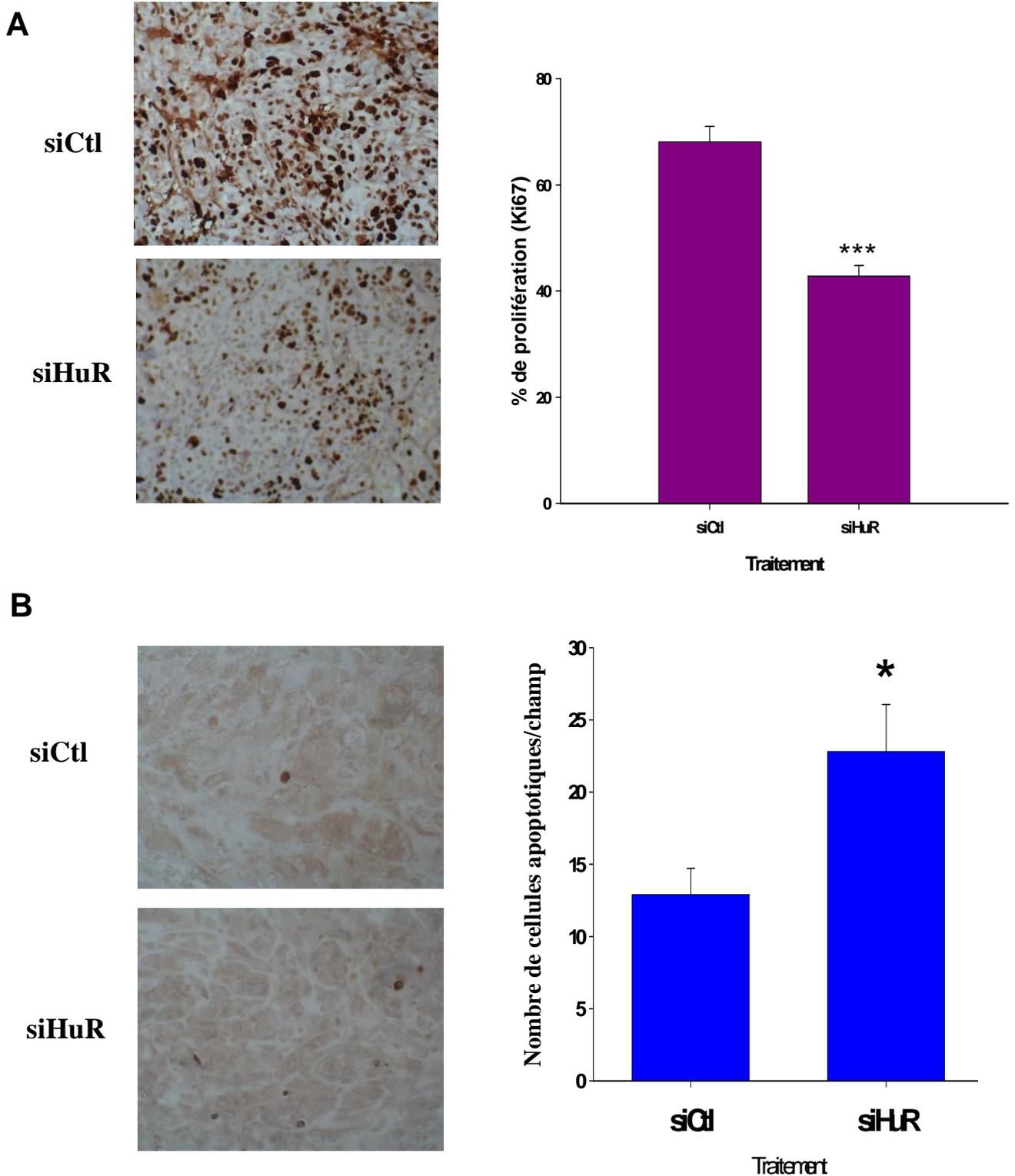


Figure 6 : L'inhibition de HuR inhibe la croissance tumorale via une induction de l'apoptose et une inhibition de la prolifération cellulaire. (A) Sections de tumeurs traitées par siCtl ou siHuR immunomarquées avec un anticorps anti-Ki67 (gauche). Quantification du marquage des cellules par le Ki67 (index prolifératif) (gauche). (B) Sections de tumeurs traitées par siCtl ou siHuR soumises à un marquage par TUNEL (gauche). Quantification du marquage par TUNEL (index apoptotic) (droite). Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=9 pour chaque groupe, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ par rapport au siCtl

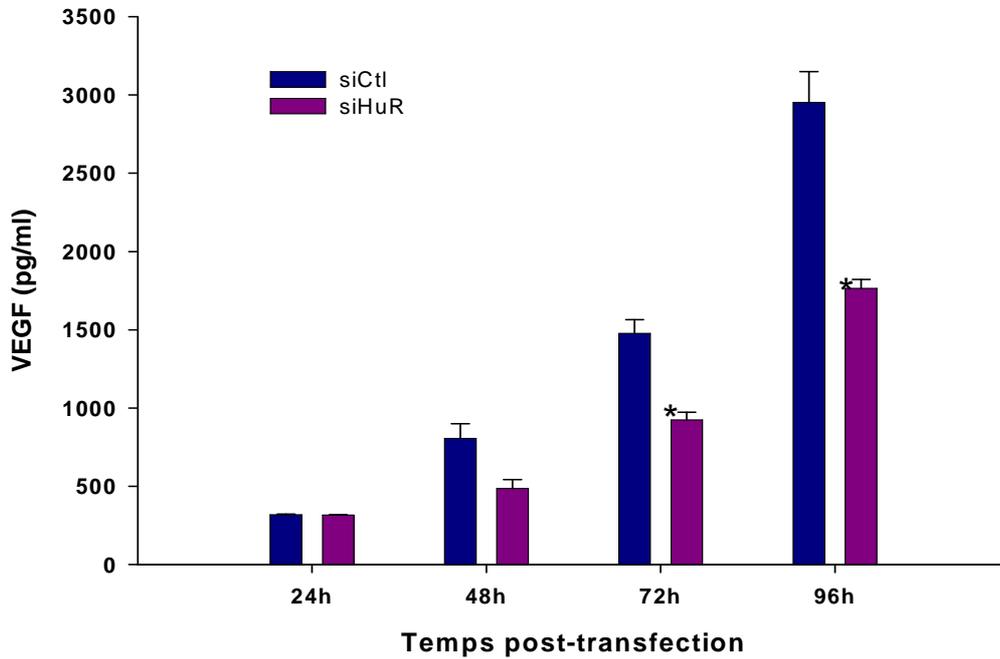
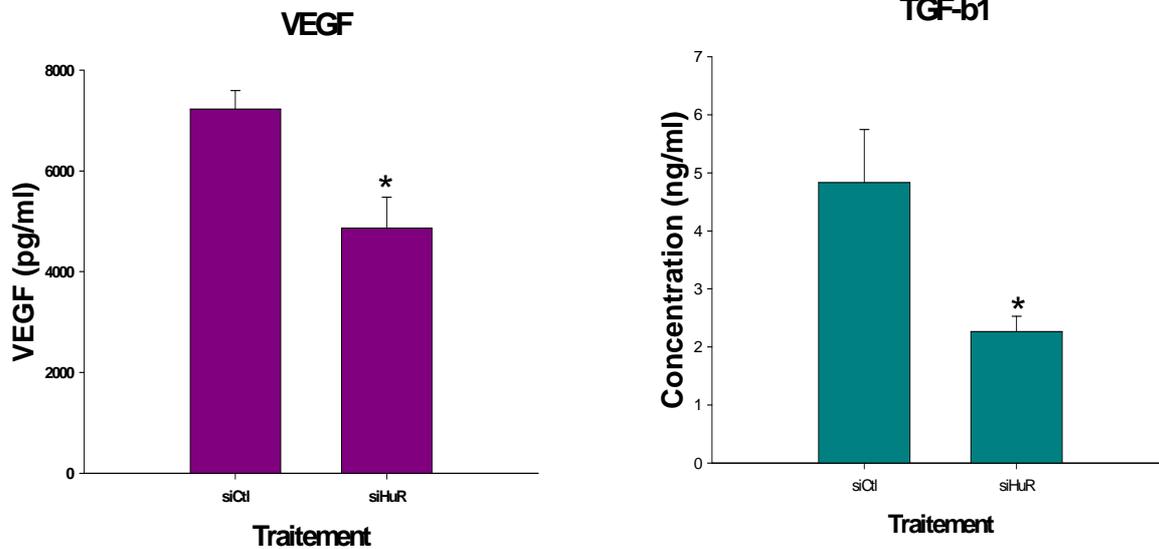
A**VEGF****B**

Figure 7 : L'inhibition de HuR inhibe l'expression du VEGF et du TGF-β1. (A) Mesure par ELISA de l'expression du VEGF dans les surnageants des culture de cellules 786-0 transfectées par siCtl ou siHuR de 0 à 96h (gauche) et dans les lysats cellulaires de tumeurs 786-0 xéno greffées chez la souris nude et traitées par siCtl ou siHuR (droite). Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=4 pour chaque groupe, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ par rapport au siCtl. (B) Mesure par ELISA de l'expression du TGF-β1 dans les lysats cellulaires de tumeurs 786-0 xéno greffées chez la souris nude et traitées par siCtl ou siHuR. Les résultats sont présentés comme la moyenne \pm E.S.M, n=4 pour chaque groupe, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ par rapport au siCt

Chapitre 5 : Conclusion générale et perspectives

Les travaux présentés dans ce mémoire avaient pour objectif d'identifier les protéines de stabilisation/déstabilisation de l'ARNm impliquées dans la stabilisation de l'ARNm de la PTHrP ainsi que dans celle des ARNm d'autres cibles du système VHL/HIF et d'étudier leur l'impact de leur blocage sur la croissance du CCC humain.

Nous avons tout d'abord montré que les 3 isoformes de la PTHrP sont exprimés dans les lignées cellulaires de CCC, mais que l'isoforme 141 est largement prédominant puisqu'il représente 70 à 80% de l'ensemble des ARNm de la PTHrP et les isoformes 139 et 173 seulement 5 et 20% respectivement. En utilisant des cellules 786-0 déficientes en VHL non transfectées ou transfectées soit par un vecteur vide soit par un vecteur codant pour un VHL sauvage ou une forme mutée du VHL incapable de se lier aux facteurs HIF- α , nous avons également montré que le VHL diminue de 50% l'expression des ARNm de la PTHrP. Ces résultats, en accord avec les précédents travaux du laboratoire identifiant la PTHrP comme une nouvelle cible du VHL, nous ont également permis de montrer que la réintroduction du VHL n'affecte pas le profil d'expression des isoformes et que le VHL ne régule donc pas préférentiellement l'une ou l'autre des isoformes de la PTHrP. L'étude de l'expression de ces isoformes dans les clones Δ VHL a également démontré que l'effet inhibiteur du VHL sur l'expression de la PTHrP requière sa liaison aux facteurs HIF- α . Enfin, l'étude du profil d'expression des ARNm de la PTHrP *in vivo* dans des échantillons de tissus tumoraux et de tissus sains correspondants a montré que le profil observé *in vitro*, à savoir une large prépondérance de l'isoforme 141 suivi des isoformes 173 et 139, se vérifie *in vivo* et que la transformation tumorale des cellules ne semble pas être à l'origine d'une expression différentielle des isoformes de la PTHrP.

En ce qui concerne les protéines de liaison aux ARNm de la PTHrP et intervenant dans la régulation de leur stabilité, nous avons identifié la protéine HuR comme jouant un rôle majeur. En effet, nous avons pu observer que l'inhibition de cette protéine par siARN, *in vitro* dans les cellules 786-0, entraîne une diminution du taux d'expression des ARNm de la PTHrP, jusqu'à -90% à 96h post-transfection. Dans le même temps, les ARNm du VEGF et du TGF- β voient leur expression diminuée jusqu'à -70%. Ainsi, nous avons identifié une protéine de stabilisation de l'ARNm de la PTHrP qui, en accord avec notre hypothèse de départ, participe également à la régulation de la stabilité d'autres cibles du système VHL/HIF dans le CCC humain.

Nous nous sommes donc intéressé au rôle de cette protéine HuR dans la croissance du CCC et la première partie du travail a consisté à étudier son expression totale ainsi que sa localisation subcellulaire *in vitro* et *in vivo*. En effet, les données de la littérature montraient que cette protéine est majoritairement nucléaire mais que sous l'influence de stimuli, elle transloque vers le cytoplasme où, liée aux ARNm, elle les prévient de la dégradation notamment exosomale. Nous avons montré que HuR est exprimée dans toutes nos lignées cellulaires de CCC et que sa localisation subcellulaire ne semble pas être dépendante du VHL. Nous avons également observé que cette protéine est surexprimée dans les CCC humains par rapport aux tissus sains correspondants et que sa présence cytoplasmique est augmentée dans les stades précoces (pT1) mais pas dans les stades plus tardifs (pT3), suggérant qu'elle est requise dans les stades précoces de la transformation maligne. Enfin, nous avons montré qu'elle joue un rôle majeur dans la croissance du CCC *in vitro* et *in vivo*. En effet, son inhibition par siARN HuR dans les lignées cellulaires ou chez la souris nude xéno greffée entraîne une diminution de l'ordre de 60% de la croissance cellulaire, via une inhibition de la prolifération cellulaire et via une induction de l'apoptose tumorale. Cette inhibition de HuR a également pour conséquence d'inhiber l'expression des facteurs de croissance VEGF et TGF- β 1, ce qui montre que le blocage de cette seule protéine permet de diminuer simultanément l'expression de plusieurs cibles du système VHL/HIF. Autre fait important, l'inhibition de HuR semble diminuer l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt, AMPK et NF- κ B, une observation qui n'est que préliminaire et qui demande à être confirmée par l'étude de l'expression totale et de la phosphorylation des acteurs de ces voies. Toutefois, si ce résultat était confirmé, il serait tout à fait intéressant puisque cela signifierait que l'inhibition de HuR entraîne une inhibition simultanée de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la cancérogénèse.

Ainsi, ce travail de thèse a permis d'établir le profil d'expression des isoformes de la PTHrP dans le CCC humain et d'identifier la protéine stabilisatrice des ARNm HuR comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement du CCC. En ce qui concerne la suite immédiate de ces travaux, l'étude de la néovascularisation dans les tumeurs xéno greffées chez la souris nude traitée par injection intra-tumorale de siARN HuR ou de siARN contrôle est en cours. Ceci nous permettra d'établir si oui ou non l'inhibition de l'expression de facteurs angiogéniques comme le VEGF, observée dans les tumeurs, est suffisante pour inhiber l'angiogénèse. L'étude de l'inhibition des voies de signalisation AMPK, PI3K/Akt et NF- κ B est également en cours. L'inhibition de telles voies de signalisation lorsque HuR ne remplit plus son rôle de protéine stabilisatrice des ARNm soulève la question de l'impact de

cette inhibition sur l'expression et surtout la localisation subcellulaire de HuR elle-même. En effet, cette protéine comporte des sites de phosphorylation, or lorsqu'elle est phosphorylée notamment par la PKC α , ou CDK1, elle se trouve séquestrée dans le noyau. Ainsi, il sera intéressant de rechercher si l'inhibition de voies de signalisation suite à une perte d'expression de HuR n'est pas un moyen pour la protéine d'inhiber sa propre phosphorylation de manière à favoriser son déplacement cytoplasmique et donc d'être plus active dans son rôle. Une autre question soulevée par cette étude est la signification physiologique de l'interaction d'ores et déjà démontrée entre le domaine de liaison à l'élongine C du VHL et le RRM1 de HUR. Comprendre cette interaction et son impact sur la capacité de HuR à promouvoir la croissance tumorale permettra sans doute d'expliquer les observations contradictoires qui ont pu être faites par nous-même et Datta et al. (2005) ainsi que par Galban et al. (2008). Dans cette optique, il sera par exemple intéressant d'évaluer l'impact de l'inhibition de HuR sur la croissance tumorale dans des lignées cellulaires de CCC exprimant un VHL sauvage et/ou dans les clones de cellules 786-0 transfectées par un VHL sauvage. De plus, s'il s'avère que l'inhibition de HuR dans les cellules exprimant le VHL permet de diminuer l'expression de diverses cibles du système VHL/HIF, ceci aura un intérêt certain dans le traitement d'autres types de cancer. En effet, les tumeurs solides présentent en leur centre des régions hypoxiques dans lesquelles les facteurs HIF- α ne sont plus dégradés malgré l'expression d'un VHL sauvage, ce qui a pour conséquence de les rendre plus résistantes à la radio-, la chimio- et l'hormonothérapie.

Chapitre 6 : Références bibliographiques

A

Aarts, M.M., Levy, D., He, B., Stregger, S., Chen, T., Richard, S., and Henderson, J.E. (1999). Parathyroid hormone-related protein interacts with RNA. *J Biol Chem* 274, 4832-4838.

Abdelmohsen, K., Lal, A., Kim, H.H., and Gorospe, M. (2007). Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle* 6, 1288-1292.

Aghib, D.F., Bishop, J.M., Ottolenghi, S., Guerrasio, A., Serra, A., and Saglio, G. (1990). A 3' truncation of MYC caused by chromosomal translocation in a human T-cell leukemia increases mRNA stability. *Oncogene* 5, 707-711.

Akino, K., Ohtsuru, A., Kanda, K., Yasuda, A., Yamamoto, T., Akino, Y., Naito, S., Kurokawa, M., Iwahori, N., and Yamashita, S. (2000). Parathyroid hormone-related peptide is a potent tumor angiogenic factor. *Endocrinology* 141, 4313-4316.

Al-Aynati, M., Chen, V., Salama, S., Shuhaibar, H., Treleaven, D., and Vincic, L. (2003). Interobserver and intraobserver variability using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 127, 593-596.

Allinson, E.T., and Drucker, D.J. (1992). Parathyroid hormone-like peptide shares features with members of the early response gene family: rapid induction by serum, growth factors, and cycloheximide. *Cancer Res* 52, 3103-3109.

Amling, M., Neff, L., Tanaka, S., Inoue, D., Kuida, K., Weir, E., Philbrick, W.M., Broadus, A.E., and Baron, R. (1997). Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J Cell Biol* 136, 205-213.

Antic, D., and Keene, J.D. (1997). Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression. *Am J Hum Genet* 61, 273-278.

Asadi, F., Faraj, M., Malakouti, S., and Kukreja, S.C. (2001). Effect of parathyroid hormone related protein, and dihydrotestosterone on proliferation and ornithine decarboxylase mRNA in human prostate cancer cell lines. *Int Urol Nephrol* 33, 417-422.

Atkins, M., Regan, M., McDermott, D., Mier, J., Stanbridge, E., Youmans, A., Febbo, P., Upton, M., Lechpammer, M., and Signoretti, S. (2005). Carbonic anhydrase IX expression predicts outcome of interleukin 2 therapy for renal cancer. *Clin Cancer Res* 11, 3714-3721.

B

Bakre, M.M., Zhu, Y., Yin, H., Burton, D.W., Terkeltaub, R., Deftos, L.J., and Varner, J.A. (2002). Parathyroid hormone-related peptide is a naturally occurring, protein kinase A-dependent angiogenesis inhibitor. *Nat Med* 8, 995-1003.

Baldewijns, M.M., van Vlodrop, I.J., Schouten, L.J., Soetekouw, P.M., de Bruine, A.P., and van Engeland, M. (2008). Genetics and epigenetics of renal cell cancer. *Biochim Biophys Acta* 1785, 133-155.

Banks, R.E., Tirukonda, P., Taylor, C., Hornigold, N., Astuti, D., Cohen, D., Maher, E.R., Stanley, A.J., Harnden, P., Joyce, A., *et al.* (2006). Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res* 66, 2000-2011.

- Bardos, J.I., and Ashcroft, M. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays* 26, 262-269.
- Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.V., Molinie, F., Danzon, A., Bara, S., *et al.* (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 56, 159-175.
- Benjamin, D., and Moroni, C. (2007). mRNA stability and cancer: an emerging link? *Expert Opin Biol Ther* 7, 1515-1529.
- Bergstrom, A., Hsieh, C.C., Lindblad, P., Lu, C.M., Cook, N.R., and Wolk, A. (2001). Obesity and renal cell cancer--a quantitative review. *Br J Cancer* 85, 984-990.
- Birch, M.A., Carron, J.A., Scott, M., Fraser, W.D., and Gallagher, J.A. (1995). Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP) receptor expression and mitogenic responses in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 72, 90-95.
- Blackshear, P.J. (2002). Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem Soc Trans* 30, 945-952.
- Blankenship, C., Naglich, J.G., Whaley, J.M., Seizinger, B., and Kley, N. (1999). Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity. *Oncogene* 18, 1529-1535.
- Blaxall, B.C., Dwyer-Nield, L.D., Bauer, A.K., Bohlmeyer, T.J., Malkinson, A.M., and Port, J.D. (2000). Differential expression and localization of the mRNA binding proteins, AU-rich element mRNA binding protein (AUF1) and Hu antigen R (HuR), in neoplastic lung tissue. *Mol Carcinog* 28, 76-83.
- Bouzar, Z., Spyros, F., and De vernejoul, M.C. (1999). The parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene: use of downstream TATA promotor and PTHrP 1-139 coding pathways in primary breast cancers vary with the occurrence of bone metastasis. *J Bone Miner Res* 14, 406-414.
- Brennan, C.M., and Steitz, J.A. (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58, 266-277.
- Brewer, G., and Ross, J. (1989). Regulation of c-myc mRNA stability in vitro by a labile destabilizer with an essential nucleic acid component. *Mol Cell Biol* 9, 1996-2006.
- Bruick, R.K., and McKnight, S.L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337-1340.
- Bui, M.H., Seligson, D., Han, K.R., Pantuck, A.J., Dorey, F.J., Huang, Y., Horvath, S., Leibovich, B.C., Chopra, S., Liao, S.Y., *et al.* (2003). Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy. *Clin Cancer Res* 9, 802-811.
- Burtis, W.J., Wu, T., Bunch, C., Wysolmerski, J.J., Insogna, K.L., Weir, E.C., Broadus, A.E., and Stewart, A.F. (1987). Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem* 262, 7151-7156.
- Burton, P.B., and Knight, D.E. (1992). Parathyroid hormone-related peptide can regulate the growth of human lung cancer cells, and may form part of an autocrine TGF-alpha loop. *FEBS Lett* 305, 228-232.

Burton, P.B., Moniz, C., and Knight, D.E. (1990). Parathyroid hormone related peptide can function as an autocrine growth factor in human renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 167, 1134-1138.

C

Cao, H., Tuttle, J.S., and Blackshear, P.J. (2004). Immunological characterization of tristetraprolin as a low abundance, inducible, stable cytosolic protein. *J Biol Chem* 279, 21489-21499.

Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., and Cerami, A. (1986). Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1670-1674.

Chen, C.Y., Gherzi, R., Ong, S.E., Chan, E.L., Raijmakers, R., Pruijn, G.J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., and Karin, M. (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451-464.

Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (1994). Selective degradation of early-response-gene mRNAs: functional analyses of sequence features of the AU-rich elements. *Mol Cell Biol* 14, 8471-8482.

Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20, 465-470.

Chen, C.Y., Xu, N., and Shyu, A.B. (2002). Highly selective actions of HuR in antagonizing AU-rich element-mediated mRNA destabilization. *Mol Cell Biol* 22, 7268-7278.

Clemens, T.L., Cormier, S., Eichinger, A., Endlich, K., Fiaschi-Taesch, N., Fischer, E., Friedman, P.A., Karaplis, A.C., Massfelder, T., Rossert, J., *et al.* (2001). Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br J Pharmacol* 134, 1113-1136.

Cohen, H.T., and McGovern, F.J. (2005). Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 353, 2477-2490.

Conlan, L.A., Martin, T.J., and Gillespie, M.T. (2002). The COOH-terminus of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) interacts with beta-arrestin 1B. *FEBS Lett* 527, 71-75.

Cooperberg, M.R., Mallin, K., Ritchey, J., Villalta, J.D., Carroll, P.R., and Kane, C.J. (2008). Decreasing size at diagnosis of stage 1 renal cell carcinoma: analysis from the National Cancer Data Base, 1993 to 2004. *J Urol* 179, 2131-2135.

D

da Silva, N.F., Gentle, D., Hesson, L.B., Morton, D.G., Latif, F., and Maher, E.R. (2003). Analysis of the Birt-Hogg-Dube (BHD) tumour suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma and colorectal cancer. *J Med Genet* 40, 820-824.

Datta, K., Mondal, S., Sinha, S., Li, J., Wang, E., Knebelmann, B., Karumanchi, S.A., and Mukhopadhyay, D. (2005). Role of elongin-binding domain of von Hippel Lindau gene product on HuR-mediated VPF/VEGF mRNA stability in renal cell carcinoma. *Oncogene* 24, 7850-7858.

- Delahunt, B., Bethwaite, P.B., and Thornton, A. (1997). Prognostic significance of microscopic vascularity for clear cell renal cell carcinoma. *Br J Urol* *80*, 401-404.
- Delahunt, B., Velickovic, M., and Grebe, S.K. (2001). Evolving classification of renal cell neoplasia. *Expert Rev Anticancer Ther* *1*, 576-584.
- Denkert, C., Weichert, W., Winzer, K.J., Muller, B.M., Noske, A., Niesporek, S., Kristiansen, G., Guski, H., Dietel, M., and Hauptmann, S. (2004). Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* *10*, 5580-5586.
- Dhote, R., Pellicer-Coeuret, M., Thiounn, N., Debre, B., and Vidal-Trecan, G. (2000). Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention. *BJU Int* *86*, 20-27.
- DiDomenico, B.J., Bugaisky, G.E., and Lindquist, S. (1982). The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell* *31*, 593-603.
- Dougherty, K.M., Blomme, E.A., Koh, A.J., Henderson, J.E., Pienta, K.J., Rosol, T.J., and McCauley, L.K. (1999). Parathyroid hormone-related protein as a growth regulator of prostate carcinoma. *Cancer Res* *59*, 6015-6022.
- Downey, S.E., Hoyland, J., Freemont, A.J., Knox, F., Walls, J., and Bundred, N.J. (1997). Expression of the receptor for parathyroid hormone-related protein in normal and malignant breast tissue. *J Pathol* *183*, 212-217.
- Dreyfuss, G., Hentze, M., and Lamond, A.I. (1996). From transcript to protein. *Cell* *85*, 963-972.
- Drucker, B.J. (2005). Renal cell carcinoma: current status and future prospects. *Cancer Treat Rev* *31*, 536-545.
- Dulaimi, E., Ibanez de Caceres, I., Uzzo, R.G., Al-Saleem, T., Greenberg, R.E., Polascik, T.J., Babb, J.S., Grizzle, W.E., and Cairns, P. (2004). Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. *Clin Cancer Res* *10*, 3972-3979.

E

- Eberhardt, W., Doller, A., Akool el, S., and Pfeilschifter, J. (2007). Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther* *114*, 56-73.
- Elson, D.A., Thurston, G., Huang, L.E., Ginzinger, D.G., McDonald, D.M., Johnson, R.S., and Arbeit, J.M. (2001). Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev* *15*, 2520-2532.
- Erkinheimo, T.L., Lassus, H., Sivula, A., Sengupta, S., Furneaux, H., Hla, T., Haglund, C., Butzow, R., and Ristimaki, A. (2003). Cytoplasmic HuR expression correlates with poor outcome and with cyclooxygenase 2 expression in serous ovarian carcinoma. *Cancer Res* *63*, 7591-7594.
- Esbrit, P., and Egido, J. (2000). The emerging role of parathyroid hormone-related protein as a renal regulating factor. *Nephrol Dial Transplant* *15*, 1109-1111.
- Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W.M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A.A., *et al.* (2007a). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* *356*, 125-134.

Escudier, B., Pluzanska, A., Koralewski, P., Ravaud, A., Bracarda, S., Szczylik, C., Chevreau, C., Filipek, M., Melichar, B., Bajetta, E., *et al.* (2007b). Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* *370*, 2103-2111.

F

Falzon, M. (1996a). DNA sequences in the rat parathyroid hormone-related peptide gene responsible for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated transcriptional repression. *Mol Endocrinol* *10*, 672-681.

Falzon, M. (1996b). Serum stimulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression in ROS 17/2.8 osteosarcoma cells through transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Endocrinology* *137*, 3681-3688.

Fan, X.C., and Steitz, J.A. (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the *in vivo* stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J* *17*, 3448-3460.

Ferrari, S.L., Behar, V., Chorev, M., Rosenblatt, M., and Bisello, A. (1999). Endocytosis of ligand-human parathyroid hormone receptor 1 complexes is protein kinase C-dependent and involves beta-arrestin2. Real-time monitoring by fluorescence microscopy. *J Biol Chem* *274*, 29968-29975.

Fiaschi-Taesch, N.M., and Stewart, A.F. (2003). Minireview: parathyroid hormone-related protein as an intracrine factor--trafficking mechanisms and functional consequences. *Endocrinology* *144*, 407-411.

Ficarra, V., Guille, F., Schips, L., de la Taille, A., Prayer Galetti, T., Tostain, J., Cindolo, L., Novara, G., Zigeuner, R., Bratti, E., *et al.* (2005). Proposal for revision of the TNM classification system for renal cell carcinoma. *Cancer* *104*, 2116-2123.

Ficarra, V., Martignoni, G., Galfano, A., Novara, G., Gobbo, S., Brunelli, M., Pea, M., Zattoni, F., and Artibani, W. (2006). Prognostic role of the histologic subtypes of renal cell carcinoma after slide revision. *Eur Urol* *50*, 786-793; discussion 793-784.

Fisher, R.I., Rosenberg, S.A., and Fyfe, G. (2000). Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J Sci Am* *6 Suppl 1*, S55-57.

Fuhrman, S.A., Lasky, L.C., and Limas, C. (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* *6*, 655-663.

G

Galban, S., Kuwano, Y., Pullmann, R., Jr., Martindale, J.L., Kim, H.H., Lal, A., Abdelmohsen, K., Yang, X., Dang, Y., Liu, J.O., *et al.* (2008). RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* *28*, 93-107.

Gillespie, M.T., and Martin, T.J. (1994). The parathyroid hormone-related protein gene and its expression. *Mol Cell Endocrinol* *100*, 143-147.

Gnarra, J.R., Zhou, S., Merrill, M.J., Wagner, J.R., Krumm, A., Papavassiliou, E., Oldfield, E.H., Klausner, R.D., and Linehan, W.M. (1996). Post-transcriptional regulation of vascular

endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10589-10594.

Gotoh, A., Kitazawa, S., Mizuno, Y., Takenaka, A., Arakawa, S., Matsumoto, O., Kitazawa, R., Fujimori, T., Maeda, S., and Kamidono, S. (1993). Common expression of parathyroid hormone-related protein and no correlation of calcium level in renal cell carcinomas. *Cancer* 71, 2803-2806.

Guhaniyogi, J., and Brewer, G. (2001). Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 265, 11-23.

Guise, T.A., Yin, J.J., Taylor, S.D., Kumagai, Y., Dallas, M., Boyce, B.F., Yoneda, T., and Mundy, G.R. (1996). Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* 98, 1544-1549.

H

Haase, V.H. (2006). The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney Int* 69, 1302-1307.

Hafez, K.S., Fergany, A.F., and Novick, A.C. (1999). Nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: impact of tumor size on patient survival, tumor recurrence and TNM staging. *J Urol* 162, 1930-1933.

Hamzaoui, H., Rizk-Rabin, M., Gordon, J., Offutt, C., Bertherat, J., and Bouizar, Z. (2007). PTHrP P3 promoter activity in breast cancer cell lines: role of Ets1 and CBP (CREB binding protein). *Mol Cell Endocrinol* 268, 75-84.

Hastings, R.H., Quintana, R.A., Sandoval, R., Duey, D., Rascon, Y., Burton, D.W., and Defetos, L.J. (2003). Proapoptotic effects of parathyroid hormone-related protein in type II pneumocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29, 733-742.

Heath, J.K., Southby, J., Fukumoto, S., O'Keefe, L.M., Martin, T.J., and Gillespie, M.T. (1995). Epidermal growth factor-stimulated parathyroid hormone-related protein expression involves increased gene transcription and mRNA stability. *Biochem J* 307 (Pt 1), 159-167.

Henderson, J.E., Amizuka, N., Warshawsky, H., Biasotto, D., Lanske, B.M., Goltzman, D., and Karaplis, A.C. (1995). Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* 15, 4064-4075.

Hergovich, A., Lisztwan, J., Barry, R., Ballschmieter, P., and Krek, W. (2003). Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat Cell Biol* 5, 64-70.

Hickey, M.M., and Simon, M.C. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr Top Dev Biol* 76, 217-257.

Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fujii, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1996). cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol* 16, 1706-1713.

Hoey, R.P., Sanderson, C., Iddon, J., Brady, G., Bundred, N.J., and Anderson, N.G. (2003). The parathyroid hormone-related protein receptor is expressed in breast cancer bone metastases and promotes autocrine proliferation in breast carcinoma cells. *Br J Cancer* 88, 567-573.

Hollis, G.F., Gazdar, A.F., Bertness, V., and Kirsch, I.R. (1988). Complex translocation disrupts c-myc regulation in a human plasma cell myeloma. *Mol Cell Biol* 8, 124-129.

Hu, C.J., Wang, L.Y., Chodosh, L.A., Keith, B., and Simon, M.C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23, 9361-9374.

Huang, D., Ding, Y., Luo, W.M., Bender, S., Qian, C.N., Kort, E., Zhang, Z.F., VandenBeldt, K., Duesbery, N.S., Resau, J.H., *et al.* (2008). Inhibition of MAPK kinase signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis in vivo. *Cancer Res* 68, 81-88.

Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I., *et al.* (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356, 2271-2281.

Hunt, J.D., van der Hel, O.L., McMillan, G.P., Boffetta, P., and Brennan, P. (2005). Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer* 114, 101-108.

I

Ibrahim, H., Lee, Y.J., and Curthoys, N.P. (2008). Renal response to metabolic acidosis: role of mRNA stabilization. *Kidney Int* 73, 11-18.

Ikeda, K., Mangin, M., Dreyer, B.E., Webb, A.C., Posillico, J.T., Stewart, A.F., Bander, N.H., Weir, E.C., Insogna, K.L., and Broadus, A.E. (1988). Identification of transcripts encoding a parathyroid hormone-like peptide in messenger RNAs from a variety of human and animal tumors associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Clin Invest* 81, 2010-2014.

Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., and Kaelin, W.G., Jr. (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med* 1, 822-826.

Isaacs, J.S., Jung, Y.J., Mole, D.R., Lee, S., Torres-Cabala, C., Chung, Y.L., Merino, M., Trepel, J., Zbar, B., Toro, J., *et al.* (2005). HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell* 8, 143-153.

Ishida, H., Suzuki, K., Someya, Y., Nishimura, M., Sugimoto, C., Goto, M., Taguchi, Y., Kasahara, H., Kadowaki, S., Imura, H., *et al.* (1993). Possible compensatory role of parathyroid hormone-related peptide on maintenance of calcium homeostasis in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Endocrinol (Copenh)* 129, 519-524.

Itano, N.B., Blute, M.L., Spotts, B., and Zincke, H. (2000). Outcome of isolated renal cell carcinoma fossa recurrence after nephrectomy. *J Urol* 164, 322-325.

J

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., *et al.* (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.

Janout, V., and Janoutova, G. (2004). Epidemiology and risk factors of kidney cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 148, 95-101.

Jemal A, S.R., Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008). Cancer statistics, 2008. In *CA Cancer J Clin*, pp. 71-96.

Jeyaraj, S.C., Dakhllallah, D., Hill, S.R., and Lee, B.S. (2006). Expression and distribution of HuR during ATP depletion and recovery in proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, F1255-1263.

K

Kaelin, W.G. (2007). Von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathol* 2, 145-173.

Kapitsinou, P.P., and Haase, V.H. (2008). The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ* 15, 650-659.

Katsanou, V., Papadaki, O., Milatos, S., Blackshear, P.J., Anderson, P., Kollias, G., and Kontoyiannis, D.L. (2005). HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation. *Mol Cell* 19, 777-789.

Kawashima-Ohya, Y., Satakeda, H., Kuruta, Y., Kawamoto, T., Yan, W., Akagawa, Y., Hayakawa, T., Noshiro, M., Okada, Y., Nakamura, S., *et al.* (1998). Effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide on expressions of matrix metalloproteinase-2, -3, and -9 in growth plate chondrocyte cultures. *Endocrinology* 139, 2120-2127.

Khoo, S.K., Kahnoski, K., Sugimura, J., Petillo, D., Chen, J., Shockley, K., Ludlow, J., Knapp, R., Giraud, S., Richard, S., *et al.* (2003). Inactivation of BHD in sporadic renal tumors. *Cancer Res* 63, 4583-4587.

Kim, E., Goren, A., and Ast, G. (2008). Alternative splicing: current perspectives. *Bioessays* 30, 38-47.

Kim, W.Y., and Kaelin, W.G. (2004). Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 22, 4991-5004.

Kiriyama, T., Gillespie, M.T., Glatz, J.A., Fukumoto, S., Moseley, J.M., and Martin, T.J. (1993). Transforming growth factor beta stimulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP): a paracrine regulator? *Mol Cell Endocrinol* 92, 55-62.

Knebelmann, B., Ananth, S., Cohen, H.T., and Sukhatme, V.P. (1998). Transforming growth factor alpha is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res* 58, 226-231.

Kondo, K., Kim, W.Y., Lechpammer, M., and Kaelin, W.G., Jr. (2003). Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol* 1, E83.

Kondo, K., Klco, J., Nakamura, E., Lechpammer, M., and Kaelin, W.G., Jr. (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* 1, 237-246.

Kovacs, G., Akhtar, M., Beckwith, B.J., Bugert, P., Cooper, C.S., Delahunt, B., Eble, J.N., Fleming, S., Ljungberg, B., Medeiros, L.J., *et al.* (1997). The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J Pathol* 183, 131-133.

Kuzmin, I., Duh, F.M., Latif, F., Geil, L., Zbar, B., and Lerman, M.I. (1995). Identification of the promoter of the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Oncogene* 10, 2185-2194.

L

- Lai, W.S., Kennington, E.A., and Blackshear, P.J. (2003). Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol Cell Biol* 23, 3798-3812.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J* 23, 3092-3102.
- Lam, J.S., Shvarts, O., Said, J.W., Pantuck, A.J., Seligson, D.B., Aldridge, M.E., Bui, M.H., Liu, X., Horvath, S., Figlin, R.A., *et al.* (2005). Clinicopathologic and molecular correlations of necrosis in the primary tumor of patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 103, 2517-2525.
- Lam, M.H., Briggs, L.J., Hu, W., Martin, T.J., Gillespie, M.T., and Jans, D.A. (1999a). Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha. *J Biol Chem* 274, 7391-7398.
- Lam, M.H., House, C.M., Tiganis, T., Mitchelhill, K.I., Sarcevic, B., Cures, A., Ramsay, R., Kemp, B.E., Martin, T.J., and Gillespie, M.T. (1999b). Phosphorylation at the cyclin-dependent kinases site (Thr85) of parathyroid hormone-related protein negatively regulates its nuclear localization. *J Biol Chem* 274, 18559-18566.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F.M., Orcutt, M.L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., *et al.* (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260, 1317-1320.
- Lee, F., and Patel, H.R. (2002). Kidney cancer: current management guidelines. *Hosp Med* 63, 214-217.
- Levi, F., Ferlay, J., Galeone, C., Lucchini, F., Negri, E., Boyle, P., and La Vecchia, C. (2008). The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int* 101, 949-958.
- Levy, A.P., Levy, N.S., and Goldberg, M.A. (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 271, 2746-2753.
- Liao, J., and McCauley, L.K. (2006). Skeletal metastasis: Established and emerging roles of parathyroid hormone related protein (PTHrP). *Cancer Metastasis Rev* 25, 559-571.
- Lindau, A. (1927). Zur frage der angiomatosis retinae und ihrer hircomplikation. *Acta Ophthal* 4, 193-226.
- Lindemann, R.K., Ballschmieter, P., Nordheim, A., and Dittmer, J. (2001). Transforming growth factor beta regulates parathyroid hormone-related protein expression in MDA-MB-231 breast cancer cells through a novel Smad/Ets synergism. *J Biol Chem* 276, 46661-46670.
- Lindemann, R.K., Braig, M., Ballschmieter, P., Guise, T.A., Nordheim, A., and Dittmer, J. (2003). Protein kinase Calpha regulates Ets1 transcriptional activity in invasive breast cancer cells. *Int J Oncol* 22, 799-805.
- Linehan, W.M., and Zbar, B. (2004). Focus on kidney cancer. *Cancer Cell* 6, 223-228.
- Liu, M.Y., Poellinger, L., and Walker, C.L. (2003). Up-regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha in renal cell carcinoma associated with loss of Tsc-2 tumor suppressor gene. *Cancer Res* 63, 2675-2680.

Lopez de Silanes, I., Fan, J., Yang, X., Zonderman, A.B., Potapova, O., Pizer, E.S., and Gorospe, M. (2003). Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene* 22, 7146-7154.

Lopez de Silanes, I., Lal, A., and Gorospe, M. (2005). HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol* 2, 11-13.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Luparello, C., Romanotto, R., Tipa, A., Sirchia, R., Olmo, N., Lopez de Silanes, I., Turnay, J., Lizarbe, M.A., and Stewart, A.F. (2001). Midregion parathyroid hormone-related protein inhibits growth and invasion in vitro and tumorigenesis in vivo of human breast cancer cells. *J Bone Miner Res* 16, 2173-2181.

M

Ma, W.J., Chung, S., and Furneaux, H. (1997). The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nucleic Acids Res* 25, 3564-3569.

Mak, B.C., and Yeung, R.S. (2004). The tuberous sclerosis complex genes in tumor development. *Cancer Invest* 22, 588-603.

Manenti, G., Peissel, B., Gariboldi, M., Falvella, F.S., Zaffaroni, D., Allaria, B., Pazzaglia, S., Rebessi, S., Covelli, V., Saran, A., *et al.* (2000). A cancer modifier role for parathyroid hormone-related protein. *Oncogene* 19, 5324-5328.

Mangin, M., Ikeda, K., Dreyer, B.E., and Broadus, A.E. (1989). Isolation and characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2408-2412.

Mangin, M., Ikeda, K., Dreyer, B.E., and Broadus, A.E. (1990). Identification of an up-stream promoter of the human parathyroid hormone-related peptide gene. *Mol Endocrinol* 4, 851-858.

Mannstadt, M., Juppner, H., and Gardella, T.J. (1999). Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol* 277, F665-675.

Maranchie, J.K., Vasselli, J.R., Riss, J., Bonifacino, J.S., Linehan, W.M., and Klausner, R.D. (2002). The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 1, 247-255.

Martin, T.J., Moseley, J.M., and Williams, E.D. (1997). Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine. *J Endocrinol* 154 Suppl, S23-37.

Massfelder, T., Dann, P., Wu, T.L., Vasavada, R., Helwig, J.J., and Stewart, A.F. (1997). Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13630-13635.

Massfelder, T., Lang, H., Schordan, E., Lindner, V., Rothhut, S., Welsch, S., Simon-Assmann, P., Barthelmebs, M., Jacqmin, D., and Helwig, J.J. (2004). Parathyroid hormone-related protein is an essential growth factor for human clear cell renal carcinoma and a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* 64, 180-188.

- Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J* 20, 5197-5206.
- Maynard, M.A., Evans, A.J., Shi, W., Kim, W.Y., Liu, F.F., and Ohh, M. (2007). Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle* 6, 2810-2816.
- Mazan-Mamczarz, K., Galban, S., Lopez de Silanes, I., Martindale, J.L., Atasoy, U., Keene, J.D., and Gorospe, M. (2003). RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8354-8359.
- McLaughlin, J.K., Lindblad, P., Mellemegaard, A., McCredie, M., Mandel, J.S., Schlehofer, B., Pommer, W., and Adami, H.O. (1995). International renal-cell cancer study. I. Tobacco use. *Int J Cancer* 60, 194-198.
- McLaughlin, J.K., Lipworth, L., and Tarone, R.E. (2006). Epidemiologic aspects of renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 33, 527-533.
- Meisner, N.C., Hintersteiner, M., Mueller, K., Bauer, R., Seifert, J.M., Naegeli, H.U., Ottl, J., Oberer, L., Guenat, C., Moss, S., *et al.* (2007). Identification and mechanistic characterization of low-molecular-weight inhibitors for HuR. *Nat Chem Biol* 3, 508-515.
- Mellemegaard, A., Engholm, G., McLaughlin, J.K., and Olsen, J.H. (1994). Risk factors for renal cell carcinoma in Denmark. I. Role of socioeconomic status, tobacco use, beverages, and family history. *Cancer Causes Control* 5, 105-113.
- Minardi, D., Lucarini, G., Filosa, A., Milanese, G., Zizzi, A., Di Primio, R., Montironi, R., and Muzzonigro, G. (2008). Prognostic role of tumor necrosis, microvessel density, vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1alpha in patients with clear cell renal carcinoma after radical nephrectomy in a long term follow-up. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21, 447-455.
- Minasian, L.M., Motzer, R.J., Gluck, L., Mazumdar, M., Vlamis, V., and Krown, S.E. (1993). Interferon alfa-2a in advanced renal cell carcinoma: treatment results and survival in 159 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 11, 1368-1375.
- Motzer, R.J., Hutson, T.E., Tomczak, P., Michaelson, M.D., Bukowski, R.M., Rixe, O., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Kim, S.T., *et al.* (2007). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356, 115-124.
- Motzer, R.J., Michaelson, M.D., Redman, B.G., Hudes, G.R., Wilding, G., Figlin, R.A., Ginsberg, M.S., Kim, S.T., Baum, C.M., DePrimo, S.E., *et al.* (2006a). Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24, 16-24.
- Motzer, R.J., Rini, B.I., Bukowski, R.M., Curti, B.D., George, D.J., Hudes, G.R., Redman, B.G., Margolin, K.A., Merchan, J.R., Wilding, G., *et al.* (2006b). Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* 295, 2516-2524.

N

- Nabors, L.B., Gillespie, G.Y., Harkins, L., and King, P.H. (2001). HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements

within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res* 61, 2154-2161.

Nadella, M.V., Dirksen, W.P., Nadella, K.S., Shu, S., Cheng, A.S., Morgenstern, J.A., Richard, V., Fernandez, S.A., Huang, T.H., Guttridge, D., *et al.* (2007). Transcriptional regulation of parathyroid hormone-related protein promoter P2 by NF-kappaB in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia* 21, 1752-1762.

Nagy, A., Zoubakov, D., Stupar, Z., and Kovacs, G. (2004). Lack of mutation of the folliculin gene in sporadic chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Int J Cancer* 109, 472-475.

Negrier, S., Escudier, B., Lasset, C., Douillard, J.Y., Savary, J., Chevreau, C., Ravaud, A., Mercatello, A., Peny, J., Mousseau, M., *et al.* (1998). Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Groupe Francais d'Immunotherapie. N Engl J Med* 338, 1272-1278.

O

Ohh, M., Yauch, R.L., Lonergan, K.M., Whaley, J.M., Stemmer-Rachamimov, A.O., Louis, D.N., Gavin, B.J., Kley, N., Kaelin, W.G., Jr., and Iliopoulos, O. (1998). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell* 1, 959-968.

Orloff, J.J., Reddy, D., de Papp, A.E., Yang, K.H., Soifer, N.E., and Stewart, A.F. (1994). Parathyroid hormone-related protein as a prohormone: posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr Rev* 15, 40-60.

Orloff, J.J., Soifer, N.E., Fodero, J.P., Dann, P., and Burtis, W.J. (1993). Accumulation of carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein in renal failure. *Kidney Int* 43, 1371-1376.

P

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108.

Parry, L., Maynard, J.H., Patel, A., Clifford, S.C., Morrissey, C., Maher, E.R., Cheadle, J.P., and Sampson, J.R. (2001). Analysis of the TSC1 and TSC2 genes in sporadic renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 85, 1226-1230.

Philbrick, W.M., Wysolmerski, J.J., Galbraith, S., Holt, E., Orloff, J.J., Yang, K.H., Vasavada, R.C., Weir, E.C., Broadus, A.E., and Stewart, A.F. (1996). Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 76, 127-173.

Pollard, P.J., Spencer-Dene, B., Shukla, D., Howarth, K., Nye, E., El-Bahrawy, M., Deheragoda, M., Joannou, M., McDonald, S., Martin, A., *et al.* (2007). Targeted inactivation of fh1 causes proliferative renal cyst development and activation of the hypoxia pathway. *Cancer Cell* 11, 311-319.

Price, J.T., Bonovich, M.T., and Kohn, E.C. (1997). The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32, 175-253.

R

Rabbani, S.A., Gladu, J., Liu, B., and Goltzman, D. (1995). Regulation in vivo of the growth of Leydig cell tumors by antisense ribonucleic acid for parathyroid hormone-related peptide. *Endocrinology* 136, 5416-5422.

Ratain, M.J., Eisen, T., Stadler, W.M., Flaherty, K.T., Kaye, S.B., Rosner, G.L., Gore, M., Desai, A.A., Patnaik, A., Xiong, H.Q., *et al.* (2006). Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24, 2505-2512.

Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., and Ratcliffe, P.J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 25, 5675-5686.

Rini, B.I., Halabi, S., Taylor, J., Small, E.J., and Schilsky, R.L. (2004). Cancer and Leukemia Group B 90206: A randomized phase III trial of interferon-alpha or interferon-alpha plus anti-vascular endothelial growth factor antibody (bevacizumab) in metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 2584-2586.

Rioux-Leclercq, N., Karakiewicz, P.I., Trinh, Q.D., Ficarra, V., Cindolo, L., de la Taille, A., Tostain, J., Zigeuner, R., Mejean, A., and Patard, J.J. (2007). Prognostic ability of simplified nuclear grading of renal cell carcinoma. *Cancer* 109, 868-874.

S

Sagalowsky, A.I. (2002). The 1997 TNM classification of renal cell carcinoma revisited: the pendulum swings back. *Curr Opin Urol* 12, 371-373.

Sakai, K., Kitagawa, Y., and Hirose, G. (1999). Analysis of the RNA recognition motifs of human neuronal ELAV-like proteins in binding to a cytokine mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 263-268.

Schmidt, L., Duh, F.M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S.W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., *et al.* (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 16, 68-73.

Seizinger, B.R., Rouleau, G.A., Ozelius, L.J., Lane, A.H., Farmer, G.E., Lamiell, J.M., Haines, J., Yuen, J.W., Collins, D., Majoor-Krakauer, D., *et al.* (1988). Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* 332, 268-269.

Seizinger, B.R., Smith, D.I., Filling-Katz, M.R., Neumann, H., Green, J.S., Choyke, P.L., Anderson, K.M., Freiman, R.N., Klauck, S.M., Whaley, J., *et al.* (1991). Genetic flanking markers refine diagnostic criteria and provide insights into the genetics of Von Hippel Lindau disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2864-2868.

Sellers, R.S., Capen, C.C., and Rosol, T.J. (2002). Messenger RNA stability of parathyroid hormone-related protein regulated by transforming growth factor-beta1. *Mol Cell Endocrinol* 188, 37-46.

Sellers, R.S., LeRoy, B.E., Blomme, E.A., Tannehill-Gregg, S., Corn, S., and Rosol, T.J. (2004a). Effects of transforming growth factor-beta1 on parathyroid hormone-related protein

- mRNA expression and protein secretion in canine prostate epithelial, stromal, and carcinoma cells. *Prostate* 58, 366-373.
- Sellers, R.S., Luchin, A.I., Richard, V., Brena, R.M., Lima, D., and Rosol, T.J. (2004b). Alternative splicing of parathyroid hormone-related protein mRNA: expression and stability. *J Mol Endocrinol* 33, 227-241.
- Shaw, G., and Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46, 659-667.
- Sheflin, L.G., Zou, A.P., and Spaulding, S.W. (2004). Androgens regulate the binding of endogenous HuR to the AU-rich 3'UTRs of HIF-1alpha and EGF mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 644-651.
- Shehata, B.M., Stockwell, C.A., Castellano-Sanchez, A.A., Setzer, S., Schmotzer, C.L., and Robinson, H. (2008). Von Hippel-Lindau (VHL) disease: an update on the clinico-pathologic and genetic aspects. *Adv Anat Pathol* 15, 165-171.
- Shen, X., and Falzon, M. (2003). Parathyroid hormone-related protein upregulates integrin expression via an intracrine pathway in PC-3 prostate cancer cells. *Regul Pept* 113, 17-29.
- Shen, X., Qian, L., and Falzon, M. (2004). PTH-related protein enhances MCF-7 breast cancer cell adhesion, migration, and invasion via an intracrine pathway. *Exp Cell Res* 294, 420-433.
- Soubrier, C., Danilin, S., Lindner, V., Steger, J., Rothhut, S., Meyer, N., Jacqmin, D., Helwig, J.J., Lang, H., and Massfelder, T. (2007). Targeting the nuclear factor-kappaB rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* 67, 11668-11676.
- Soubrier, C., Lindner, V., Lang, H., Agouni, A., Schordan, E., Danilin, S., Rothhut, S., Jacqmin, D., Helwig, J.J., and Massfelder, T. (2006). The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer Res* 66, 5130-5142.
- Southby, J., Murphy, L.M., Martin, T.J., and Gillespie, M.T. (1996). Cell-specific and regulator-induced promoter usage and messenger ribonucleic acid splicing for parathyroid hormone-related protein. *Endocrinology* 137, 1349-1357.
- Southby, J., O'Keeffe, L.M., Martin, T.J., and Gillespie, M.T. (1995). Alternative promoter usage and mRNA splicing pathways for parathyroid hormone-related protein in normal tissues and tumours. *Br J Cancer* 72, 702-707.
- Sowter, H.M., Raval, R.R., Moore, J.W., Ratcliffe, P.J., and Harris, A.L. (2003). Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Cancer Res* 63, 6130-6134.
- Stebbins, C.E., Kaelin, W.G., Jr., and Pavletich, N.P. (1999). Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 284, 455-461.
- Stewart, J.H., Buccianti, G., Agodoa, L., Gellert, R., McCredie, M.R., Lowenfels, A.B., Disney, A.P., Wolfe, R.A., Boyle, P., and Maisonneuve, P. (2003). Cancers of the kidney and urinary tract in patients on dialysis for end-stage renal disease: analysis of data from the United States, Europe, and Australia and New Zealand. *J Am Soc Nephrol* 14, 197-207.
- Strewler, G.J. (2000). The physiology of parathyroid hormone-related protein. *N Engl J Med* 342, 177-185.
- Sudarshan, S., and Linehan, W.M. (2006). Genetic basis of cancer of the kidney. *Semin Oncol* 33, 544-551.

Suehiro, M., Murakami, M., and Fukuchi, M. (1994). Circulating forms of immunoreactive parathyroid hormone-related protein for identifying patients with humoral hypercalcemia of malignancy: a comparative study with C-terminal(109-141)- and N-terminal(1-86)-region-specific PTHrP radioassay. *Ann Nucl Med* 8, 231-237.

Sufan, R.I., Jewett, M.A., and Ohh, M. (2004). The role of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia in renal clear cell carcinoma. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F1-6.

T

Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N., and Fujii-Kuriyama, Y. (1998). Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and clock. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 789-794.

Talon, I., Lindner, V., Sourbier, C., Schordan, E., Rothhut, S., Barthelmebs, M., Lang, H., Helwig, J.J., and Massfelder, T. (2006). Antitumor effect of parathyroid hormone-related protein neutralizing antibody in human renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 27, 73-83.

Thiede, M.A., Strewler, G.J., Nissenson, R.A., Rosenblatt, M., and Rodan, G.A. (1988). Human renal carcinoma expresses two messages encoding a parathyroid hormone-like peptide: evidence for the alternative splicing of a single-copy gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4605-4609.

Tovar Sepulveda, V.A., and Falzon, M. (2002). Parathyroid hormone-related protein enhances PC-3 prostate cancer cell growth via both autocrine/paracrine and intracrine pathways. *Regul Pept* 105, 109-120.

Tunuguntla, H.S., and Jorda, M. (2008). Diagnostic and prognostic molecular markers in renal cell carcinoma. *J Urol* 179, 2096-2102.

V

Vajdic, C.M., McDonald, S.P., McCredie, M.R., van Leeuwen, M.T., Stewart, J.H., Law, M., Chapman, J.R., Webster, A.C., Kaldor, J.M., and Grulich, A.E. (2006). Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA* 296, 2823-2831.

Vasavada, R.C., Wysolmerski, J.J., Broadus, A.E., and Philbrick, W.M. (1993). Identification and characterization of a GC-rich promoter of the human parathyroid hormone-related peptide gene. *Mol Endocrinol* 7, 273-282.

von-Hippel, E. (1904). Ueber eine sehr seltene erkrankung der nethaut. Albrecht von Graefes *Arch Ophthal* 59, 83-106.

W

Wagner, B.J., DeMaria, C.T., Sun, Y., Wilson, G.M., and Brewer, G. (1998). Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* 48, 195-202.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-5514.

Wang, W., Furneaux, H., Cheng, H., Caldwell, M.C., Hutter, D., Liu, Y., Holbrook, N., and Gorospe, M. (2000). HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol Cell Biol* 20, 760-769.

Weikert, S., Boeing, H., Pischon, T., Weikert, C., Olsen, A., Tjonneland, A., Overvad, K., Becker, N., Linseisen, J., Trichopoulou, A., *et al.* (2008). Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol* 167, 438-446.

Wiesener, M.S., Munchenhagen, P.M., Berger, I., Morgan, N.V., Roigas, J., Schwiertz, A., Jurgensen, J.S., Gruber, G., Maxwell, P.H., Loning, S.A., *et al.* (2001). Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res* 61, 5215-5222.

Wilson, G.M., Sutphen, K., Moutafis, M., Sinha, S., and Brewer, G. (2001). Structural remodeling of an A + U-rich RNA element by cation or AUF1 binding. *J Biol Chem* 276, 38400-38409.

Woldrich, J.M., Mallin, K., Ritchey, J., Carroll, P.R., and Kane, C.J. (2008). Sex differences in renal cell cancer presentation and survival: an analysis of the National Cancer Database, 1993-2004. *J Urol* 179, 1709-1713; discussion 1713.

Wysolmerski, J.J., Vasavada, R., Foley, J., Weir, E.C., Burtis, W.J., Kukreja, S.C., Guise, T.A., Broadus, A.E., and Philbrick, W.M. (1996). Transactivation of the PTHrP gene in squamous carcinomas predicts the occurrence of hypercalcemia in athymic mice. *Cancer Res* 56, 1043-1049.

X

Xu, N., Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (2001). Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol Cell Biol* 21, 6960-6971.

Y

Yan, Q., Bartz, S., Mao, M., Li, L., and Kaelin, W.G., Jr. (2007). The hypoxia-inducible factor 2alpha N-terminal and C-terminal transactivation domains cooperate to promote renal tumorigenesis in vivo. *Mol Cell Biol* 27, 2092-2102.

Yang, J.C., Haworth, L., Sherry, R.M., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Steinberg, S.M., Chen, H.X., and Rosenberg, S.A. (2003). A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 349, 427-434.

Yasui, T., Uemura, H., Irahara, M., and Aono, T. (1997). Effects of transforming growth factor-beta on the production of parathyroid hormone-related peptide in a human ovarian cancer cell line in vitro. *J Obstet Gynaecol Res* 23, 231-238.

Ye, Y., Wang, C., Du, P., Falzon, M., Seitz, P.K., and Cooper, C.W. (2001). Overexpression of parathyroid hormone-related protein enhances apoptosis in the rat intestinal cell line, IEC-6. *Endocrinology* 142, 1906-1914.

Young, A.P., Schlisio, S., Minamishima, Y.A., Zhang, Q., Li, L., Grisanzio, C., Signoretti, S., and Kaelin, W.G., Jr. (2008). VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat Cell Biol* *10*, 361-369.

Z

Zatyka, M., Morrissey, C., Kuzmin, I., Lerman, M.I., Latif, F., Richards, F.M., and Maher, E.R. (2002). Genetic and functional analysis of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene promoter. *J Med Genet* *39*, 463-472.

Zhang, G.W., Song, H.D., and Chen, Z. (2004). [Molecular mechanism of mRNA alternative splicing]. *Yi Chuan Xue Bao* *31*, 102-107.

Zucchetto, A., Dal Maso, L., Tavani, A., Montella, M., Ramazzotti, V., Talamini, R., Canzonieri, V., Garbeglio, A., Negri, E., Franceschi, S., *et al.* (2007). History of treated hypertension and diabetes mellitus and risk of renal cell cancer. *Ann Oncol* *18*, 596-600.

Chapitre 7 : Annexes

Résumé en français

Le carcinome à cellules rénales (CCR), dont le sous-type le plus fréquent est le CCR conventionnel (CCC), représente 90% des cancers du rein. Son incidence augmente de façon constante et il reste de mauvais pronostic.

La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) est exprimée sous forme de 3 isoformes d'ARNm codant pour des protéines de 139, 141 et 173 acides aminés. Elle a récemment été identifiée comme un facteur de survie essentiel à la croissance du CCC et comme une nouvelle cible du gène suppresseur de tumeur von Hippel Lindau (VHL) qui régule négativement son expression au niveau post-transcriptionnel. Le VHL est muté dans la majorité des cas de CCC, et dont la principale fonction est de dégrader en conditions normoxiques les facteurs de transcription induits par l'hypoxie HIF- α qui régulent au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel de nombreux facteurs favorisant la cancérogénèse, dont la PTHrP.

Ce travail de thèse, a permis d'établir que dans les CCC, l'isoforme 141 de l'ARNm de la PTHrP est celle qui est majoritairement exprimée et qu'elle est stabilisée par HuR, une protéine ubiquitaire qui comme nous l'avons montré, stabilise également les ARNm d'autres facteurs cibles du système VHL/HIF comme le VEGF ou le TGF- β 1. Nous avons également montré que HuR est surexprimée dans les CCC et que son extinction par siARN *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris nude xéno greffées inhibe substantiellement la croissance tumorale via une inhibition de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose. Cibler cette protéine pourrait donc s'avérer être une nouvelle option thérapeutique pour le traitement du CCC humain.

Mots clés : Carcinome à cellules rénales conventionnel (CCC) - Protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP) - Gène suppresseur de tumeur von Hippel-lindau (VHL) - Facteurs induits par hypoxie (HIF) - HuR - Stabilité des ARNm.

Résumé en anglais

Conventional renal cell carcinoma (CCC) is the main sub-type of RCC representing around 80% of all RCC cases. His incidence is in constant progression and the prognostic is poor.

Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) is a polyprotein alternatively spliced into 3 mRNA isoforms coding for proteins containing 139, 141 and 173 amino acids. We have previously shown that PTHrP is a survival factor for human RCC and that its expression is negatively regulated by the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene at the level of mRNA stability, as observed for growth and angiogenic factors such as VEGF or TGF- β . Using a panel of CCC cell lines either deficient for the VHL or expressing wild-type VHL, VHL-deficient 786-0 cells transfected with active or inactive VHL and human RCC samples and corresponding normal tissues, we showed first that PTHrP 141 mRNA isoform is prédominantly express in human RCC and a target for the mRNA stabilizing protein HuR. Interestingly, we showed that this ubiquitously expressed protein involved in the mRNA stabilization of number of others VHL/HIF target genes are overexpressed in all CCC samples we used. Moreover, through HuR knockdown using specific siRNA in cultured cell or in the nude mice xenografted model, we showed that this protein is critically involved in CCC tumor growth and that this effect is obtained through an inhibition of cell proliferation and an increase in cell apoptosis. These results identify HuR as a potent new therapeutic target for the treatment of CRCC which remains a refractory disease.

Key words : Renal cell carcinoma (RCC) - Parathyroid hormone related protein (PTHrP) - von Hippel Lindau (VHL) tumor supressor gene - Hypoxia induced factors (HIF) - HuR - mRNA stability

Publications

S. Danilin, C. Sourbier, L.Thomas, S. Rothhut, V. Lindner, J-J.Helwig, D Jacqmin, H Lang, and T Massfelder. Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene-dependent mRNA stabilization of the survival factor parathyroid hormone-related protein in human renal cell carcinoma by the RNA-binding protein HuR. *Acceptée dans carcinogenesis (révision mineure)*

Danilin S, Sourbier C, Rothhut S, lindner V, Jacqmin D, Helwig JJ, Lang H, Massfelder T. Role of the RNA-binding protein HuR in human renal cell carcinoma. *Manuscrit en préparation.*

C. Sourbier, V. Lindler, A. Agouni, I. Talon, **S. Danilin**, E. Schordan, S. Rothhut, JJ. Helwig, H. Lang, T. Massfelder. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: A new target in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer res.* 2006 May 15;66(10):5130-42.

Agouni A, Sourbier C, **Danilin S**, Rothhut S, Lindler V, Jacqmin D, Helwig JJ, Lang H, Massfelder T. Parathyroid hormone-related protein induces cell survival in human renal cell carcinoma through the PI3K Akt pathway: evidence for a critical role for integrin-linked kinase and nuclear factor kappa B. *Carcinogenesis* 2007 Sep;28(9):1893-901

C. Sourbier, **S. Danilin**, V. Lindler, J. Steger, N. Meyer, JJ. Helwig, H. Lang, T. Massfelder. Targeting the NF-kappaB rescue pathway has promising future in human renal cell carcinoma therapy. *Cancer res.* 2007 Dec 15;67(24):11668-76.

Sourbier C, **Danilin S**, Lindner V, Boutaud O, Jacqmin D, Helwig JJ, Lang H, Massfelder T. A new regulatory loop between Akt and its downstream targets induces cell survival in human renal cell carcinoma: identification of newtherapeutic candidates. *Manuscrit en préparation.*

Sourbier C, Thomas L, **Danilin S**, Lindner V, Boutaud O, Jacqmin D, helwig JJ, Lang H , Massfelder T. Focale adhesion kinase (FAK) silencing blocks human renal cell carcinoma progression. *Manuscrit en préparation.*

Posters et communications

Danilin S, Sourbier C, Rothhut S, Lindner V, Jacqmin D, Helwig JJ, Lang H, Massfelder T. Molecular mechanism of parathyroid hormone-related protein mRNA stabilization by the VHL/HIF system. Laboratory Seminar, Division of Clinical Pharmacology, October 19th, 2005 Medical Center, Vanderbilt University. *Communication orale*

Danilin S, Sourbier C, Rothhut S, Lindner V, Jacqmin D, Helwig JJ, Lang H, Massfelder T. Molecular mechanism of parathyroid hormone-related protein mRNA stabilization by the VHL/HIF system. EuCC (European Cancer Center) 14th annual meeting, May 11th, 2007, Strasbourg, France. *Poster discuté*

Danilin S, Thomas L, Sourbier C, Rothhut S, Lindner V, Helwig JJ, Jacqmin D, Lang H, Massfelder T. Targeting the RNA-binding protein HuR has potent anti-tumor effects in human renal cell carcinoma. 23rd annual meeting of the European Association of Urology, Milan, March 26-29, 2008. *Poster discuté*

Agouni A, Sourbier C, **Danilin S**, Rothhut S, Lindler V, Jacqmin D, Helwig JJ, Lang H, Massfelder T. Parathyroid hormone-related protein induces cell survival in human renal cell carcinoma through the PI3K Akt pathway: evidence for a critical role for integrin-linked kinase and nuclear factor kappa B. Annual Meeting of the American Urological Association (AUA), May 19-24, 2007, Anaheim, CA, USA. *Podium- communication orale*

Danilin S, Thomas L, Sourbier C, Rothhut S, Lindner V, Helwig JJ, Jacqmin D, Lang H, Massfelder T. Targeting the RNA-binding protein HuR has potent anti-tumor effects in human renal cell carcinoma. Meeting of the American Urological Association (AUA), May 17-22, 2008, Orlando. *Poster discuté*