



Implication du long ARN non-codant *NEAT2* dans la prolifération et le métabolisme énergétique des hépatocytes.

Mémoire

Marie-Josée Girard

Maîtrise en sciences pharmaceutiques
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Marie-Josée Girard, 2013

Résumé

NEAT2 est un long ARN non-codant surexprimé dans plusieurs cancers. Toutefois, les études actuelles ne sont qu'associatives et ne permettent pas d'établir de lien direct de cause à effet ainsi que son mécanisme d'action dans la carcinogenèse. Dans cette étude, nous avons déterminé le rôle de *NEAT2* et de ses domaines fonctionnels dans la prolifération et le métabolisme énergétique des hépatocytes. La prolifération était diminuée significativement (14-35%) lorsque l'expression de *NEAT2* a été rendue génétiquement faible ou inexistante dans les modèles d'hépatocytes humains et de fibroblastes embryonnaires de souris. À l'opposé, la prolifération cellulaire était significativement augmentée (27-33%) dans les hépatocytes murins surexprimant les segments *NEAT2* et *mascRNA*. Le domaine *mascRNA* entraîne également une augmentation significative de l'entrée de glucose dans la cellule. En somme, ces résultats démontrent l'importance de *mascRNA* dans la prolifération cellulaire et le métabolisme du glucose des hépatocytes.

Abstract

NEAT2 is a long ncRNA overexpressed in a various type of cancer. However, whether *NEAT2* directly impacts on carcinogenesis remains poorly investigated. Here, we report the role of *NEAT2* and its functional domains on proliferation and energy metabolism of hepatocytes. In this study, we show a significant decrease in proliferation (14-35%) after knocked-down or knockout of *NEAT2* expression in both human hepatocytes and mouse embryonic fibroblasts. On the other hand, we observed a significant increase in proliferation (27-33%) in mice hepatocytes overexpressing *NEAT2* and the mascRNA domain. The overexpression of the mascRNA domain also resulted in a significant increase in cellular glucose uptake, suggesting a role in glucose utilization. Our study highlights the significance of *NEAT2* and its mascRNA domain in cellular proliferation and glucose metabolism. These data suggest an important role for the mascRNA domain in the regulation of hepatocyte proliferation by *NEAT2*.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	v
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xi
Remerciements	xiii
Avant-propos	xv
1. Introduction	1
1.1 Le vieillissement	2
1.1.1 Généralités	2
1.1.2 Caractéristiques de l'instabilité génomique	4
1.1.3 Caractéristiques de l'usure des télomères	6
1.1.4 Caractéristiques de la dysfonction mitochondriale	7
1.1.5 Caractéristiques de la sénescence cellulaire	8
1.1.6 Le métabolisme lors du vieillissement	10
1.2 Le cancer	11
1.2.1 Généralités	12
1.2.2 Caractéristiques de l'autosuffisance en signaux de croissance	15
1.2.3 Caractéristiques de l'acquisition du potentiel métastatique et d'invasion	16
1.2.4 Caractéristiques de la reprogrammation du métabolisme énergétique cellulaire	18
1.3 Les longs ARNs non-codants	19
1.3.1 Description	19
1.3.2 Découverte	20
1.3.3 Classification	21
1.3.4 Fonctions	22
1.3.5 Implications des longs ARNnc dans diverses maladies liées au vieillissement	25
1.4 <i>NEAT2</i>	28
2. Hypothèse	31
3. Objectifs	33
4. Résultats	35
Résumé français	37
<i>NEAT2</i> / Malat1 promotes cell proliferation through its 61-bp mascRNA domain	38

5. Conclusions 61
Bibliographie 68

Liste des figures

Figure 1 : Les neuf principales caractéristiques du vieillissement.....	4
Figure 2 : Caractéristiques essentielles au développement d'un cancer	13
Figure 3 : Nouvelles caractéristiques essentielles et permissives au développement du cancer	14
.....	
Figure 4 : Classification des longs ARNnc	22
Figure 5 : Les mécanismes d'actions des longs ARNnc	25
Figure 6 : Modifications post-transcriptionnelles de <i>NEAT2</i>	29

Liste des abréviations

ADD3: Adducin 3
Age-1: Ageing alteration-1
AKT: protein kinase B
ANRIL: Antisense noncoding RNA in the INK4 locus
APP: Amyloid precursor protein
ARNm: Acide ribonucléique messenger
ARNnc: Acide ribonucléique non codant
ASO: Antisense oligonucleotide
ATP1A1: ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 1 polypeptide
BACE1: Beta-site APP-cleaving enzyme 1
BACE1-AS: Beta-site APP-cleaving enzyme 1 antisense RNA
BER: base-excision repair
C. elegans: *Caenorhabditis elegans*
CDK: Cyclin-dependent kinase
CAM: Cell adhesion molecule
CDKN2A: Cyclin-dependant kinase inhibitor 2A
Daf-2: Abnormal Dauer formation-2
DEN: diéthylnitrosamine
Dlx6as: DLX6 antisense RNA1
E2F: E2F transcription factor
EMT: Epithelial-mesenchymal transition
ENCODE : Encyclopedia of DNA elements
Evf-2: DLX6 antisense RNA1
FOXO: Forkhead box O
GLUT1: Glucose transporter 1
H19: Imprinted maternally expressed transcript
HOTAIR: Hox transcript antisens RNA
IGF-1: Insulin growth factor-1
Kb: kilobases
KO: knock-out
Linc-MD1: Long noncoding RNA muscle differentiation 1
LSD1: Lysine-specific demethylase 1A
MascRNA: Malat1 associated small cytoplasmic RNA
Malat1: Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1
MEFs: Mouse embryonic fibroblasts
miARN: Micro acide ribonucléique
mTOR: Mechanistic target of rapamycin
mTORC1: Mechanistic target of rapamycin complex 1
Mybl2: v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2
NEAT1: Nuclear enriched abundant transcript 1
NEAT2: Nuclear enriched abundant transcript 2
NHEJ: Nonhomologous end-joining
NPPA: Natriuretic peptide A

NPPA-AS: Natriuretic peptide A antisense RNA 1
NF-YA: Nuclear transcription factor Y, alpha
nt: nucléotides
OMS: Organisation mondiale de la Santé
p53: Tumor protein p53
PANDA: Promoter of CDKN1A antisense DNA damage activated RNA
pb: Paire de bases
Pc2: Polycomb 2 protein
PCAT-1: Prostate cancer associated transcript 1
PDGF: Platelet-derived growth factor
PI3K: Phosphoinositol 3-kinase
pRB: protein du rétinoblastome
PRC2 : Polycomb repressive complex 2
PTEN: Phosphatase and tensin homolog
ROS: Reactive oxygen species
shRNA: short hairpin RNA
siRNA: small interfering RNA
Src: Rous sarcoma oncogene
SRSF1: Serine/arginine-rich splicing factor 1
SRSF2: Serine/arginine-rich splicing factor 2
SRP20: Serine/arginine-rich splicing factor 3
TGF- α : Tumor growth factor alpha
TSIX: *XIST* antisense RNA
WT: Wild-type
XIST: X inactive specific transcript

Remerciements

Je voudrais prendre les quelques lignes suivantes afin de remercier toutes ceux et celles qui ont été présents pour me soutenir d'une façon ou d'une autre au cours de mes années de maîtrise.

Jonathan et futur "E" bébé Gauthier : Mon cher amour, je tiens à te remercier pour tout ce que tu fais pour moi. Depuis le début, tu m'as éclairé dans mon choix de maîtrise et tu m'as toujours supporté. Tu as toujours les bons mots et les bons gestes pour calmer mes états d'âme. À écouter mes pratiques de présentations orales, les mots trypsination, ARNnc, immunofluorescence ne sont plus des mystères pour l'informaticien que tu es. Je ne te remercierai jamais assez. De plus, tu embarques avec moi dans la grande aventure de parent! Notre petite fille qu'on adore déjà marque pour moi des étapes importantes de ma vie : L'achèvement de mes années d'études et le commencement de plusieurs années à tenter tant bien que mal d'être les meilleurs parents possible. Je t'aime petite princesse et j'ai hâte de te voir la binette. **Ma famille** : Merci à maman et papa de m'avoir encouragée dans mes études et de m'avoir transmis des valeurs aussi importantes que l'amour de la famille, l'honnêteté et l'intégrité. Ces valeurs je les transmettrai également à ma fille et mes enfants à venir. Je suis encouragée lorsque je vois dans vos yeux toute la fierté que vous portez pour moi et Marc-André. Petit frère, je te remercie également pour tous les fous rires que tu me donnes. Tu es un petit frère protecteur et tu sais comment me faire décrocher dans les moments les plus difficiles, merci énormément pour tout, tu seras un oncle formidable. Chloé, petite Chloé, merci pour ton soutien également. Tu es une personne exceptionnelle toujours présente pour corriger mes textes en anglais et un soutien moral d'enfer. Ton débordement d'énergie et ton aplomb m'ont grandement aidés. Finalement, merci à grand-papa et grand-maman. Je suis vraiment contente de partager avec vous tous ces beaux moments de famille. Vous êtes toujours fier et présent pour moi, vous prenez en note le nom de mon programme d'étude, afin de pouvoir répandre la bonne nouvelle à quel point vous êtes fiers de votre petite-fille. Grand-papa qui se renseigne toujours si ça va bien à l'école et grand-maman qui me prépare des chemins rocaillieux quand je viens chercher du réconfort à Chicoutimi. Merci d'être là pour moi! **Cath, Steph et Louise** : Merci Cath de m'avoir recrutée pendant le laboratoire de techniques microbio. Cela m'a permis non seulement de connaître une collègue de travail à l'esprit cartésien redoutable, mais également de trouver en toi une amie exceptionnelle, toujours à l'écoute et qui m'a grandement encouragé dans les moments plus difficiles! Steph et

Louise, un énorme merci. Premièrement, merci pour toute la formation que vous m'avez donnée, votre patience à expliquer les théories et votre rigueur scientifique. Deuxièmement, merci à vous deux et Cath pour tous les fous rires et les anecdotes que je garde précieusement en mémoire! On vous aura tout de même appris quelque chose : procrastination! **Audrey** : Notre petite stagiaire, merci pour tout le support que tu m'as apporté! **Mon cher français, Nic** : Merci pour ton soutien, tes soupirs devant ton ordinateur, tes services rendus afin de faciliter la vie d'une femme enceinte, et bien sûr, les fous rires! **Sophie** : Merci pour tes conseils. **Frédéric** : Merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire. Merci également pour ta grande compréhension et de m'avoir permis de participer à un projet de maîtrise aussi stimulant! **À tous mes amis, Jess, Marc-André et tous ceux que je n'ai pas nommés** : Merci!!

Je voudrais également remercier le Conseil de Recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour le financement de ce projet ainsi que le Fonds d'enseignement et de recherche de l'Université Laval pour ma bourse de maîtrise. Un merci également aux employés de la Faculté de Pharmacie et du Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec.

Avant-propos

Le présent mémoire intitulé « Implication du long ARN non-codant *NEAT2* dans la prolifération et le métabolisme énergétique des hépatocytes » est rédigé sous la forme d’insertion d’article et comprend une revue de la littérature reliée au sujet du présent mémoire. Ensuite, je présente l’hypothèse de la recherche ainsi que les objectifs qui lui sont rattachés. S’en suit la présentation des résultats de l’étude et finalement les principales conclusions obtenues des résultats et perspectives de recherche.

La section des résultats est composée d’un article inséré dans le mémoire intitulé « *NEAT2/ Malat1 promotes cell proliferation through its 61-bp mascRNA domain* » où je suis première auteure, est à soumettre pour publication dans le journal *Cancer Research*. Les co-auteurs de cet article sont mon directeur de recherche, le Dr Frédéric Picard ainsi que ses deux professionnelles de recherche, Stéphanie Miard et Louise Boivin. J’ai participé à la conceptualisation de cette étude avec l’aide du Dr Frédéric Picard. Pour cet article scientifique, j’ai effectué la grande majorité des manipulations et expériences à l’exception des résultats obtenus à la figure 1 et 2, qui ont été effectués et analysés conjointement par Louise Boivin et Stéphanie Miard. De plus, j’ai participé à la construction des figures, l’analyse des résultats ainsi qu’à la rédaction du manuscrit en collaboration avec le Dr Frédéric Picard.

Au cours de ma maîtrise, j’ai également rédigé un article de revue de la littérature, non inséré dans ce mémoire, intitulé « Les longs ARNs non-codants : régulateurs clés des maladies liées au vieillissement? » pour le périodique *Médecine Science Amérique (MSA)*, qui est sous presse au moment d’écrire ces lignes. Les co-auteurs sont le Dr Michel Lebel ainsi que mon directeur de recherche, le Dr Frédéric Picard.

1. Introduction

Mise en contexte

Le vieillissement de la population est un phénomène mondial préoccupant. L'augmentation de la proportion des personnes âgées amène une grande variété de complications tant chez la personne vieillissante que pour le système de santé. Le déséquilibre global des systèmes physiologiques caractérisé par le processus de vieillissement est associé à plusieurs maladies, dont le cancer. Le cancer est une maladie complexe qui touche deux personnes sur cinq au Canada et dont le taux d'incidence augmente avec l'âge selon la Société canadienne du cancer. Or, plusieurs études démontrent une forte corrélation entre l'initiation et/ou le développement de cette maladie et la dérégulation de l'expression de longs ARN non-codants (ARNnc). En général, les longs ARNnc ont un rôle de régulateurs épigénétiques et de l'expression de gènes, autant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel [1]. L'altération de leur expression résulte donc en plusieurs complications. Dans le cancer, la dérégulation de longs ARNnc spécifiques peut amener entre autres une augmentation de la prolifération et l'acquisition d'un potentiel métastatique [2]. L'acquisition de ces caractéristiques facilite l'initiation ou encore le développement du cancer. Toutefois, plusieurs fonctions et mécanismes des longs ARNnc restent encore à être élucidés.

Notre laboratoire a étudié plus spécifiquement un long ARNnc appelé *Nuclear enriched abundant transcript 2 (NEAT2)*, aussi connu sous le nom de *Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (Malat1)*. Il a été découvert dû à sa surexpression dans le cancer du poumon métastatique et est associé au développement de plusieurs autres types de cancer, dont celui du sein, du foie et du pancréas [3]. *NEAT2* semble être associé au phénomène de prolifération cellulaire et d'acquisition d'un potentiel de produire des métastases [4, 5]. La dérégulation de *NEAT2* pourrait avoir un rôle dans le développement du cancer, mais le mécanisme moléculaire à la base de ce phénomène n'est pas encore déterminé.

Dans ce contexte, les présents travaux ont tenté de démontrer que *NEAT2* pourrait lier le vieillissement et le risque de développement d'un cancer en modulant la prolifération *via* un rôle dans le métabolisme énergétique cellulaire.

1.1 Le vieillissement

Mondialement, le vieillissement de la population est un phénomène préoccupant. Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), la portion des gens âgés de 60 ans et plus est la tranche d'âge de la population qui augmente le plus rapidement. Cette augmentation de la proportion de la population vieillissante est due en partie à l'amélioration des soins de santé, des conditions socio-économiques, d'un boom de natalité après-guerre et de la diminution de la mortalité. Bien qu'une espérance de vie prolongée soit signe d'une amélioration sociale, elle entraîne également une augmentation de l'encombrement du système de santé, des coûts économiques liés au domaine de la santé ainsi que des besoins particuliers à prodiguer aux aînés. Le vieillissement est un processus normal et naturel sur lequel une certaine influence peut être observée tant au niveau génétique qu'environnemental. Effectivement, être en bonne santé lorsqu'on est jeune accroît les chances d'être en bonne santé également lorsqu'on est plus âgé. De plus, différents facteurs génétiques et biochimiques peuvent influencer la vitesse de déclin du fonctionnement de notre système biologique [6]. Les mécanismes tentant d'expliquer ces phénomènes sont d'actualité et représentent également un domaine de recherche actif.

1.1.1 Généralités

Le vieillissement chez l'humain est un processus naturel et progressif qui peut être en partie caractérisé par un déséquilibre global des systèmes physiologiques. Au fil du temps, ce déséquilibre amène entre autres une dégénérescence de certaines capacités acquises de l'être humain dont une diminution de la vision, de l'audition, de l'efficacité à guérir une plaie ainsi qu'une atténuation de la réponse immunitaire [7]. Cette dégénérescence affecte l'efficacité de fonctionnement de l'organisme entier et mène vers une mort graduelle [8]. Elle représente également un facteur de risque plus élevé pour plusieurs maladies comme le cancer, le diabète, certains désordres cardiovasculaires et maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer [9-11].

Le vieillissement est un processus extrêmement complexe et multifactoriel pouvant être influencé entre autres par la génétique, le mode de vie et la qualité de l'environnement, ce qui fait en sorte que ce processus est relatif à chaque individu [8, 12]. Il existe à ce jour plusieurs théories tentant d'expliquer le phénomène de vieillissement. Toutefois, la complexité de ce processus

amène plusieurs démonstrations permettant d'expliquer ce phénomène non pas par une seule théorie, mais bien par l'acquisition de plusieurs dénominateurs spécifiques communs à de nombreux organismes. Ces dénominateurs seraient en quelque sorte essentiels au phénomène de vieillissement, ou du moins y contribueraient fortement et détermineraient son phénotype [6]. Au cours du vieillissement, les caractéristiques acquises seraient : l'instabilité génomique, l'usure des télomères, l'altération épigénétique et de l'homéostasie des protéines, la dérégulation dans la détection des substances nutritives, la dysfonction mitochondriale, la sénescence cellulaire, l'épuisement de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches ainsi que l'altération de la communication intercellulaire [6]. Certains de ces éléments, comme l'instabilité génomique et l'usure des télomères, pourraient initier le déclenchement du processus de vieillissement de l'organisme. Les dommages encourus suite à ce déclenchement s'accumulent avec le temps et entraînent des conséquences aggravantes du phénotype de vieillissement [13]. Ces éléments initiateurs ne peuvent être que néfastes pour l'organisme. D'autres caractéristiques, par exemple la dysfonction mitochondriale et la sénescence cellulaire, ne sont pas nécessairement délétères pour l'organisme. En fait, selon les niveaux de sévérité des dommages, ces dernières peuvent protéger la cellule et ainsi avoir un effet bénéfique, comme c'est le cas pour la sénescence cellulaire qui protège jusqu'à un certain point l'organisme contre le cancer [14]. Elles sont plutôt considérées comme antagonistes et sont déclenchées en réponse aux dommages causés par les éléments initiateurs. L'altération de la communication intercellulaire et l'épuisement des cellules souches sont en fait des conséquences des autres caractéristiques et sont responsables du déclin fonctionnel associé au vieillissement [15, 16].

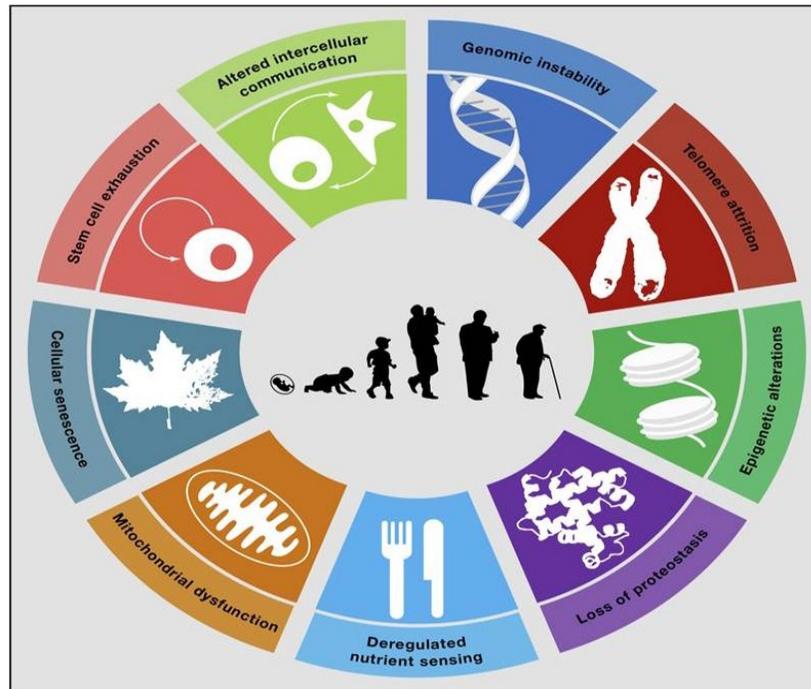


Figure 1 : Les neuf principales caractéristiques du vieillissement.

Schéma illustrant les 9 caractéristiques du vieillissement: instabilité génomique, usure des télomères, altérations épigénétiques, altérations de l'homéostasie des protéines, dérégulation de la détection des substances nutritives, dysfonction mitochondriale, sénescence cellulaire, épuisement de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches et altérations de la communication intercellulaire. Figure tirée de [6] (2013).

L'élaboration de ces caractéristiques communes favorisant le processus de vieillissement ne permet pas de répondre à toutes les questions entourant ce sujet. Toutefois, cela contribue fortement à l'avancement des études reliées au domaine ainsi qu'au développement de nouvelles interventions thérapeutiques potentielles ciblant les maladies associées au vieillissement pouvant ainsi améliorer la qualité de vie des personnes âgées. Étant complexe, il va de soi que les mécanismes provoquant le vieillissement de l'organisme sont initiés *via* plusieurs éléments. Les traits caractéristiques du vieillissement pertinents au sujet traité dans ce mémoire seront abordés plus en profondeur dans les sections subséquentes.

1.1.2 Caractéristiques de l'instabilité génomique

Comme mentionnée précédemment, l'instabilité génomique est une des caractéristiques communes initiant, ou du moins, favorisant grandement le phénomène de vieillissement de l'organisme. Une des causes de celle-ci est une augmentation du taux de dommage à l'ADN.

Cette dernière peut être induite par plusieurs facteurs ou mécanismes ainsi que par une déficience de réparation de ces divers types de dommages à l'ADN.

L'accumulation de dommages à l'ADN influence grandement l'instabilité génomique et se produit tout au long de la vie de la majorité des organismes [17]. Ces dommages peuvent être induits autant par des agents exogènes physiques, chimiques et biologiques que par des facteurs endogènes induisant des erreurs de réplication dans l'ADN ou encore favorisant la production d'espèces réactives oxygénées (ROS) par exemple [18]. Ces agents ou facteurs ont la capacité de causer différentes erreurs dans la séquence d'ADN soit de façon spontanée ou non. Ils peuvent induire également des délétions ou des insertions de nucléotides (nt), des cassures simples ou doubles brins de l'ADN et également des réarrangements chromosomiques [19]. Tout cela a pour conséquence de mettre à l'épreuve l'intégrité et la stabilité de l'ADN. Les dommages à l'ADN ne sont pas des événements rares, mais un taux trop élevé de dommages est délétère pour l'organisme. Certaines maladies caractérisées par un vieillissement prématuré, comme le syndrome de Werner et le syndrome de Bloom, impliquent entre autres une augmentation anormale d'accumulation de dommages à l'ADN [20].

La cellule est conçue pour pallier à ces dommages causés à l'ADN jusqu'à un certain niveau *via* des mécanismes de réparation de l'ADN qui influencent également l'instabilité génomique [21]. Le type d'altération détermine le mécanisme de réparation de l'ADN à utiliser [22]. Les cassures doubles brins peuvent être réparées par recombinaison homologue ou encore par un mécanisme nommé le *nonhomologous end-joining* (NHEJ). Le NHEJ joint simplement les deux terminaisons d'ADN où a eu lieu la cassure double brin. Elle est rapide, mais peu fidèle et est donc associée à une augmentation de la mutagenèse [23]. La recombinaison homologue pour être efficace, doit reconnaître une grande séquence d'homologie et s'effectue seulement après la réplication de l'ADN tandis que le NHEJ peut s'effectuer à n'importe quel moment du cycle cellulaire [24]. Les altérations de type cassure simple brin peuvent être réparées par recombinaison homologue et par un autre mécanisme nommé le *base-excision repair* (BER) [25]. Dans la majorité des cas, le mécanisme BER fonctionne en enlevant et remplaçant seulement un nucléotide et ce dernier intervient lors de dommages reliés à des agents alkylants ou oxydants [26]. Plusieurs autres mécanismes de réparation de l'ADN sont impliqués dans la stabilité génomique et reliés à des types de dommages à l'ADN bien précis [23].

L'importance des dommages à l'ADN et des mécanismes de réparation de ces derniers dans le vieillissement est non équivoque. Une augmentation excessive des dommages à l'ADN ainsi qu'une incapacité ou une déficience à réparer ces dommages déclenche le processus de vieillissement et dans certains cas, le cancer et certaines maladies reliées à un vieillissement prématuré [27].

1.1.3 Caractéristiques de l'usure des télomères

Hayflick, au début des années 1960, observa que les cellules somatiques humaines placées en culture possédaient un nombre de divisions cellulaires limité et finissaient par cesser de proliférer. Ce phénomène se nomme la sénescence réplivative ou limite de Hayflick [28]. La sénescence réplivative a été reliée au raccourcissement des télomères pour la première fois par Olovnikov [29]. Ces deux découvertes ont permis un avancement non seulement dans la recherche sur le vieillissement, mais également dans d'autres domaines de recherche connexes comme le cancer.

L'extrémité des chromosomes est à risque d'une dégradation impliquant une perte de séquence d'ADN importante. Ce risque de dégradation est dû au fait que l'ADN polymérase, qui synthétise de l'ADN de l'extrémité 5' à 3', est incapable d'effectuer une réplification complète et laisse systématiquement un segment non répliqué à l'extrémité 5' [30]. Pour pallier à ce problème, une enzyme appelée la télomérase, une transcriptase inverse qui utilise une matrice d'ARN, synthétise de courtes séquences d'ADN répétitives riches en G/T qu'on dénomme les télomères [31]. Le raccourcissement des télomères s'effectuant à chaque division cellulaire n'est pas reconnu comme un dommage à l'ADN par les mécanismes de réparation, grâce à la présence d'un complexe, dénommé shelterine, fixé au bout des télomères [32]. Ce raccourcissement explique la sénescence réplivative et l'arrêt de la prolifération.

Le raccourcissement des télomères est un phénomène qu'on retrouve dans le processus de vieillissement normal autant chez la souris que chez l'humain [33]. Une dysfonction reliée aux télomères, causée entre autres par une déficience d'activité de la télomérase ou du complexe de shelterine, est associée à l'accélération du vieillissement et peut être reliée à certaines maladies de vieillissement prématuré [34, 35]. Différentes études ont démontré qu'en induisant une

stimulation de la télomérase dans certains cas précis de déficience d'activité reliée aux télomères, un ralentissement du vieillissement était remarqué dans les modèles murins [36].

Les télomères permettent la protection des séquences d'ADN essentielles à la cellule qui sont présentes sur le chromosome et de ce fait, augmente la stabilité génomique. Le raccourcissement des télomères est donc un processus qui déclenche le processus de vieillissement et est de ce fait, une caractéristique centrale.

1.1.4 Caractéristiques de la dysfonction mitochondriale

La dysfonction mitochondriale est une des caractéristiques communes favorisant le processus de vieillissement comme abordé précédemment. Cette dysfonction peut être déclenchée par plusieurs facteurs comme une augmentation des mutations de l'ADN mitochondrial, une déstabilisation dans le complexe de la chaîne de transport d'électrons, une altération de la dynamique mitochondriale due à une perméabilisation des membranes, une augmentation des signaux de stress et plusieurs autres facteurs [37-39]. Une dysfonction mitochondriale peut engendrer une augmentation du taux de ROS, une diminution de la biogenèse, une augmentation de la mort cellulaire et de l'inflammation. La dysfonction mitochondriale peut aggraver le phénomène de vieillissement ou non, selon les facteurs initiateurs et les niveaux générés de stress [40].

Une altération dans la fonction de la mitochondrie initiée par plusieurs facteurs peut induire une production de ROS. Les ROS sont des produits dérivés de la réduction de l'oxygène, incluant des radicaux libres et des superoxydes, induisant des dommages à une variété de macromolécules telles des protéines, des lipides et des acides nucléiques. La détoxification des ROS est contrôlée par des réseaux d'antioxydants complexes, enzymatiques ou non, permettant l'inactivation ou encore la dégradation de ces derniers. Évidemment, la balance entre la production et la détoxification des ROS est essentielle à l'homéostasie cellulaire et une altération dans cette balance en faveur de l'augmentation des ROS cause un stress oxydatif [41]. La théorie des radicaux libres mitochondriaux propose qu'une altération progressive des fonctions de la mitochondrie, usuelle avec le vieillissement, engendre une augmentation du taux de génération de ROS qui, dans un cycle vicieux, favorise à son tour une plus grande détérioration des fonctions de la mitochondrie [42]. Jusqu'à un certain seuil, le taux de ROS est associé à des signaux de

survie cellulaire. Toutefois, lorsque les niveaux de ROS sont anormalement élevés ou chroniques, ils produisent des dommages cellulaires importants induisant le vieillissement de l'organisme [43]. Ce double rôle exercé par les ROS permet d'expliquer certaines observations controversées. En effet, des études chez certains organismes comme *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), ont démontré qu'une augmentation de production des ROS peut augmenter la longévité. Toutefois, chez certaines souris modifiées génétiquement pour produire un taux élevé de ROS et des dommages oxydatifs, le vieillissement n'est pas accéléré [44, 45]. D'autres études démontrent que dans certains organismes âgés, une accumulation de dommages à l'ADN et aux protéines causés par l'action des ROS est observée [46, 47]. L'implication claire des ROS dans le vieillissement n'est donc pas encore établie.

D'un autre côté, la dysfonction mitochondriale peut induire le vieillissement indépendamment de la production de ROS. En effet, l'augmentation de la perméabilisation membranaire mitochondriale permettant le relargage de différentes molécules pro-apoptotique, le cytochrome c par exemple, accroît le signal apoptotique et favorise le processus de vieillissement [6, 48]. Une dysfonction mitochondriale peut également jouer un rôle pro-inflammatoire non seulement en augmentant le taux de ROS, mais également en induisant une perméabilisation membranaire qui favorise une réponse inflammatoire [49]. Ces changements dans l'intégrité de la mitochondrie ont des conséquences aggravantes liées au processus de vieillissement. Une altération de la bioénergétique mitochondriale est également une conséquence de la dysfonction mitochondriale pouvant être impliquée dans une accélération du processus de vieillissement [50].

La dysfonction mitochondriale a des impacts profonds sur le processus de vieillissement impliquant plusieurs mécanismes différents comme l'augmentation du stress oxydatif, du signal de l'apoptose ou encore de la réponse inflammatoire. Tous ces processus peuvent avoir un effet accélérant sur le vieillissement. Toutefois, la preuve que le rétablissement des fonctions mitochondriales permettrait un ralentissement du vieillissement est moins évidente.

1.1.5 Caractéristiques de la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire n'est pas une caractéristique commune initiatrice du vieillissement, mais elle en favorise le processus, selon le niveau auquel la sénescence cellulaire

est enclenchée. Elle fait suite à certaines caractéristiques initiatrices comme l'instabilité génomique et le raccourcissement des télomères.

La sénescence cellulaire peut être caractérisée par un arrêt irréversible du cycle cellulaire ainsi que par plusieurs changements autant morphologiques que physiologiques de la cellule [51]. La sénescence cellulaire a été étudiée pour la première fois par Hayflick et reliée au raccourcissement des télomères [28]. Ce processus peut être induit non seulement par des signaux télomériques, mais également par d'autres signaux non-télomériques comme des dommages à l'ADN liés au stress oxydatif, des signaux mitotiques, des agents remodelant de la chromatine et autres signaux [52]. Une autre caractéristique des cellules sénescents est qu'elles expriment de façon spécifique la β -galactosidase qui peut être utilisée comme marqueur spécifique de la sénescence cellulaire [53, 54].

L'accumulation de cellules sénescents dans différents tissus est associée au processus de vieillissement global de l'organisme [55, 56]. Cette accumulation au cours du vieillissement peut être causée par une augmentation du nombre de cellules sénescents ou encore par une diminution de leur disparition liée à une réponse immunitaire affaiblie par exemple [6]. La sénescence, en induisant un arrêt du cycle cellulaire, arrête également la prolifération cellulaire et possède donc un effet protecteur du cancer jusqu'à un certain seuil [57]. Passé ce seuil, l'accumulation des cellules sénescents augmente le nombre de dommages cellulaires, entre autres *via* une altération de leur sécrétome, et favorise ainsi le vieillissement [58, 59].

Certains signaux mitotiques produits de façon excessive peuvent également activer ou inactiver des voies signalétiques et induire la sénescence comme mentionnée plus haut. Parmi les voies signalétiques impliquées les plus importantes se retrouvent les voies $p16^{\text{INK4a}}/\text{Rb}$ et $p19^{\text{ARF}}/\text{p53}$ [60]. Plusieurs études démontrent une forte corrélation entre l'expression de $p16^{\text{INK4a}}$ et l'âge chronologique de plusieurs tissus autant chez la souris que chez l'humain [61]. Lorsque les dommages deviennent trop abondants, la capacité régénératrice du tissu peut être saturée ou encore grandement affaiblie, et c'est dans ces conditions que la réponse par les voies $p53$ et $\text{INK4}/\text{ARF}$ devient délétère ou accélère le vieillissement [62, 63].

La caractéristique de la sénescence cellulaire n'est pas considérée comme initiatrice du processus de vieillissement dû entre autres à son effet potentiellement bénéfique contre le cancer.

Elle favorise cependant le processus de vieillissement lorsque le nombre de cellules sénescentes produit est trop grand ou lorsque leur élimination est diminuée.

Le vieillissement est donc un processus très complexe pouvant être initié par plusieurs facteurs et sur lequel chaque individu peut avoir un contrôle, mais ce, jusqu'à un certain point seulement. Quelques notions sur l'implication spécifique de certaines caractéristiques communes influençant le processus de vieillissement restent encore à être étudiées plus largement. Même si le vieillissement d'un organisme est un phénomène naturel, la recherche dans ce domaine doit s'intensifier afin d'améliorer les connaissances des maladies associées au vieillissement comme le syndrome de Werner, la maladie d'Alzheimer et le cancer, et ainsi proposer des thérapies plus efficaces aux personnes atteintes de ces maladies.

1.1.6 Le métabolisme lors du vieillissement

Le vieillissement d'un organisme, comme mentionné plus haut, peut être initié par plusieurs traits caractéristiques et amène plusieurs déséquilibres physiologiques au niveau de l'organisme entier. En effet, les personnes âgées font souvent face à certains problèmes comme une intolérance au glucose, une hypertension et un changement dans la composition corporelle dont une diminution de la masse musculaire et osseuse ainsi qu'une augmentation de la masse adipeuse [64]. Certains de ces problèmes peuvent être attribués à un déséquilibre métabolique [65].

L'homéostasie métabolique a un rôle central à jouer dans le vieillissement et cela a été démontré entre autres dans plusieurs modèles [66]. L'implication du métabolisme dans le processus de vieillissement a été prouvée pour la première fois chez *C. elegans* dans les années 1990 par Thomas Johnson et Cynthia Kenyon. Ils ont démontré qu'en inactivant les gènes *Ageing alteration-1* (Age-1), ou *Abnormal Dauer formation-2* (Daf-2), la durée de vie du ver est doublée [67, 68]. Age-1 est l'homologue de la sous-unité catalytique de la phosphoinositol 3-kinase (PI3K) et Daf-2 est le seul homologue du récepteur à l'insuline et à *Insulin growth factor-1* (IGF-1). Ce lien a été également démontré un peu plus tard chez la drosophile et la souris [69, 70]. L'effet d'une mutation au niveau de la PI3K, du récepteur à l'insuline ou d'IGF-1 entraîne une rupture dans la cascade de phosphorylation qui a pour ultime cible *Forkhead box O* (FOXO). FOXO n'étant pas phosphorylé, ce dernier n'est plus séquestré dans le cytoplasme et peut être

déplacé au noyau. Cette translocation nucléaire permet l'activation de la transcription de gènes impliqués entre autres dans la réponse au stress permettant ainsi une augmentation de la longévité [71]. Étant donné l'implication de la voie de l'insuline et de FOXO dans la longévité chez le ver, la drosophile et la souris, cette même association pourrait être faite chez l'humain. Toutefois, les preuves de cette association chez l'humain restent encore à être démontrées.

Une autre voie de signalisation qui pourrait relier le métabolisme et le vieillissement est celle de *Mechanistic target of rapamycin* (mTOR). En effet, mTOR est connu pour coupler l'énergie et l'abondance nutritive à la prolifération et la division cellulaire [72]. Le complexe 1 de mTOR (mTORC1) pourrait être impliqué dans la régulation du processus de vieillissement. En fait, l'action de mTORC1 permettrait l'accélération du vieillissement. L'inhibition de ce complexe permet l'augmentation de la longévité chez certains organismes et pourrait avoir un effet bénéfique également chez l'humain [73]. Toute inhibition dans la voie de signalisation de mTOR pourrait non seulement avoir un effet bénéfique sur le vieillissement de plusieurs organismes, mais également sur certaines maladies associées au vieillissement [74]. Certains agents thérapeutiques ciblant mTOR ou étant des analogues de la rapamycine sont actuellement en développement ou cliniquement approuvés afin de ralentir le vieillissement [74, 75].

La voie de signalisation de mTOR est non seulement impliquée dans le vieillissement, mais également dans le cancer. En effet, différents acteurs dans la voie de signalisation de mTOR sont connues pour être mutés dans plusieurs types de cancer par exemple PI3K, protéine kinase B (PKB ou AKT) et *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) [74]. Le cancer est une maladie associée au vieillissement et certaines caractéristiques du vieillissement normal d'un organisme sont connues pour être altérées dans plusieurs types de cancer [76].

1.2 Le cancer

Le cancer est une maladie génétique dont l'incidence augmente avec l'âge. En effet, selon la Société canadienne du cancer, 88 % des Canadiens qui développent un cancer ont plus de 50 ans, même si certains types de cancer peuvent affecter une population plus jeune. Au Canada, deux personnes sur cinq développeront un cancer au cours de leur vie et malheureusement, une personne sur quatre en décèdera. De plus, les provinces de l'Atlantique et du Québec sont celles où le taux d'incidence ainsi que le taux de mortalité sont les plus élevés au pays, possiblement dû

au fait d'un taux de tabagisme plus élevé dans ces provinces [77]. Certains types de cancer, comme celui du poumon, sont détectés à des stades très avancés et les chances de survies sont moindres dû à ce retard de détection. D'autres types de cancer peuvent être détectés plus tôt, mais les traitements thérapeutiques peuvent devenir inefficaces suite au développement d'une résistance au traitement par le patient. La recherche sur le cancer, malgré de nombreuses percées ces dernières années, reste un domaine où les efforts doivent persister.

1.2.1 Généralités

De façon très simpliste, le cancer est une maladie causée par une prolifération cellulaire incontrôlée au mauvais moment, au mauvais endroit et qui est induite par des signaux oncogéniques [78]. Pour qu'une cellule devienne cancéreuse, elle doit initialement subir une mutation et par la suite plusieurs autres modifications et mutations. Toutefois, ce n'est pas toutes les mutations qui vont causer des altérations cancéreuses [79]. En fait, afin d'avoir l'implantation d'une tumeur, une cellule normale doit avoir acquis, *via* un réseau signalétique complexe, une combinaison d'altérations menant premièrement vers une autonomie proliférative et deuxièmement, vers une inhibition des signaux de mort cellulaire ou vice-versa, la transformant en cellule cancéreuse [80]. L'acquisition de ces deux phénomènes correspond à l'implantation d'une plate-forme minimale pour la progression tumorale et peut s'échelonner sur plusieurs années. Si l'altération ne se fait pas au niveau de la prolifération et de la mort cellulaire, la cellule possède un certain pouvoir compensatoire [81]. En effet, la cellule est programmée pour avoir une balance entre le taux de prolifération et le taux de mort cellulaire et peut induire divers mécanismes afin de contrer ce déséquilibre [82]. Le cancer amène donc un déséquilibre de ces deux voies en augmentant la prolifération et diminuant la mort cellulaire.

Malgré le fait qu'il existe une variété de mutations associée à plusieurs types de cancer et que ces derniers émergent d'une multitude de tissus différents, Hannahan et Weinberg ont proposé, en 2000, que toutes les cellules cancéreuses doivent acquérir 6 caractéristiques communes favorisant le développement du cancer. Ces caractéristiques sont : une autosuffisance en signaux de croissance, une insensibilité aux signaux d'anti-croissance, une inhibition de l'apoptose, un potentiel de réplification illimité, une angiogenèse continue et une acquisition d'un potentiel métastatique et d'invasion tissulaire [83]. L'ordre par lequel la cellule acquiert ces

caractéristiques n'est toutefois pas important. Dans certains cas, une altération va permettre à la cellule d'acquérir plus d'une caractéristique essentielle tandis que dans d'autres cas, plusieurs altérations seront nécessaires pour en acquérir qu'une seule. Par exemple, la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur p53 permet non seulement une augmentation de l'angiogenèse autour des cellules cancéreuses, mais également une résistance à l'apoptose ainsi qu'une instabilité génomique [84, 85]. La publication des 6 caractéristiques communes a permis une certaine simplification ainsi qu'une re-conceptualisation de la biologie cellulaire reliée au cancer. Cela a créé de grands changements dans la façon d'étudier les différents modèles autant *in vitro* qu'*in vivo*. Les tumeurs sont maintenant considérées comme étant extrêmement hétérogènes et les nombreux signaux d'échanges entre ces différentes cellules cancéreuses d'une même tumeur paraissent être essentiels.

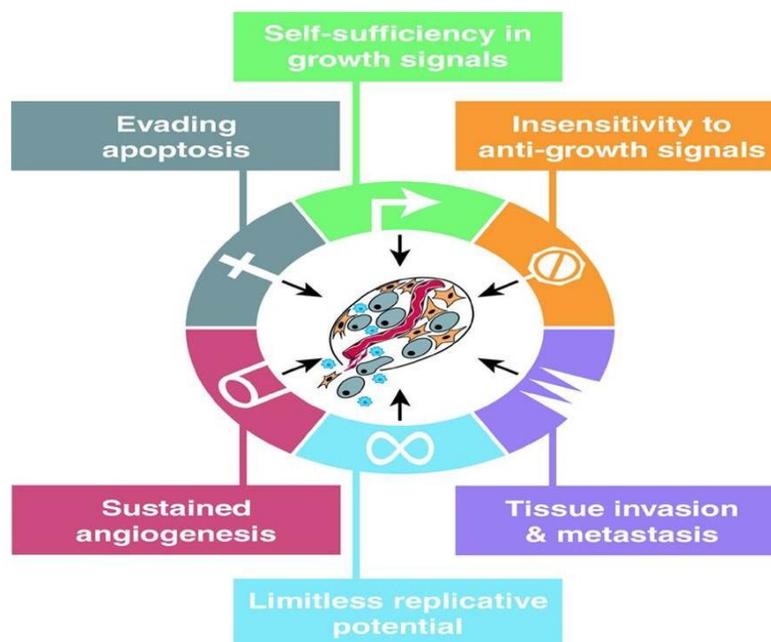


Figure 2 : Caractéristiques essentielles au développement d'un cancer.

Les 6 caractéristiques communes aux cellules cancéreuses et essentielles au développement d'un cancer : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux d'anti-croissance, l'inhibition de l'apoptose, le potentiel de réplication illimité, l'angiogenèse continue et l'acquisition d'un potentiel métastatique et d'invasion tissulaire. Figure tirée de [83] (2000).

Suite aux fondements établis par Hanahan et Weinberg, les recherches sur le développement du cancer ont tellement évolué qu'en 2011, d'autres caractéristiques essentielles

ainsi que des caractéristiques permissives ont émergé à la lumière des nouvelles connaissances acquises. En effet, afin de soutenir la prolifération néoplasique soutenue remarquée lors du développement d'une tumeur, une des nouvelles caractéristiques essentielles est la reprogrammation, ou du moins la modification du métabolisme énergétique cellulaire à l'avantage des cellules cancéreuses. La deuxième caractéristique permet aux cellules cancéreuses d'éviter ou de s'échapper de la destruction immunitaire, effectuée par des lymphocytes T et B ainsi que par des macrophages. Ensuite, certaines caractéristiques semblent être permissives et donc favorisent le développement du cancer sans toutefois être essentielles à son développement. Ces caractéristiques permissives sont l'augmentation de l'instabilité génomique et des mutations ainsi que l'augmentation de l'inflammation [86].

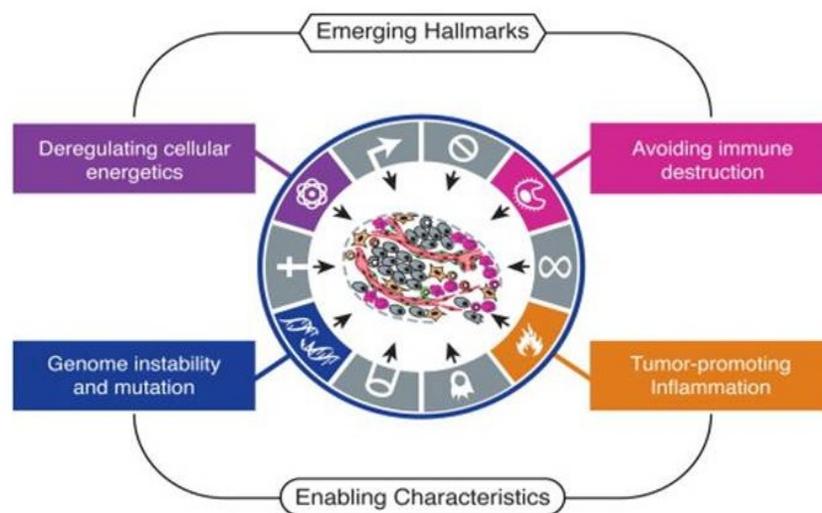


Figure 3 : Nouvelles caractéristiques essentielles et permissives au développement du cancer.

Les deux nouvelles caractéristiques essentielles sont la reprogrammation ou dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire et l'évasion de la destruction immunitaire. Les caractéristiques permissives favorisent la progression du cancer sont l'augmentation de l'instabilité génomique et des mutations ainsi que l'augmentation de l'inflammation. Figure tirée de [86] (2011).

L'élaboration de ces caractéristiques communes à toutes les cellules cancéreuses permet d'établir les fondements de la biologie cellulaire liée au cancer. Cela permet également un avancement considérable dans ce domaine de recherche. Les caractéristiques essentielles au

développement d'un cancer pertinentes au sujet traité dans ce mémoire seront abordées plus spécifiquement dans les prochaines sections.

1.2.2 Caractéristiques de l'autosuffisance en signaux de croissance

Les cellules normales composant un tissu contrôlent la destinée des unes des autres *via* une communication mutuelle. Une cellule peut passer d'un état quiescent à un état actif de prolifération en réponse à divers facteurs de croissance ou mitogènes seulement lorsque le contexte environnemental le permet [87]. À ce moment, ce sont les mitogènes qui permettent la progression du cycle cellulaire et ainsi une activation de la prolifération cellulaire [88]. Les cellules cancéreuses quant à elles, prolifèrent à un rythme anormalement élevé et pour en être capable, elles doivent interrompre la communication mutuelle avec les cellules saines et devenir indépendantes des signaux provenant de l'environnement [89].

La dérégulation de la prolifération en faveur des cellules cancéreuses se fait en ciblant des points de contrôle précis ou encore des points contraignants du cycle cellulaire [90]. Une des classes d'altérations ou de mutations nécessaires est celle qui permet une abolition de la nécessité des mitogènes externes. Cela permet aux cellules cancéreuses de pouvoir proliférer indépendamment de l'environnement [91]. Les cibles de ces altérations sont entre autres les récepteurs à tyrosine kinase, comme les récepteurs à *Platelet-derived growth factor* (PDGF) et *Tumor growth factor alpha* (TGF- α). Les mutations affectant ces récepteurs permettent généralement une activation constitutive, c'est-à-dire une activation même en absence de ligand [92]. D'autres altérations peuvent avoir comme conséquence une stimulation autocrine du mitogène ou encore un ciblage de certains transducteurs du signal comme Ras et *Rous Sarcoma oncogene* (Src) [93]. Ces mutations permettent une hyperactivation des voies de signalisation mitogéniques dans les cellules cancéreuses et ainsi, une activation du cycle cellulaire et de la prolifération de façon indépendante de l'environnement de ces cellules.

Une autre classe d'altérations permettant une prolifération accrue des cellules cancéreuses est celle ciblant le point de restriction régulé par la protéine du rétinoblastome (pRb) en phase G1 du cycle cellulaire [94]. Le point de restriction est un point de non-retour qui est relié à une hyper-phosphorylation de pRb permettant le relâchement d'un facteur de transcription E2F (E2F), ayant comme conséquence une progression dans le cycle cellulaire. Plusieurs mutations

peuvent cibler ce point de restriction comme une mutation au niveau de pRb même, des protéines permettant sa phosphorylation, les *Cyclin-dependent kinase* (CDK), ou encore des inhibiteurs de CDK [95]. En fait, toute mutation susceptible d'entraîner une augmentation du relâchement de E2F et permettre de contourner le point de restriction du cycle cellulaire va favoriser une augmentation du taux de prolifération.

Toutes ces altérations procurent aux cellules cancéreuses un avantage sélectif lors du processus de développement d'un cancer. En fait, ces mutations causent une dérégulation dans le cycle cellulaire favorisant la prolifération cellulaire aux dépens des cellules environnantes. Certaines de ces mutations sont fréquentes dans plusieurs types de cancer comme des mutations sur Ras et Src [96, 97]. L'acquisition d'une autonomie proliférative est un des tournants dans le développement d'un cancer et l'implication par le fait même du cycle cellulaire dans le cancer est centrale.

1.2.3 Caractéristiques de l'acquisition du potentiel métastatique et d'invasion

Une tumeur est extrêmement hétérogène et associée à une augmentation de la prolifération, et ce, indépendamment des signaux provenant des cellules saines environnantes [81, 98]. Même si elle est associée à une prolifération accrue, la tumeur est localisée dans un tissu bien précis [99]. Une étape signe d'une progression et d'une complexification de la tumeur se fait par l'acquisition d'un potentiel métastatique et d'invasion. Le cancer est souvent associé à un grand taux de mortalité et dans 90 % des cas, la mortalité est associée au développement de tumeurs présentes à des sites secondaires distant du site primaire, des métastases [100]. Le traitement des métastases est donc un des plus grands défis cliniques et thérapeutiques.

L'acquisition du potentiel de produire des métastases et d'envahir d'autres tissus permet aux cellules cancéreuses, à travers la réussite de plusieurs étapes, de se détacher de la tumeur primaire et de traverser la membrane basale. Ces cellules cancéreuses circulent ensuite par les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour envahir un nouveau site et ainsi produire une métastase à un site parfois très loin du site de la tumeur primaire [101]. Ce processus à plusieurs étapes est associé à l'altération de plusieurs protéines dont certaines impliquées dans les adhésions cellules-cellules dont les *Cell adhesion molecules* (CAM), dans les interactions cellules-matrice extracellulaires comme les intégrines ainsi que dans les interactions cellules-environnement *via* la

E-cadhérine [102, 103]. Les cellules qui ont acquis un potentiel métastatique et d'invasion, vont être capables d'induire une transition, qu'on appelle la transition épithéliale-mésenchymale (EMT), pouvant être transitoire ou non, et qui facilite entre autres la traversée de différentes membranes ou parois durant leur périple vers un site secondaire [86, 104].

Bien que les différentes interactions d'adhérences des cellules cancéreuses avec leur environnement sont importantes, elles ne permettent pas d'expliquer complètement le phénomène de production de métastases. Une étude récente a procédé à un profilage de l'expression des gènes d'échantillons provenant de tissus tumoraux et analysés par micropuce d'ADN afin de comparer les niveaux d'expression des gènes. Cette comparaison a permis d'établir une signature moléculaire distincte et de séparer les patients selon l'état du pronostic [105]. L'étude moléculaire des métastases a donc été approfondie davantage et plusieurs preuves démontrent qu'il existe à la fois une disparité et une similarité entre la tumeur primaire et les métastases produites. La similitude peut être expliquée entre autres par le fait que le potentiel métastatique peut être prédit en analysant la signature moléculaire de la tumeur primaire et part l'expression différentielle de gènes de métastases ou suppresseurs de métastases [106]. Les gènes suppresseurs de métastases sont actuellement plus étudiés et par définition, sont des gènes dont la fonction est de bloquer la formation de métastases sans toutefois avoir d'incidence sur la croissance de la tumeur primaire. Il en va de soi que ces derniers sont inhibés dans les tumeurs allant faire des métastases et pourraient être des cibles thérapeutiques ou du moins, certains agents thérapeutiques pourraient mimer leurs actions afin de diminuer les risques de produire des métastases [107].

La caractéristique d'acquisition du potentiel métastatique et d'invasion est parmi celles qui ont le plus d'impact sur la réussite d'un traitement contre le cancer et sur le taux de mortalité. À ce jour, peu de choses sont connues des métastases malgré le fait qu'ils représentent un des plus grands défis cliniques et thérapeutiques. En poussant plus loin l'étude portant sur l'expression différentielle des gènes métastatiques et suppresseurs de tumeurs et sur leurs mécanismes d'action, il sera possible d'améliorer les traitements offerts aux patients ainsi que leurs chances de survies.

1.2.4 Caractéristiques de la reprogrammation du métabolisme énergétique cellulaire

Une des caractéristiques des cellules cancéreuses est qu'elles ont un fort pouvoir de réplication ce qui entraîne un taux de prolifération accru. Afin de soutenir le besoin d'un apport soutenu en éléments de construction (synthèse d'acides aminés, de lipides et d'acides nucléiques), les cellules cancéreuses vont reprogrammer le métabolisme énergétique de la cellule à leur avantage [108]. Plusieurs des sentiers métaboliquement actif durant la prolifération, comme celui du glucose, sont sous le contrôle de voies de signalisation impliquant plusieurs oncogènes et suppresseurs de tumeur [109]. Cette reprogrammation du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses est donc primordiale et essentielle pour la carcinogénèse.

En conditions aérobies, les cellules normales vont transformer le glucose en pyruvate *via* la glycolyse pour ensuite se diriger en grande majorité dans la mitochondrie et entrer dans le cycle de Krebs. Le pyruvate qui n'est pas entré dans le cycle de Krebs ou si l'organisme est en conditions anaérobies, va être transformé en lactate [110]. Le premier à observer une caractéristique distincte du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses est Otto Warburg dans les années 1930. Ce dernier a découvert qu'autant en présence ou en absence d'oxygène, le glucose est transformé par la glycolyse en pyruvate et que 85 % est ensuite converti en lactate [111, 112]. Ce processus a été dénommé la glycolyse aérobie ou l'effet Warburg.

En proliférant de façon accrue, les cellules cancéreuses doivent augmenter considérablement l'entrée de glucose dans la cellule et plusieurs dérégulations vont permettre cette reprogrammation du métabolisme [112]. Une des dérégulations observées dans certains types de cancer est l'augmentation de l'expression des transporteurs du glucose, par exemple GLUT1, qui sont les premiers acteurs dans la glycolyse [113]. La glycolyse peut être stimulée par certains mitogènes et l'activation constitutive de leurs récepteurs est fréquente dans plusieurs tumeurs. Cette activation constitutive des récepteurs peut également induire une activation accrue de la voie de la tyrosine kinase ou de la PI3K/Akt, deux oncogènes clés liant le métabolisme et la prolifération [114]. L'activation d'AKT *via* la voie de la PI3K, favorise l'entrée de glucose dans la cellule en activant les transporteurs de glucose situé au tout début de la glycolyse [115]. Cette même voie permet également l'activation de l'hexokinase qui permet la transformation du glucose en glucose-6-phosphate. Ce premier métabolite est utilisé non seulement pour la

glycolyse, mais également dans la voie des pentoses phosphates. Ensuite, l'activation de la tyrosine kinase permet l'inhibition de la pyruvate kinase M2. Cette diminution d'activité de la pyruvate kinase diminue l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs [112]. Toute cette reprogrammation du métabolisme du glucose amène alors une redistribution de l'utilisation de ce dernier menant entre autres vers la synthèse d'acides aminés et de nucléotides. Cela permet ainsi à la cellule de se procurer tout le nécessaire pour la formation de nouvelles cellules. Plusieurs autres oncogènes non mentionnés plus haut sont également impliqués de près ou de loin à l'augmentation de l'entrée du glucose, mais ne seront toutefois pas abordés dans ce mémoire [86, 112, 115].

L'implication des oncogènes dans plusieurs aspects du processus de carcinogenèse est bien connue. Toutefois, il y a émergence d'autres molécules et d'autres gènes pouvant être impliqués dans le développement d'un cancer comme les longs ARNnc. Le cancer n'est donc pas seulement relié à l'expression différentielle des protéines, mais également à celle des longs ARNnc.

1.3 Les longs ARNs non-codants

Seulement 1 % du génome humain code pour des protéines fonctionnelles. Certaines portions des 99 % restants ont toutefois des fonctions primordiales à l'organisme, notamment les segments du génome humain contenant des ARNnc [116]. Les ARNnc peuvent être divisés en fonction de la longueur du transcrit. En effet, il y a les petits ARNnc, d'une longueur maximale de 200 paires de bases (pb) et les longs ARNnc qui sont d'une longueur de plus de 200 pb [117]. L'effort de recherche scientifique portant sur le domaine des longs ARNnc en est toutefois qu'à ses débuts. Malgré la grande avancée des connaissances en lien avec ces longs transcrits, plusieurs de leurs fonctions et de leurs mécanismes restent encore à être plus intensément étudiés.

1.3.1 Description

Les longs ARNnc sont des transcrits étant exprimés chez plusieurs sinon tous les organismes et ces derniers se comptent par dizaine de milliers [118]. Malgré le fait qu'ils ne codent pour aucune protéine, ces derniers ont une importance biologique soulignée par le fait qu'il existe une pression de sélection quant à leur régulation [119]. La transcription de plusieurs

longs ARNnc se fait par l'action de l'ARN polymérase 2. Ils peuvent subir également quelques modifications dont un ajout d'une coiffe à l'extrémité 5', une polyadénylation à l'extrémité 3' ainsi qu'un épissage. Tous ces processus de modifications sont subis également par les ARN messenger (ARNm) expliquant ainsi la similarité structurale entre certains longs ARNnc et ARNm. De plus, certains longs ARNnc possèdent un court cadre de lecture ouvert ne servant pas à la production de protéines, ou du moins, d'une quantité très faible et non fonctionnelle [120]. La conservation de ces derniers à travers divers organismes n'a pas lieu pour la totalité de ces transcrits. En fait, il semble que la conservation à travers les organismes ne touche que certaines classes précises de longs ARNnc seulement [121].

Les connaissances acquises récemment sur les longs ARNnc nous permettent l'établissement d'une base afin de pousser les recherches vers un niveau de compréhension fonctionnelle et d'implication biologique plus élevé. Toutefois, c'est grâce entre autres à l'avancement technologique que ces bases ont pu être établies.

1.3.2 Découverte

Les longs ARNnc ont été longtemps délaissés par la communauté scientifique. Ils ont tout d'abord été mis de côté dû au fait qu'ils ne codaient pour aucune protéine et ensuite dû à la longueur excessive du transcrit produit, allant généralement à plus de 1000 pb pour certaines classes [122].

Le premier long ARNnc, dénommé *imprinted maternally expressed transcript (H19)*, a été découvert en 1990, et ce, avant même l'utilisation du terme. À l'époque, le gène *H19* était décrit comme étant inhabituel et son produit, une petite molécule d'ARN, était caractérisé comme une molécule différente d'un ARNm classique [123]. Quelques longs ARNnc ont été découverts par la suite, comme *X inactive specific transcript (XIST)* et son long ARNnc anti-sens associé *TSIX* [124, 125]. Toutefois, l'émergence de la plupart des longs ARNnc s'est effectuée suite à certains avancements technologiques et connaissances génomiques. En effet, le dévoilement, au début des années 2000, du séquençage complet du génome humain a eu comme conséquence une percée primordiale dans l'avancement scientifique des domaines de recherches liés aux portions non-codantes du génome [126]. Parallèlement aux connaissances acquises suite au séquençage du génome humain, l'avancement technologique tels l'arrivée des micropuces, le séquençage de

l'ARN ainsi que le projet *Encyclopedia of DNA elements* (ENCODE) a permis également l'identification et la caractérisation de nombreux longs ARNnc [127].

La découverte de plusieurs milliers de longs ARNnc a amené les scientifiques à pousser encore plus loin les recherches portant sur ces longs transcrits afin d'établir les bases de leur classification et ainsi élucider certains de leurs mécanismes.

1.3.3 Classification

La classification des longs ARNnc est primordiale afin de permettre une meilleure compréhension et uniformisation des termes. En étant au tout début de la recherche sur les longs transcrits d'ARN, la classification de ces derniers n'est pas standardisée à travers la communauté scientifique. Avec l'avancement des recherches sur les longs ARNnc, les connaissances se peaufinent, laissant lieu à plusieurs changements dans la classification de ces derniers.

La classification des longs ARNnc est basée sur leur localisation génomique [122]. De ce fait, les longs transcrits d'ARNnc peuvent être divisés en 5 classes différentes : sens, anti-sens, intronique, divergent et inter-génique [1, 128]. Les longs ARNnc étant dans les classes sens et anti-sens sont initiés dans une portion d'un gène codant pour une protéine ou dans sa portion 3'. Ces derniers sont transcrits dans la même direction que le gène (sens) ou dans la direction opposée (anti-sens) et chevauchent généralement au moins un exon codant. Les transcrits d'ARN compris dans la classe intronique ne chevauchent aucun exon codant. Ils sont initiés dans un intron d'un gène et leur transcription peut être effectuée dans les deux directions. Dans la classe des longs ARNnc divergents, la transcription peut être également effectuée dans les deux directions. Ce qui caractérise cette classe de longs transcrits est que le site d'initiation se fait à proximité d'un promoteur d'un gène codant pour une protéine. Ce site se situe généralement à une centaine de pb du promoteur, mais cette distance n'est toutefois pas encore définitivement établie. Finalement, la classe inter-génique contient des longs ARNnc dont le site d'initiation est généralement éloigné de 5000 pb d'un gène codant pour une protéine. Cette distance empêche tout chevauchement. L'initiation de leur transcription peut se faire dans les deux directions et les longs ARNnc faisant partie de cette classe sont parmi les plus conservés à travers les organismes [129].

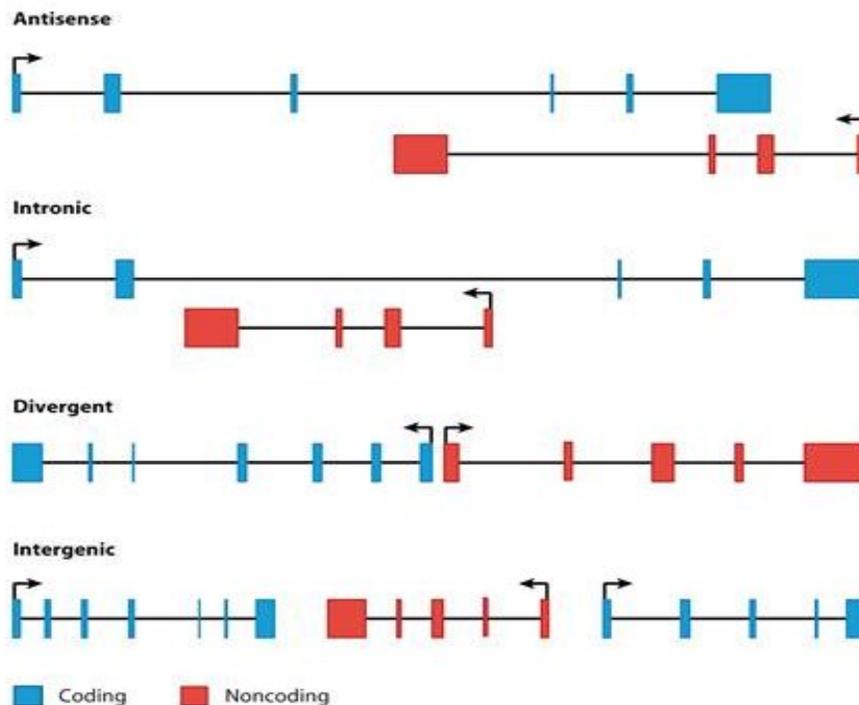


Figure 4 : Classification des longs ARNnc.

La classification des longs ARNnc se fait en fonction de leur localisation dans le génome et selon leur emplacement par rapport à un gène codant. Il existe actuellement 5 classes de longs ARNnc : sens, anti-sens, intronique, divergent et inter-génique. Seule la classe sens n'est pas représentée dans cette figure. Les portions bleues représentent les parties codantes d'un gène et les portions rouges les parties non codantes. Figure tirée de [128] (2012).

Une classification complète permet une meilleure compréhension des différents mécanismes et rôles que peuvent avoir les longs ARNnc. La classification est à la base des compréhensions dans le domaine des longs ARNnc. Malgré l'avancement des connaissances dans ce sens, plusieurs facettes des longs ARNnc restent encore à être plus étudiées. En effet, peu de choses sont connues quant aux différentes fonctions et mécanismes de ces derniers.

1.3.4 Fonctions

Plusieurs rôles essentiels à la biologie de la cellule sont exercés par les longs ARNnc. Le fait que plusieurs d'entre eux possèdent une faible expression comparativement à celle des ARNm, permet de suggérer un rôle de régulation pour les longs ARNnc. De plus, de nombreux longs ARNnc ont une expression différentielle et/ou restreinte à certains compartiments cellulaires et tissus spécifiques [130]. Un nombre considérable d'études convergent vers un rôle de régulation épigénétique ainsi qu'un rôle de régulation des gènes autant au niveau

transcriptionnel que post-transcriptionnel [1, 120, 130, 131]. Cette fonction de régulation est d'une importance primordiale pour la cellule, car celle-ci permet de déterminer la réponse cellulaire selon la nature de divers stimuli internes ou externes et peut être effectuée *via* divers mécanismes. Les longs ARNnc utilisent différents mécanismes pour exercer leur rôle de régulation. Toutefois, plusieurs mécanismes et certaines de leurs subtilités restent encore à être étudiés plus ardemment [118, 132].

Afin d'exercer leur rôle de régulation épigénétique, certains longs ARNnc vont utiliser un mécanisme de guide ou encore de molécule d'échafaudage qui permet la réunion de complexes protéiques n'ayant pourtant aucun domaine d'interaction commun [133, 134]. La plupart de ces longs ARNnc impliqués dans ce type de régulation vont entraîner une répression de la transcription de leurs gènes cibles. Les longs ARNnc principalement connus pour ce type de régulation sont entre autres *Hox transcript antisense RNA (HOTAIR)*, *Antisense noncoding RNA in the INK4 locus (ANRIL)* et *XIST* et leur partenaire protéique le plus commun est *Polycomb repressive complex 2 (PRC2)* [116]. En effet, *HOTAIR* permet la régulation du gène *HOXD* humain en servant soit de guide ou de molécule d'échafaudage pour certains complexes de modifications de la chromatine comme *PRC2* et *lysine-specific demethylase 1A (LSD1)*. Plus précisément, *HOTAIR* exerce son rôle de molécule d'échafaudage en permettant l'interaction entre *PRC2* et *LSD1* réprimant ainsi le gène *HOXD*. Il peut également servir de guide en s'associant à *PRC2* et induire ensuite une délocalisation de cette protéine permettant de réguler l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeurs [135, 136]. Pour ce qui a trait à *ANRIL* et *XIST*, ces derniers servent entre autres à guider *PRC2* vers des gènes cibles comme $p15^{\text{INK4B}}$, un gène suppresseur de tumeur [137, 138].

Un autre mécanisme d'action qui semble être utilisé par certains longs ARNnc est celui d'une interaction directe entre le transcrit d'ARNnc et certains facteurs de transcription, permettant ainsi une régulation génique [118]. Un long ARNnc connu pour utiliser ce genre de mécanisme est *Promoter of CDKN1A antisense DNA damage activated RNA (PANDA)*. Ce dernier est transcrit *via* une voie p53-dépendante et permettrait l'inhibition de certains gènes apoptotiques en se liant directement au facteur de transcription nucléaire Y (NF-YA), qui active la mort cellulaire par apoptose [139]. D'autres longs ARNnc vont être des co-activateurs, par exemple *DLX6 antisense RNA1 (Dlx6as)*, aussi connu sous le nom d'*Eyf-2*. Effectivement, *Eyf-2*

se lie au facteur de transcription DLX2 et cela permet une régulation transcriptionnelle du gène DLX6. Ce long ARNnc permet donc la régulation du gène qui contient son site d'initiation de transcription [119, 140, 141].

Plusieurs mécanismes permettent aux longs ARNnc d'exercer leur rôle de régulation des gènes au niveau post-transcriptionnelle [116, 120]. En effet, certains vont s'associer directement avec un ARNm spécifique, comme c'est le cas pour *Beta-site APP-cleaving enzyme 1 antisense RNA (BACE1-AS)* et *Natriuretic peptide A antisense RNA 1 (NPPA-AS)*, ce qui favorise une diminution de l'accessibilité de l'ARNm cible [142, 143]. D'autres longs ARNnc, au lieu de se lier à l'ARNm, vont s'associer à un micro ARN (miARN) empêchant la liaison de ce dernier à l'ARNm ayant ainsi un impact sur la synthèse protéique. Un exemple d'un tel long ARNnc est *Long noncoding RNA muscle differentiation 1 (Linc-MDI)* qui se lie à deux miARN (mir-133 et mir-135) [144]. Un autre long ARNnc ayant un impact sur la régulation des gènes au niveau post-transcriptionnel est *NEAT2*. Ce dernier sert de molécule d'échafaudage en permettant entre autres l'association de plusieurs protéines sérine-arginines aux granules nucléaires, modulant ainsi l'activité de ces protéines et ayant un impact sur l'épissage alternatif de certains ARN pré-messagers [145].

Un mécanisme particulier n'est pas associé à un seul long ARNnc et ces derniers peuvent exercer leurs rôles *via* plus d'un mécanisme à la fois. *NEAT2* est un exemple d'un tel long ARNnc, car en plus de servir de molécule d'échafaudage, il a la possibilité de se lier directement à certains gènes cibles et permettre une délocalisation, à l'intérieur même du noyau, transportant le gène cible d'un environnement répressif vers un environnement d'activation transcriptionnelle [4]. *NEAT2* sera discuté plus en détails à la section 4.

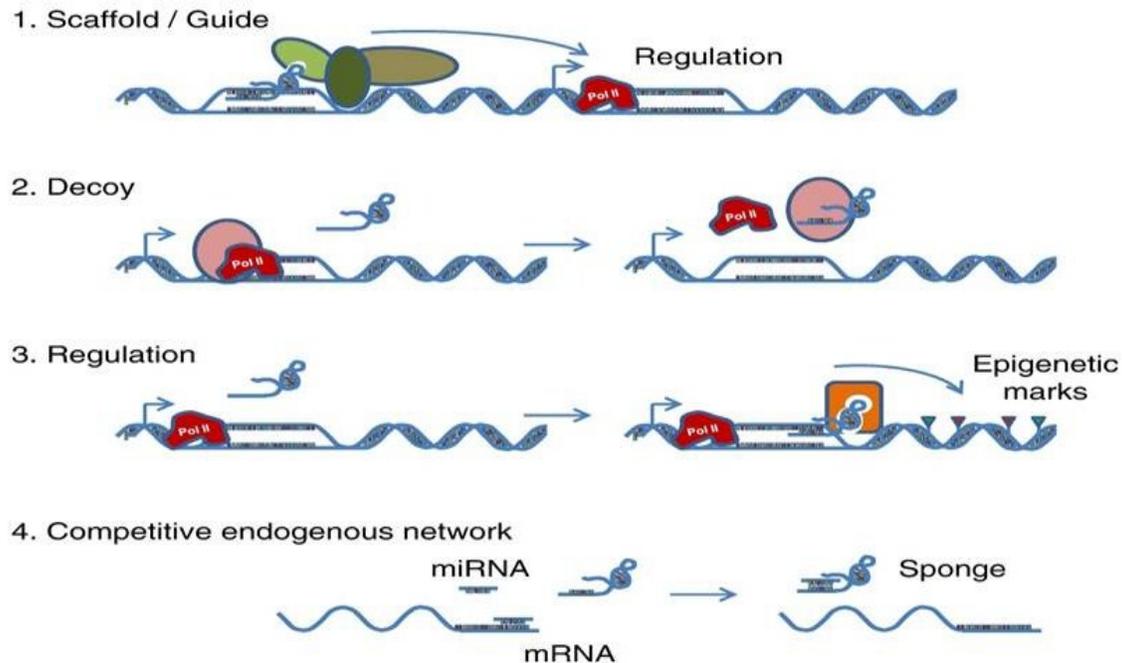


Figure 5 : Les mécanismes d’actions des longs ARNnc.

Démonstration de certains mécanismes par lesquels les longs ARNnc peuvent exercer leur fonction. 1- Mécanisme de molécule d’échafaudage et de guide. 2- Mécanisme d’interaction directe avec certains facteurs de transcription. 3- Mécanisme d’interaction avec des complexes de modifications des histones. 4- Mécanisme de liaison avec des miARN. Figure adaptée de [146] (2013).

Malgré le fait que plusieurs mécanismes d’action de certains longs ARNnc restent encore à être déterminés ou encore approfondis, l’impact de ces derniers sur l’expression des gènes est non-négligeable. La dérégulation d’expression des longs ARNnc amène une perturbation au niveau cellulaire et peut entraîner plusieurs conséquences extrêmement néfastes comme entre autres l’apparition de plusieurs maladies [147].

1.3.5 Implications des longs ARNnc dans diverses maladies liées au vieillissement

Le vieillissement chez l’humain est malheureusement associé à plusieurs maladies comme la maladie d’Alzheimer, la maladie de Parkinson, l’athérosclérose, l’hypertension, le cancer et plusieurs autres maladies dégénératives [7]. Actuellement, les mécanismes tentant d’expliquer l’initiation ou encore le développement de la maladie vers une forme plus sévère sont encore peu connus. Diverses études démontrent que la dérégulation d’une grande variété de longs ARNnc est associée à certaines de ces maladies et pourrait même jouer un rôle dans l’initiation ou encore dans la progression [2, 5, 116].

Le système immunitaire peut être affecté à plusieurs niveaux lors du vieillissement, laissant les personnes âgées plus sensibles à diverses infections et maladies [148]. Certains longs ARNnc pourraient avoir un rôle dans le contrôle du système immunitaire inné et adaptatif. En effet, lors d'une réponse immunitaire contre une infection, il a été démontré qu'il existe une expression différentielle d'environ 500 longs ARNnc laissant supposer un rôle potentiel pour ces derniers dans le développement de maladies infectieuses [149]. En ce qui a trait au système immunitaire, il a été démontré que les lymphocytes T exprimant la protéine CD8 à leur surface produisent, de façon dynamique, environ une centaine de longs ARNnc au cours de l'activation et de la différenciation des lymphocytes [150]. L'implication et le rôle exact des longs ARNnc dans le système immunitaire inné et adaptatif restent à être plus spécifiquement étudiés.

La prévalence des risques d'hypertension et de certaines maladies vasculaires chez les personnes âgées est bien connue [151]. Les longs ARNnc pourraient également avoir une implication dans la régulation de l'hypertension. Le dérèglement de la pression sanguine est associé à certains gènes cible comme *NPPA*, *Adducin 3 (ADD3)* et *ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, alpha 1 polypeptide (ATP1A1)*. Certains de ces gènes cibles sont eux-mêmes associés à des longs transcrits d'ARN anti-sens présent sur le brin opposé [142]. Comme mentionné précédemment, *NPPA-AS* a la possibilité de se lier à l'ARNm, mais plus spécifiquement à l'ARNm de *NPPA*. Cette association vient perturber les niveaux d'ARNm de ce gène permettant ainsi d'établir un rôle potentiel pour le long ARNnc anti-sens dans l'hypertension et certaines maladies cardiovasculaires [2, 142].

La maladie d'Alzheimer est la forme la plus commune de démence et entraîne un déclin entre autres de la capacité à se remémorer, à parler et à penser. Les causes exactes de l'apparition de cette maladie sont encore méconnues même si plusieurs facteurs de risques y ont été associés, dont l'âge [152]. Cette maladie neurodégénérative implique également la dérégulation d'un long ARNnc connu, *BACE1-AS*. La caractérisation de cette maladie est l'accumulation, au niveau cérébral, de plaques d'amyloïde- β . Cette protéine est clivée de façon anormale dans la maladie entre autres par une protéine appelée *Amyloid precursor protein (APP)*. *BACE1* quant à lui encode la protéine *APP* et est donc relié à une étape cruciale du développement de la maladie d'Alzheimer [153]. L'implication de *BACE1-AS* est due à son association directe avec l'ARNm de *BACE1*. En fait, chez les patients atteints de cette maladie ainsi que dans les modèles de

souris, une augmentation de l'expression de ce long ARNnc est remarquée et cela augmenterait la stabilisation de l'ARNm de BACE1 provoquant ainsi une augmentation de plaques d'amyloïde- β [154]. *BACE1-AS* pourrait donc avoir une implication dans l'initiation de la maladie d'Alzheimer et pourrait ainsi être utilisé comme cible thérapeutique ou encore comme biomarqueur [155].

Une forte corrélation est observée entre l'initiation et/ou le développement de différents types de cancer et la dérégulation de longs ARNnc. À ce jour, plus d'une douzaine de longs ARNnc connus présentent une altération de leur expression en lien avec le cancer [128, 156]. *HOTAIR* est un exemple d'un tel long ARNnc étant surexprimé dans certains types de cancers (foie, sein, pancréas) [116]. Comme mentionné précédemment, *HOTAIR* permet entre autres une délocalisation de PRC2 favorisant une inactivation de certains gènes suppresseurs de tumeurs favorisant ainsi le développement de métastases. En fait, l'induction de sa sous-expression, *via* différentes méthodes, est associée entre autres à une diminution de la prolifération et à une altération de la progression dans le cycle cellulaire dans le cancer pancréatique et du foie [157, 158]. La surexpression de *HOTAIR* est liée à la progression du cancer ainsi qu'une augmentation des risques de récurrence suite à une hépatectomie [158]. Un long ARNnc découvert dû à sa surexpression dans le cancer du poumon métastatique est *NEAT2* [159]. Ce dernier semble être associé à une augmentation de la prolifération et pourrait aider au phénomène d'acquisition du potentiel d'invasion et de produire des métastases [160]. *NEAT2* sera plus spécifiquement abordé dans la section 4. Un autre long ARNnc dont la dérégulation est associée au cancer est *ANRIL*. Comme ce dernier s'associe entre autres à PRC2 et PRC1, il permet une répression épigénétique du gène *Cyclin-dependant kinase inhibitor 2A* (*CDKN2A*), aussi connu sous le nom d'*INK4 α* , un gène suppresseur de tumeur. Cette répression induit une augmentation de la prolifération ainsi qu'une inhibition de la sénescence cellulaire [161]. Le dérèglement de l'expression d'*ANRIL* a été remarqué et associé au développement de divers types de cancer, comme certains types de mélanomes en plus de son implication dans certaines maladies cardiovasculaires [128]. Certains longs ARNnc sont exprimés de façon tissu spécifique comme *Prostate cancer associated transcript 1* (*PCAT-1*). Comme son nom le suggère, *PCAT-1* est exprimé seulement dans la prostate et l'augmentation de son expression est associée à ce type de cancer précis [162]. Les études reliées à ce long ARNnc ont démontré qu'il possède le potentiel d'augmenter le taux de prolifération des cellules cancéreuses et qu'il pourrait être utilisé comme un marqueur d'un risque élevé d'incidence de ce type de cancer [5, 162].

L'implication spécifique des longs ARNnc dans le vieillissement est encore méconnue. Toutefois, la corrélation entre leur dérégulation et les maladies liées au vieillissement est non-négligeable. Les études actuelles ne permettent pas de déterminer si la dérégulation des longs ARNnc est une cause ou encore une conséquence de ces maladies. L'intensification des recherches permettant une meilleure compréhension des mécanismes d'action de ces longs ARNnc pourrait favoriser une utilisation thérapeutique concrète de ces longs ARNnc dans les maladies liées au vieillissement.

1.4 *NEAT2*

Dans plusieurs types de cancer, dont ceux du poumon, du pancréas, du foie et de la prostate, la surexpression d'un long ARNnc, *NEAT2*, a été observée [163]. Ce dernier comme mentionné précédemment, a été initialement découvert dû à sa surexpression dans le cancer du poumon de type non à petites cellules métastatiques [159]. L'augmentation de son expression est associée à certains types de cancer métastatiques et à la récurrence du cancer [159, 164, 165].

NEAT2 est un ARNnc long de 7 kilobases (kb) chez la souris (environ 9 kb chez l'humain), est présent sur le chromosome 11 et 19 chez l'humain et la souris respectivement, et fait partie de la classe des longs ARNnc inter-géniques [122, 166]. Ce dernier est exprimé de façon ubiquitaire autant dans les cellules humaines que dans les tissus de souris. Il est également hautement conservé, particulièrement chez les mammifères et ne possède aucun cadre de lecture ouvert permettant de produire des protéines [167]. Il est connu pour être localisé au noyau, plus précisément dans les granules nucléaires, tout comme son long ARNnc adjacent, *NEAT1*. Toutefois, contrairement à *Neat1*, *NEAT2* n'est pas une composante essentielle aux granules nucléaires, car sa sous-expression n'affecte ni l'expression ni la localisation de certains marqueurs spécifiques des granules nucléaires [168]. Une caractéristique de *NEAT2* est qu'il subit des modifications post-transcriptionnelles : suite à sa transcription complète, un premier clivage survient ainsi qu'une polyadénylation du fragment complet de *NEAT2* qui est faiblement exprimé dans les cellules. Parallèlement à ce premier clivage, un second clivage exécuté par la RNase P est effectué. Un des deux produits de clivage, d'une longueur de 6.7 kb chez la souris, ne subit aucune autre modification et est retenu au noyau, spécifiquement dans les granules nucléaires. Ce segment est délesté du segment terminal de *NEAT2* et est fortement exprimé

(Δ mascRNA). Le second produit subit un deuxième clivage, cette fois par la RNase Z, ainsi qu'une addition de trois nucléotides, soit CCA. Ce dernier produit, long de 61 nt, possède une forme ressemblant à un ARN de transfert et est exporté vers le cytoplasme. Ce fragment a été nommé *Malat1 small cytoplasmic RNA* (mascRNA) [169].

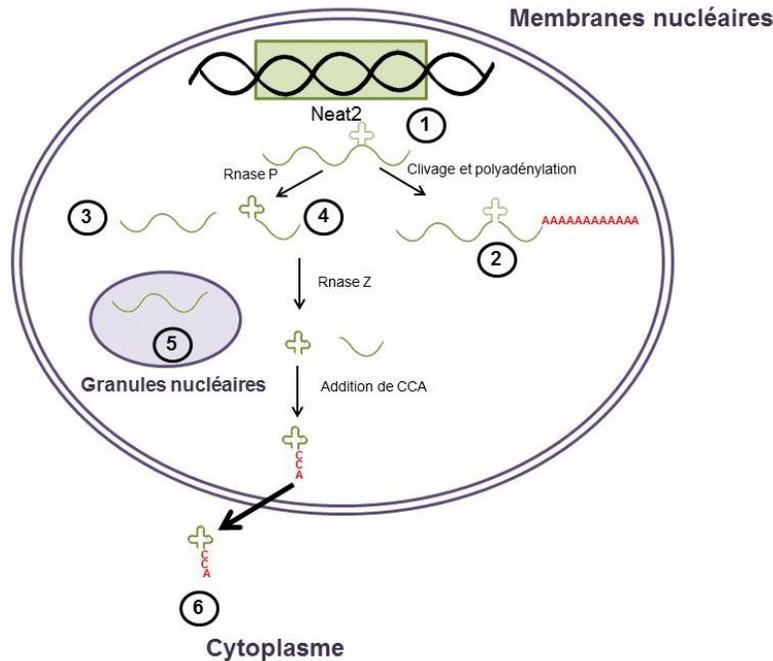


Figure 6 : Modifications post-transcriptionnelles de NEAT2.

Suite à la transcription du gène *NEAT2* (1), un premier clivage survient et une polyadénylation de ce segment *NEAT2* s'effectue. Le segment complet de *NEAT2* (2) est exprimé faiblement dans le noyau. Parallèlement au premier clivage, un clivage fait par l'enzyme RNase P donne deux produits (3 et 4). Le produit 3 ne subit aucune autre modification et est délesté du segment terminal de *NEAT2*. Ce segment 3, Δ mascRNA, est exprimé fortement et spécifiquement dans les granules nucléaires (5). Le segment 4 subit d'autres modifications, clivage par la RNase Z et addition de nucléotides pour finalement être exporté vers le cytoplasme (6). Ce segment en forme d'ARN de transfert d'une longueur de 61 pb se nomme mascRNA.

Les granules nucléaires sont associées à l'expression de protéines sérines arginines, facteurs d'épissage impliqués dans l'épissage alternatif des ARN pré-messager, et certains ARN pré-messager y sont également localisés [170, 171]. Il a été démontré que le segment de *NEAT2* localisé à cet endroit est associé à certains facteurs d'épissage riche en sérine-arginines, SRSF1, SRSF2 et SRP20. Il permet la localisation aux granules nucléaires de ces protéines et affecte la phosphorylation de ces facteurs, et donc leurs activités, ayant des conséquences sur l'épissage alternatif des ARN pré-messager ciblés par ces derniers [172]. Il a été démontré également que *NEAT2* pourrait avoir un rôle dans la délocalisation, à l'intérieur même du noyau, de certains

gènes liés à la croissance cellulaire. En effet, *NEAT2*, en se liant à la protéine polycomb 2 (Pc2) non méthylée, permet le transport de gènes cibles d'un environnement répressif à un environnement d'activation transcriptionnelle [173]. L'implication de *NEAT2* au niveau de l'épissage alternatif et de la délocalisation génique sont les deux seules fonctions actuellement connues de ce long ARNnc [4].

NEAT2 a été étudié également dans différents contextes cellulaires, et ce, en lien avec différents types de cancer. La diminution de son expression dans des cellules cancéreuses du poumon, par la méthode d'interférence par ARN en utilisant des petits ARN en épingles à cheveux (shRNA), suivi de l'injection de ces cellules dans des souris nues est associée à une diminution de la migration et de la grosseur des tumeurs [174]. Il serait également associé à l'augmentation de la motilité cellulaire en régulant l'expression de gènes reliés à la motilité dans les cellules cancéreuses de poumon [175]. *NEAT2* pourrait être impliqué non seulement dans le développement de la tumeur, mais aussi dans la régulation du phénotype métastatique du cancer du poumon. En effet, il a été démontré qu'en injectant des oligonucléotides anti-sens (ASO), ciblant *NEAT2* dans un modèle murin de xénogreffe, ce dernier permet la prévention de la formation de tumeurs [176]. L'inhibition de son expression a également été associée à une diminution de la prolifération et de l'invasion dans des cellules de cancer du col de l'utérus et une seule étude à ce jour implique le domaine mascRNA dans la prolifération, la migration et l'invasion du cancer colorectal [177, 178]. Jusqu'à aujourd'hui, une seule étude permet d'établir un mécanisme possible de *NEAT2*. Cette étude démontre que *NEAT2* pourrait contrôler la progression dans le cycle cellulaire grâce à la régulation de l'expression d'un facteur de transcription oncogénique, *v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2* (Mybl2) [160]. Plus précisément, il serait important pour la transition de la phase G1 à S ainsi que pour la progression vers la mitose et serait sensible au niveau d'expression de p53.

Même si *NEAT2* ne code pas pour des protéines, il démontre une importance biologique marquée. Sa dérégulation a été remarquée dans plusieurs types de cancer et il pourrait être impliqué dans le développement des cancers dû à son implication dans l'augmentation de la prolifération cellulaire et dans l'acquisition du potentiel d'invasion et de produire des métastases [5, 160]. Son mécanisme d'action dans le processus de la carcinogenèse et les fonctions des séquences dérivées de *NEAT2* restent toutefois encore à être déterminés.

2. Hypothèse

Il se produit au cours du vieillissement un déséquilibre global des systèmes physiologiques causant un facteur de risque élevé pour plusieurs maladies, dont celle du cancer. Le cancer est une maladie génétique pouvant prendre plusieurs années avant d'être diagnostiquée. Le développement de cette maladie est favorisé par l'acquisition de plusieurs caractéristiques essentielles communes à toutes les cellules cancéreuses. De plus, il se produit non seulement une dérégulation de l'expression protéique, mais également de l'expression de longs ARNnc. La dérégulation d'une variété de longs ARNnc a été remarquée dans plusieurs maladies liées au vieillissement et particulièrement dans le cancer. Ces derniers pourraient jouer un rôle dans l'initiation et/ou la progression de ces dernières.

Il est connu que le cancer entraîne une inhibition de la mort cellulaire et une augmentation accrue de la prolifération des cellules cancéreuses. Ces transformations confèrent un avantage sélectif aux cellules cancéreuses comparativement aux cellules saines environnantes. Les cellules cancéreuses peuvent alors proliférer à un rythme anormalement élevé et envahir des endroits naturellement réservés à d'autres cellules [179, 180]. Afin de maintenir ce taux de prolifération soutenu et garantir l'apport d'éléments de constructions essentiels à la production d'une nouvelle cellule, les cellules cancéreuses vont entre autres reprogrammer le métabolisme énergétique du glucose à leur avantage [181].

NEAT2 est connu pour être surexprimé dans différents types de cancer et cela permet de suggérer que sa dérégulation pourrait favoriser le développement du cancer. Il a été démontré également que ce long ARNnc favorise la prolifération cellulaire et le risque de produire des métastases [182]. Les études actuelles ne sont qu'associatives et ne permettent pas d'établir de lien direct de cause à effet. De plus, ces études ne permettent pas la détermination du mécanisme moléculaire de *NEAT2* ainsi que la fonction des séquences dérivées de *NEAT2* au cours de la carcinogénèse.

En se basant sur ces éléments connus, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle *NEAT2* pourrait lier le vieillissement et le risque de développement d'un cancer et cette liaison se ferait en modulant la prolifération *via* un rôle dans le métabolisme énergétique cellulaire. Dans un

contexte de cancer, notre hypothèse voudrait que l'augmentation de l'expression de *NEAT2* entraîne une reprogrammation du métabolisme glucidique, ce qui contribuerait à augmenter l'apport de glucose à l'intérieur des cellules et ainsi favoriser le taux de prolifération cellulaire.

L'étude des mécanismes et du fonctionnement des longs ARNnc est essentielle afin de permettre entre autres une meilleure compréhension dans l'initiation et le développement du cancer. Elle est également essentielle afin d'augmenter le potentiel d'utilisation des longs ARNnc comme cible thérapeutique ou encore comme marqueur biologique pour différents types de cancer afin d'établir de meilleurs diagnostics, pronostiques, et traitements contre le cancer.

3. Objectifs

Différents objectifs ont été établis afin de valider notre hypothèse :

- Effectuer la surexpression et la sous-expression de *NEAT2* dans différents modèles cellulaires par techniques virales.
- Déterminer l'impact de l'expression de *NEAT2*, dont l'expression a été augmentée ou diminuée par techniques virales, sur la prolifération cellulaire, l'apoptose et le métabolisme du glucose.
- Déterminer la séquence dérivée de *NEAT2* importante pour les effets cellulaires observés.

Notre premier objectif était d'effectuer la sur- ou sous-expression de *NEAT2* dans différents modèles cellulaires afin de vérifier l'impact de ce gène et de ses séquences dérivées dans différents contextes cellulaires précisés dans les objectifs subséquents. Pour le volet surexpression, nous avons effectué un clonage de *NEAT2* et de ses différentes séquences dérivées (*NEAT2* complet, Δ mascrRNA et mascrRNA) dans un plasmide viral (pBabe). Ensuite, nous avons procédé à une transfection des différentes constructions de *NEAT2* dans des cellules rénales humaines (293T) afin de faciliter par la suite l'infection de ces mêmes constructions dans une lignée de cellules hépatiques de souris (AML12). Pour le volet sous-expression, nous avons effectué la diminution d'expression de *NEAT2* dans une lignée de cellules hépatiques humaines (HepG2) à l'aide d'ASO ciblant spécifiquement ou non notre gène d'intérêt. Nous avons ensuite vérifié la sur- ou sous-expression de *NEAT2* par PCR quantitative en temps réel. Ces deux modèles cellulaires de sur- ou sous-expression de *NEAT2* ont été utilisés afin d'atteindre tous les différents objectifs de ce projet.

Notre deuxième objectif était de vérifier l'impact de la sur- ou sous-expression de *NEAT2* dans la prolifération cellulaire et l'apoptose. Pour ce faire, nous avons évalué la prolifération cellulaire par immunofluorescence à l'aide de deux marqueurs différents, soit le Ki67 et le PCNA. Nous avons également évalué l'apoptose par la technique TUNEL. De plus, la

quantification de ces différents essais d'immunofluorescence a été effectuée en utilisant un ratio de cellules positives au marqueur par rapport au nombre de cellules totales.

Notre objectif final visait à vérifier l'impact de la sur- ou sous-expression de *NEAT2* sur le métabolisme glucidique. Pour ce faire, nous avons procédé à des essais de captation basale de glucose et mesuré le taux de glucose radioactif capté par les cellules. La normalisation de ces essais a été effectuée par quantification d'ADN.

4. Résultats

NEAT2/ Malat1 promotes cell proliferation through its 61-bp mascRNA domain

par

Marie-Josée Girard, Stéphanie Miard, Louise Boivin et Frédéric Picard

Résumé français

Des études récentes ont révélé que les longs ARNnc sont des régulateurs clés de l'épigénétique et de l'expression génique autant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel et que plusieurs d'entre eux étaient impliqués dans l'initiation et/ou le développement de maladies associées au vieillissement, dont le cancer. Le long ARNnc *NEAT2* est surexprimé dans plusieurs types de cancer et subit des modifications post-transcriptionnelles afin de produire entre autres un segment de 61 pb exporté vers le cytoplasme, mascRNA. Toutefois, son impact au cours de la carcinogenèse reste très peu investigué. Dans la présente étude, nous avons étudié le rôle de *NEAT2* et de ses divers domaines dans la prolifération et le métabolisme glucidique des hépatocytes. Il a été possible d'évaluer que l'expression de *NEAT2* au cours du vieillissement normal et non-cancéreux, du stress oxydatif et de la différenciation est diminuée. Une diminution de la prolifération (14-35%) a été observée dans les fibroblastes embryonnaires de souris invalidées pour le gène *NEAT2* et également dans les cellules HepG2 traitées avec un oligonucléotide anti-sens permettant d'abolir l'expression *NEAT2*. Ensuite, nous avons observé une augmentation de la prolifération (33-35%) dans les cellules AML12 surexprimant *NEAT2* et mascRNA. Le domaine mascRNA a entraîné une augmentation de l'entrée en glucose dans les cellules (3,5 fois). Ces résultats obtenus démontrent l'importance de mascRNA dans la prolifération cellulaire et le métabolisme du glucose induits par *NEAT2*.

***NEAT2/ Malat1* promotes cell proliferation through its 61-bp mascRNA domain**

Marie-Josée Girard, Stéphanie Miard, Louise Boivin & Frédéric Picard¹

Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec,

Faculty of Pharmacy, Laval University, Québec, QC, Canada, G1V 4G5

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed:

Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec

Y3106 Pavillon Marguerite-d'Youville

2725 Chemin Ste-Foy

Québec, QC G1V 4G5

Canada

Phone: 1-418-656-8711 ext 3737

Fax: 1-418-656-4942

Email: Frederic.Picard@criucpq.ulaval.ca

Abbreviated title: *NEAT2* promotes cell proliferation through mascRNA

Keywords: long noncoding RNA, *NEAT2/ Malat1*, cancer, proliferation, glucose metabolism.

Manuscript to be submitted to Cancer Research

ABSTRACT

Recent studies have revealed that long non-coding RNAs (lncRNA) are key regulators of gene expression both at transcriptional and post-transcriptional levels and that many of them are involved in the initiation and/or the development of age-related diseases such as cancer. The lncRNA *NEAT2*, also known as Malat1 in humans, is overexpressed in many types of cancer and is processed to yield a 61-bp domain called mascRNA that is exported to the cytoplasm. However, whether *NEAT2* directly impacts on carcinogenesis remains poorly investigated. Here, we report that *NEAT2* and its mascRNA domain increase hepatocyte proliferation and modulate glucose metabolism. Total *NEAT2* expression is decreased during condition of aging, redox stress and differentiation. Consistently, cellular proliferation was significantly reduced in *NEAT2* knockout mouse embryonic fibroblasts (MEFs) compared to that in wild-type MEFs. In addition, human hepatocytes treated with antisense oligonucleotide (ASO)-*NEAT2* also showed slower proliferating rate. In sharp contrast, we observed in mouse hepatocytes a robust proliferating effect of *NEAT2* and mascRNA, but not of the other domain of *NEAT2*. We further demonstrate that the mascRNA domain promotes an increase in glucose uptake. Our study highlights the significance of *NEAT2* and mascRNA in cellular proliferation and glucose metabolism. These data suggest an important role for mascRNA in the regulation of cellular proliferation in hepatocytes.

INTRODUCTION

Recent genome-wide studies have demonstrated that human and mouse genomes generate many transcripts that lack the capacity to produce functional proteins. These products are named non-coding RNAs (ncRNA) and can be divided into two classes according to their length: transcripts that typically vary from 20 to 200 nucleotides (nt) named small ncRNAs and transcripts ranging from 200 nt to 100 kilobases named long ncRNAs [1]. Previous studies have demonstrated that small ncRNAs are involved in multiple biological processes such as neuronal development and are potential key regulators of some human diseases such as cancer [2, 3]. However, the functions and mechanisms of action of long ncRNAs remain mostly elusive. Thousands of long ncRNAs are produced and expressed among several if not all organisms [4]. Some of these long transcripts seem to be expressed in a cellular compartment- or tissue-specific manner and at substantially lower levels than mRNAs [5]. Although long ncRNAs do not code for proteins, they exert essential roles in cell biology. Indeed, recent studies have proposed long ncRNAs as key regulators of epigenetic and gene expression both at transcriptional and post-transcriptional levels [6-8]. Moreover, other studies have highlighted the involvement of these transcripts in the initiation and/or the development of age-related diseases such as cancer [9-11].

Nuclear enriched abundant transcript 2 (*NEAT2*), also known as metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (Malat1), was originally identified as a long ncRNA whose expression was increased in early-stage non-small cell lung cancers that later metastasized compared with those that did not progress into tumors [12]. *NEAT2* lacks open reading frames of significant length, is highly conserved and is located in the nucleus, specifically in nuclear speckles [13]. In addition, it can undergo post-transcriptional modifications that yield three major segments with different localizations and lengths. The first segment is the full-length

polyadenylated transcript (~7 kb) weakly expressed and retained in the nucleus. The second segment generated is a 61 nt transcript, named Malat1 small cytoplasmic RNA (mascRNA), with a tRNA-like structure that is exported to the cytoplasm. Whereas the remaining segment is a 6,7 kb transcript with a short poly(A) tail-like moiety, highly expressed in nuclear speckles, named Δ mascRNA. [14].

Although *NEAT2* does not code for proteins, recent studies have highlighted its deregulation in various types of cancer [10]. Indeed, *NEAT2* may be implicated in the development of cancer through its effect on cellular proliferation and its involvement to facilitate invasion and metastasis, two important hallmarks of cancer [10, 15, 16]. *NEAT2* might promote proliferation and cell motility by influencing the expression of oncogenic transcription factor e.g. B-MYB or motility-related genes through transcriptional and/or post-transcriptional regulation [15, 17]. Nevertheless, its mechanism during carcinogenesis remains poorly investigated. In the current *in vitro* study, we investigated the role of *NEAT2* and its different domains in hepatocyte proliferation. Our study highlights the significance of mascRNA in cellular proliferation and glucose metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

3T3L1 and 293T (ATCC) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose with 10% FBS supplemented with 4mM and 2mM, respectively, of glutamine. HepG2 (ATCC) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose with 10% FBS supplemented with 2mM of glutamine. AML12 (ATCC) were grown in Dubelcco's modified Eagle's medium

and Ham's F12 medium with 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium, 40 ng/ml dexamethasone and 10% FBS. All cells were grown in a 5% CO₂ environment. For differentiation studies, 3T3L1 cells were differentiated, one day after confluence (D0), in the same medium complemented with 10 µg/ml insulin, 0.25 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine and 1µM dexamethasone. For oxidative stress studies, 20 µM hydrogen peroxide (H₂O₂) was added or not to 3T3L1 cells for 8 days [18]. MEFs were collected and cultured as described previously [19].

Cloning and plasmids a antisense technology

Total length or domains of *NEAT2* were cloned in pBabe vector using the following PCR primers:

Complete *NEAT2* (F 5'-GAGAGAATTCAGAGCAGAGCAGCGTAGAGC-3' and R 5'-GAGACTCGAGGAGGTGTGTCGACTCAGAGG-3'), Δ mascRNA (F 5'-GAGAGAATTCAGAGCAGAGCAGCGTAGAGC-3', R 5'-GAGAGTCGACCAACCCTACTGACGAATCTGC-3') and mascRNA (F 5'-GAGAGAATTCTTTGGCCTTCCCTAGCTTT-3', R 5'-GAGAGTCGACCCCTCCAAGAAAAATGTAATGG-3'). Ligations experiments were performed using TAKARA Bio Inc DNA ligation kit according to the manufacturer's instructions. Constructions were validated by sequencing. The *NEAT2* antisense oligonucleotides (ASO) and target sequences used were published previously [20].

RNA extraction and RT-qPCR

RNA extraction was performed using the acid guanidinium thiocyanate/phenol/chloroform method as previously described [18]. Reverse transcription reactions were performed using the

qScript™ reverse transcriptase (Quanta) and qPCR reactions were performed using the SYBR Green Jumpstart Taq ReadyMix without MgCl₂ (Sigma) as previously described [18].

Proliferation assay

Immunofluorescence was performed using Ki67 (Vector), PCNA (Santa Cruz), and BrdU antibodies (Santa Cruz). Cells were grown for 24h, plated on coverslips and seeded in a 6-well plate with 3x10⁴ cells per well (AML12) and 5x10⁴ cells per well (HepG2). BrdU antibody (mouse 1/1000) was added 5 hours before fixation. Cells were fixed with methanol at -20°C for 10 minutes. Cells treated with BrdU were first denatured with HCl (1.5 N) for 10 min. Then, non-specific binding sites were saturated with PBS-BSA 1% for 1h at room temperature. Cells were then incubated with Ki67 and PCNA antibodies (Ki67 rabbit 1/150, PCNA mouse 1/200) during 2h at room temperature. Cells were washed with 1X PBS and incubated with anti-rabbit or mouse FITC and/or anti-rabbit Texas Red and nuclear stain (Hoechst, Sigma H33258) for 1h at room temperature in a humidified chamber. After incubation, cells were covered with mounting medium (Fluoromount G, Electron Microscopy Sciences). Pictures were acquired using Image-Pro Plus 7,0 software.

Apoptosis assay

TUNEL assays were performed using the ROCHE *in situ* cell death detection kit, according to the manufacturer's instructions. Cells were grown for 24h, plated on coverslips and seeded in a 6-well plate with 3x10⁴ cells per well (AML12) and 5x10⁴ cells per well (HepG2).

Retroviral infections

293T cells were transfected for 48h with pBABE empty vector (control), pBABE-NEAT2, pBABE-ΔmascRNA or pBABE-mascRNA using the Polyplus jetPRIME DNA and siRNA

Transfection reagent kit according to the manufacturer's instructions. 48 hours after, the medium containing retroviruses was collected, filtered, treated by polybrene (1µg/ml) and transferred to AML12 target cells. Infected cells were selected with neomycin (250 µg/ml) for 7 days.

Glucose uptake assay

Glucose transport was measured using the glucose analogue 2-[³H]-2-deoxy-D-glucose (PerkinElmer). Cells were serum-deprived for 5 hours, washed with HEPES buffer pH 7.4 (140 mM NaCl, 20 mM HEPES-Sodium, 5 mM KCl, 2.5 mM MgSO₄ and 1 mM CaCl₂), and incubated with medium added with ³H-2DG for 120 min. Cells were then washed with saline buffer (NaCl 0,9%) and lysed in 50 mM NaOH. Radioactivity measured in lysates was corrected for total DNA quantity in each condition.

Animals

Male C57BL/6 mice of 4, 12, and 24 months old were kindly provided by NIA, USA. Malat1 (*NEAT2*) null mice were produced and obtained in collaboration with Texas Institute for Genomic Medicine using the gene trap insertion method [21]. The gene trapping vector was inserted close to the 3' end of the non-coding transcript. Mice were backcrossed on the C57BL/6J genetic background. Gene knockout was validated by qPCR using these primers: 5'-AGAGCAGAGCAGCGTAGAGC-3', 5'-TAACGGCCGTCAACTTAACC-3', 5'-CCAATAAACCCCTCTTGCAGTTGC-3'. All mice were cared for and handled in conformance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and protocols were approved by our institutional animal care committee.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical differences were analyzed by ANOVA and Fisher's test (ad hoc) when appropriate. A p value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

***NEAT2* expression in aging, redox stress and differentiation**

Although *NEAT2* is known to be overexpressed in several cancer conditions, its levels in other states of the cell cycle are not established. We first measured the expression of *NEAT2* in the liver of young and old healthy mice by qPCR. Interestingly, *NEAT2* levels decreased significantly in an age-dependent manner (Fig. 1A). In line with this, we evaluated the expression of *NEAT2* in 3T3L1 cells during a redox stress that mimics cellular senescence by adding H₂O₂ to growth media [18]. Cells incubated with H₂O₂ showed a significant decrease in *NEAT2* levels compared to those in control cells (Fig. 1B). Next, we evaluated the expression of *NEAT2* upon differentiation using the 3T3L1 model. Differentiated cells showed a significant decrease in *NEAT2* levels compared to undifferentiated cells (Fig. 1C). These data suggest that overexpression of *NEAT2* is specific to conditions in which proliferation is favored.

Impact of *NEAT2* on proliferation

To test whether loss of *NEAT2* reduces cell proliferation, we used mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from wild type (WT) and *NEAT2* knock-out (KO) mice. We observed a significant 14% decrease in proliferation, as assessed by BrdU incorporation, in KO MEFs compared to that in WT MEFs ($p = 0.013$) (Fig. 2A, B).

Similarly, we studied human HepG2 cells treated either with Ctrl-ASO or *NEAT2*-ASO to knockdown *NEAT2* expression (reduction of 35%, $p = 0.017$) (Fig. 3A). Immunofluorescence staining using two different proliferation markers, Ki67 (Fig. 3B) and PCNA (Fig. 3C) showed a significant decrease in cellular proliferation in cells treated with *NEAT2*-ASO compared to that in control cells (30% for Ki67, 20% for PCNA, $p < 0.0001$ and $p = 0.0024$ respectively) (Fig. 3E). These changes were not associated with an effect on apoptosis, as assessed by TUNEL ($p = 0.643$) (Fig. 3D-E). These findings suggest that overexpression of *NEAT2* might be a cause and not only a consequence of cell proliferation.

To test the latter hypothesis, we used murine AML12 hepatocytes, overexpressing *NEAT2*, Δ mascrRNA or mascrRNA, and determined cellular proliferation by Ki67 (Fig. 4A) and PCNA (Fig. 4B) immunofluorescence. We noted a significant increase of proliferation in cells overexpressing *NEAT2* and mascrRNA of 27-33% using Ki67 and 16-20% using PCNA respectively ($p < 0.0001$ and $p = 0.004$) (Fig. 4C). These results demonstrate that the 61-bp mascrRNA triggers the proliferation effect of *NEAT2*.

Impact of *NEAT2* expression on glucose metabolism

Because higher proliferation is linked to enhanced energy utilization [22], we hypothesized that *NEAT2* expression may be implicated in glucose metabolism. To test this, we determined glucose uptake in HepG2 cells with down regulation of *NEAT2* on one hand and in AML12 cells overexpressing *NEAT2*, Δ mascrRNA or mascrRNA. Unexpectedly, no significant change in glucose uptake was observed between ASO-ctrl and ASO-*NEAT2* HepG2 cells ($p = 0.617$) (Fig. 5A), or when *NEAT2* was overexpressed in AML12 cells. In contrast, glucose uptake

was 3.5-fold increased in cells overexpressing mascRNA compared to that in control AML12 cells ($p = 0.001$) (Fig. 5B). These findings show that the 61-bp mascRNA domain promotes glucose entry.

DISCUSSION

It is now recognized that at least 90% of the genome is actively transcribed and that only 2% encodes for protein-coding RNAs, whereas 60-70% is transcribed into ncRNAs [23, 24]. Recent studies have revealed thousands of lncRNAs in cells and aberrant expression of many of these is associated with cancer [8, 25]. In the present study, we examined the involvement of the lncRNA *NEAT2* and its different domains in cell proliferation and glucose metabolism. *NEAT2* is overexpressed in various cancer types including lung, hepatocarcinoma and breast cancer, and is associated with a poor prognostic [10, 26]. Expression of *NEAT2* in various cell lines is associated with enhanced cell proliferation and tumor formation and might control cell cycle through regulation of transcription factors [15, 27, 28]. However, it is not clear how *NEAT2* promotes cell proliferation and through which domains.

In this study, we showed that a significant decrease in proliferation is observed whether *NEAT2* expression is knocked-down or is weakly expressed. On the other hand, we observed a significant increase of proliferation in cells overexpressing *NEAT2* and its mascRNA domain. The overexpression of mascRNA domain also resulted in a significant increase in glucose uptake in cells, suggesting a role in glucose metabolism.

The proliferating effect of *NEAT2* has been reported in others studies [29-31]. However, it is the first study to report the effect of the different domains of *NEAT2* in an overexpressing

context, based on post-transcriptional modifications of *NEAT2*, on cellular proliferation and glucose metabolism in hepatocytes. Xu and al. have demonstrated a similar effect on cellular proliferation with a segment of 1000 nt containing the 61-bp domain in a colorectal carcinoma cells line [32]. This similarity with the present study strongly suggests that the implication of mascRNA in cell proliferation is not tissue-specific.

The exact mechanism of action of *NEAT2* during carcinogenesis remains poorly investigated. Some studies showed that *NEAT2* is implicated in alternative splicing and gene relocation but the exact interacting molecules inducing the cellular effects observed remains unknown [33, 34]. Cellular proliferation is linked to cell cycle and energetic metabolism [35, 36]. Tripathi and al. have studied the implication of *NEAT2* on cell cycle and have showed that *NEAT2* might control cell cycle progression through expression regulation of the oncogenic transcription factor Mybl-2 [15]. In this study, we have showed that whether total *NEAT2* domain is overexpressed or knocked-down, there is no significant change in glucose uptake. However, overexpressing mascRNA domain in hepatocytes showed an impressive glucose uptake. These findings suggest that because of their different cellular localization, *NEAT2* and mascRNA domains might have different mechanisms of action. The impact of *NEAT2* on glucose metabolism might function in the cytoplasm and not in the nucleus.

The possible mechanism of action explaining the cellular effects observed might function through the interaction of specific transcription factors, for total *NEAT2* domain, but through a tissue-specific manner, due to the contradiction between studies [15, 32, 37]. The mascRNA domain might affect protein activity by influencing the amino acids composition due to its tRNA-like structure.

Taken together, these findings suggest that *NEAT2* initiates cellular proliferation through its 61-bp domain, mascRNA. This proliferating effect of *NEAT2* triggered by mascRNA might function through a role in glucose metabolism. The fine tuning of this cytoplasmic domain of *NEAT2* might be essential to control cell proliferation and further studies are needed to define the mechanism of mascRNA in glucose metabolism.

It might be interesting to study the effects of mascRNA expression on specific molecules implicated in glycolysis such as glucose transporters. Also, it might be important to study the synergetic effect of *NEAT2* domains and hormones influencing proliferation, such as insulin, on glucose metabolism. Finally, it might be essential to study the exact impact of *NEAT2* in carcinogenesis with WT mice and KO *NEAT2* mice to determine whether the absence of *NEAT2* reduces cancer development or not.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to F. Picard. F. Picard holds a Senior scholar Award from the Fonds de recherche Québec – Santé. M-J Girard was a recipient of a Msc studentship from the Fonds d'enseignement et de recherche - FER from Laval University/ Faculty of pharmacy.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest with the present work.

REFERENCES

1. Änkö, M.-L. and K.M. Neugebauer, *Long Noncoding RNAs Add Another Layer to Pre-mRNA Splicing Regulation*. *Molecular Cell*, 2010. **39**(6): p. 833-834.
2. Rottiers, V. and A.M. Naar, *MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(4): p. 239-50.
3. Stefani, G. and F.J. Slack, *Small non-coding RNAs in animal development*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(3): p. 219-30.
4. Moran, V.A., R.J. Perera, and A.M. Khalil, *Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(14): p. 6391-400.
5. Kaikkonen, M.U., M.T. Lam, and C.K. Glass, *Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics*. *Cardiovasc Res*, 2011. **90**(3): p. 430-40.
6. Rinn, J.L. and H.Y. Chang, *Genome regulation by long noncoding RNAs*. *Annu Rev Biochem*, 2012. **81**: p. 145-66.
7. Ponting, C.P., P.L. Oliver, and W. Reik, *Evolution and functions of long noncoding RNAs*. *Cell*, 2009. **136**(4): p. 629-41.
8. Wilusz, J.E., H. Sunwoo, and D.L. Spector, *Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world*. *Genes Dev*, 2009. **23**(13): p. 1494-504.
9. Prensner, J.R. and A.M. Chinnaiyan, *The emergence of lncRNAs in cancer biology*. *Cancer Discov*, 2011. **1**(5): p. 391-407.
10. Gutschner, T. and S. Diederichs, *The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view*. *RNA Biol*, 2012. **9**(6): p. 703-19.

11. Harries, L.W., *Long non-coding RNAs and human disease*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(4): p. 902-6.
12. Ji, P., et al., *MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer*. Oncogene, 2003. **22**(39): p. 8031-41.
13. Hutchinson, J.N., et al., *A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 39.
14. Wilusz, J.E., S.M. Freier, and D.L. Spector, *3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA*. Cell, 2008. **135**(5): p. 919-32.
15. Tripathi, V., et al., *Long Noncoding RNA MALAT1 Controls Cell Cycle Progression by Regulating the Expression of Oncogenic Transcription Factor B-MYB*. PLoS Genet, 2013. **9**(3): p. e1003368.
16. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
17. Tano, K., et al., *MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes*. FEBS Lett, 2010. **584**(22): p. 4575-80.
18. Miard, S., et al., *Aging alters PPAR γ in rodent and human adipose tissue by modulating the balance in steroid receptor coactivator-1*. Aging Cell, 2009. **8**(4): p. 449-459.
19. Picard, F., et al., *SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues*. Cell, 2002. **111**(7): p. 931-41.
20. Lin, R., et al., *Control of RNA processing by a large non-coding RNA over-expressed in carcinomas*. FEBS Lett, 2011. **585**(4): p. 671-6.

21. Hansen, G.M., et al., *Large-scale gene trapping in C57BL/6N mouse embryonic stem cells*. Genome Res, 2008. **18**(10): p. 1670-9.
22. Mason, E.F. and J.C. Rathmell, *Cell metabolism: An essential link between cell growth and apoptosis*. BBA - Molecular Cell Research, 2011. **1813**(4): p. 645-654.
23. Gibb, E.A., C.J. Brown, and W.L. Lam, *The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 38.
24. Stefan, W., et al., *Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(11): p. 1383.
25. Huarte, M. and J.L. Rinn, *Large non-coding RNAs: missing links in cancer?* Human molecular genetics, 2010. **19**(R2): p. R152.
26. Schmidt, L.H., et al., *The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(12): p. 1984-92.
27. Ying, L., et al., *Upregulated MALAT-1 contributes to bladder cancer cell migration by inducing epithelial-to-mesenchymal transition*. Mol Biosyst, 2012. **8**(9): p. 2289-2294.
28. Gutschner, T., et al., *The Noncoding RNA MALAT1 Is a Critical Regulator of the Metastasis Phenotype of Lung Cancer Cells*. Cancer Res, 2013. **73**(3): p. 1180-9.
29. Han, Y., et al., *Inducing Cell Proliferation Inhibition, Apoptosis, and Motility Reduction by Silencing Long Noncoding Ribonucleic Acid Metastasis-associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 in Urothelial Carcinoma of the Bladder*. Urology, 2013. **81**(1): p. 209.e1-209.e7.
30. Lai, M.C., et al., *Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation*. Med Oncol, 2011.

31. Guo, F., et al., *Inhibition of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in CaSki human cervical cancer cells suppresses cell proliferation and invasion*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2010. **42**(3): p. 224-9.
32. Xu, C., et al., *MALAT-1: a long non-coding RNA and its important 3' end functional motif in colorectal cancer metastasis*. Int J Oncol, 2011. **39**(1): p. 169-75.
33. Tripathi, V., et al., *The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation*. Mol Cell, 2010. **39**(6): p. 925-38.
34. Yang, L., et al., *ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs*. Cell, 2011. **147**(4): p. 773-88.
35. Alenzi, F.Q., *Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle*. Br J Biomed Sci, 2004. **61**(2): p. 99-102.
36. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
37. Eissmann, M., et al., *Loss of the abundant nuclear non-coding RNA MALAT1 is compatible with life and development*. RNA Biol, 2012. **9**(8).

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Reduction of *NEAT2* in aging, redox stress and differentiation. (A) Expression levels of *NEAT2* in liver of male C57BL/6 mice aged 4-12 and 24 months (n = 14/group). (B) Expression levels of *NEAT2* in fibroblasts before (-) and 24h after (+) addition of H₂O₂ to growth media (n = 4). (C) Expression levels of *NEAT2* fibroblasts before (-) and 24 hours (+) after the induction of differentiation with a hormonal cocktail (n = 4). Bars represent mean ± S.E.M. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Figure 2 Loss of *NEAT2* dampens proliferation (A) BrdU (green) and DAPI (blue) staining in WT and KO MEFs. Magnification used is 20X (n = 1). (B) Quantification of cellular proliferation using proliferation index: BrdU positive cells/ total mouse cell count. Bars represent mean ± S.E.M. * $p < 0.05$.

Figure 3 Effects of *NEAT2* knockdown in proliferation and apoptosis in human hepatocytes. (A) Expression levels of *NEAT2* in HepG2 cells treated either with Ctrl-ASO or *NEAT2*-ASO. (B) Representatives pictures of Ki67⁺ cells (green). The blue stain represents nuclei stained (DAPI). Magnification used is 10X (n = 3). (C) Representatives pictures of PCNA⁺ cells (green). The blue stain represents nuclei stained (DAPI). Magnification used is 10X (n = 3). (D) Representatives pictures of TUNEL⁺ cells (green). The blue stain represents nuclei stained (DAPI). Magnification used is 10X (n = 2). (E) Quantification of proliferation and apoptosis assays using proliferation/ apoptosis index: positive cells/ total mouse cell count. Bars represent mean ± S.E.M. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

Figure 4 61-bp mascRNA mediates the proliferating effect of *NEAT2*. AML12 cells were infected to overexpress pBabe (ctrl), *NEAT2*, Δ mascRNA or mascRNA. (A) Representatives pictures of Ki67⁺ cells (red). The blue stain represents nuclei stained (DAPI). Magnification used is 20X (n = 3). (B) Representatives pictures of PCNA⁺ cells (green). The blue stain represents nuclei stained (DAPI). Magnification used is 20X (n = 2). (C) Quantification of cellular proliferation using proliferation index: Ki67 or PCNA positive cells/ total mouse cell count. Bars represent mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$

Figure 5 Implication of *NEAT2* in glucose metabolism. (A) Basal 2-hour glucose uptake in HepG2 treated either with ASO-ctrl or ASO-*NEAT2* (n = 2). (B) Basal 2-hour glucose uptake in AML12 overexpressing different domains of *NEAT2* (n = 3). Bars represent mean \pm S.E.M. *** $p < 0.001$

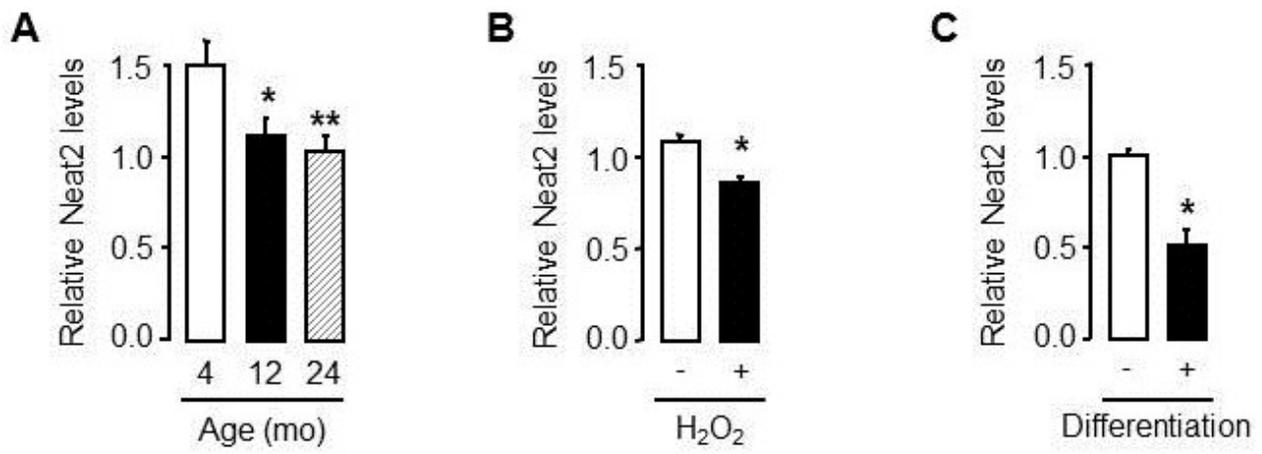


Figure 1

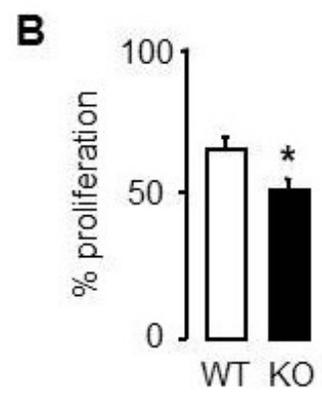
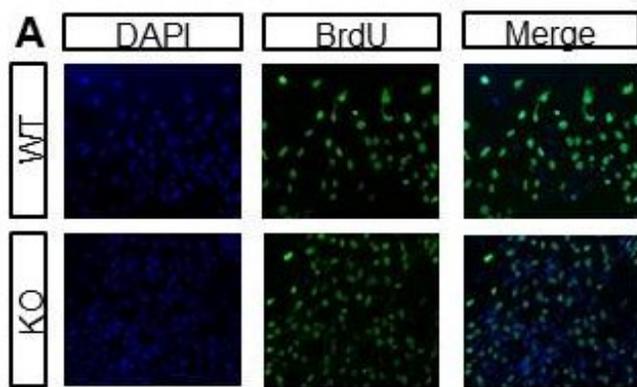


Figure 2

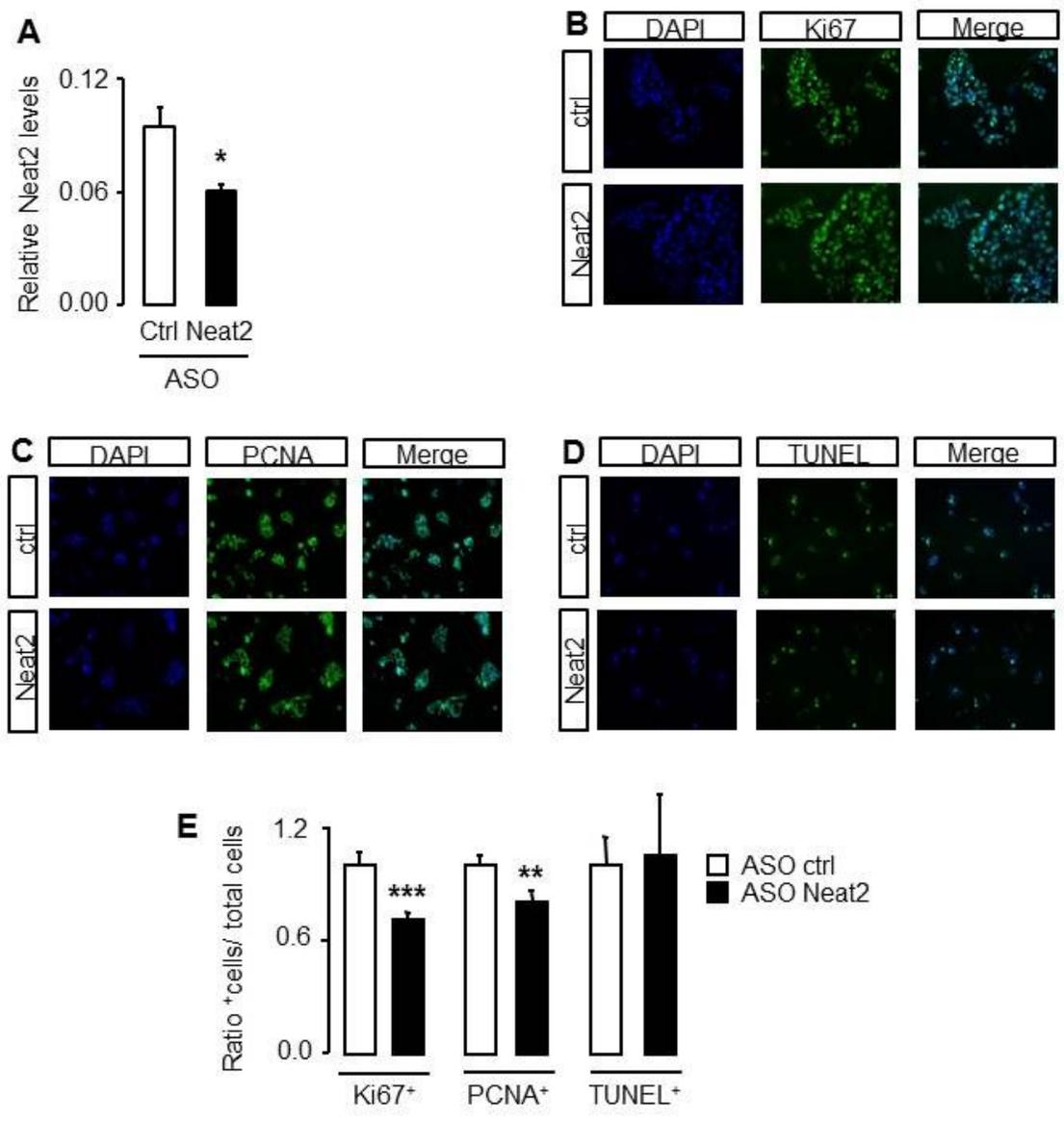


Figure 3

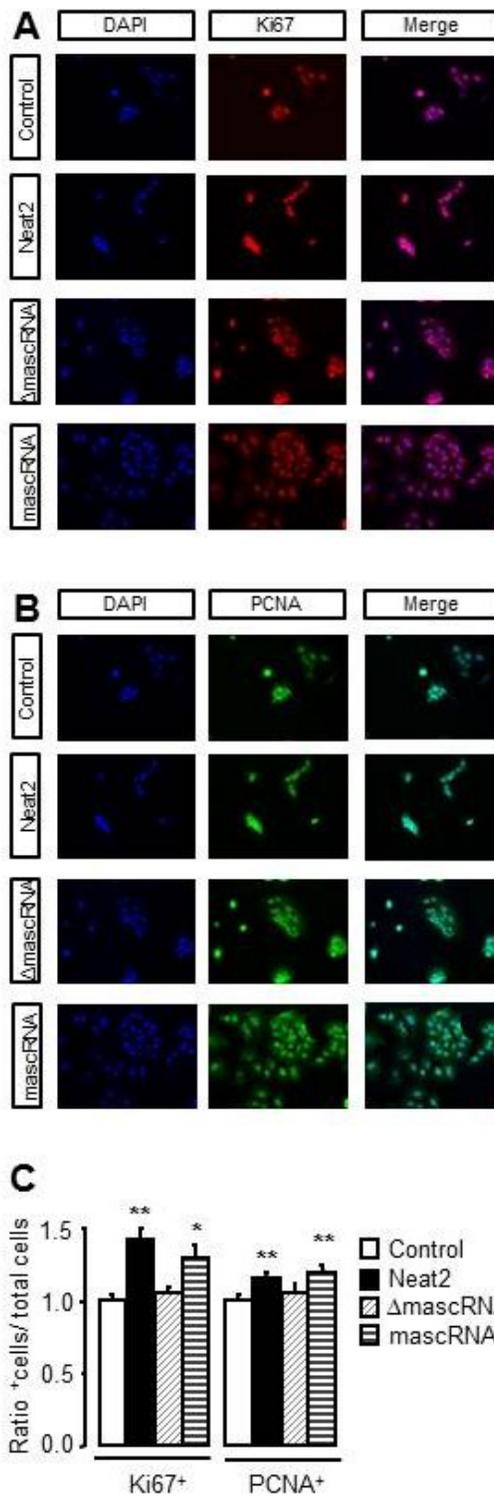


Figure 4

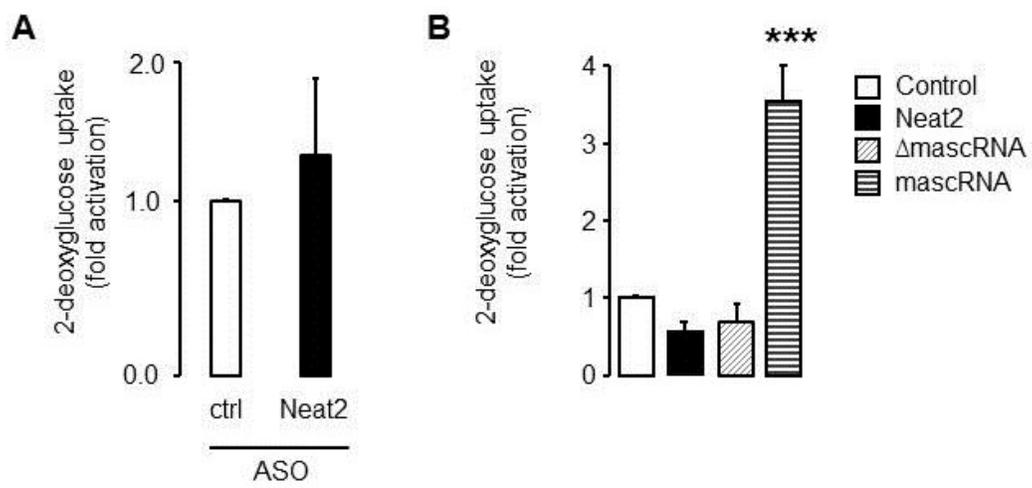


Figure 5

5. Conclusions

Les longs ARNnc sont des éléments clés dans la régulation de l'épigénétique et de l'expression génique autant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel. Les études portant sur la fonctionnalité et les mécanismes d'actions des longs ARNnc sont importantes et fondamentales étant donné que la dérégulation de ces longs transcrits est reliée à diverses maladies associées au vieillissement, dont le cancer [183]. Un long ARNnc dont l'expression est connue pour être dérégulée dans une variété de cancers est *NEAT2*. Ce dernier est un long transcrit nucléaire, hautement conservé chez les mammifères et exprimé de façon ubiquitaire autant dans les cellules humaines que dans les tissus de souris [184]. Sa surexpression a été associée au pouvoir métastatique des cellules cancéreuses, à la prolifération cellulaire et donc reliée à un mauvais pronostic [3]. Il est donc logique de penser que *NEAT2* pourrait avoir un rôle à jouer dans le développement du cancer.

L'évaluation de l'expression de *NEAT2* dans divers contextes cellulaires a montré des résultats intéressants. En effet, la diminution de *NEAT2* est observée au cours du vieillissement, normal et non-cancéreux, dans les foies de souris mâles âgés de 4, 12 et 24 mois. Cette diminution d'expression est également observée lors d'un stress oxydatif, induit par ajout de peroxyde d'hydrogène, dans un modèle cellulaire de fibroblastes de souris 3T3L1 comparativement aux cellules contrôles ainsi qu'au cours de la différenciation par ajout d'un cocktail hormonal à l'aide de ce même modèle cellulaire. Cette diminution de l'expression de *NEAT2* remarquée dans ces différents contextes cellulaires suggère que la surexpression de ce dernier est observée seulement dans des conditions où la prolifération cellulaire est favorisée. *NEAT2* pourrait donc avoir un impact important à ce niveau.

Afin de vérifier l'impact de l'expression de *NEAT2* sur la prolifération cellulaire, nous avons dans un premier temps utilisé des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) de type sauvage (WT) et dont le gène *NEAT2* a été invalidé (KO). Dans un deuxième temps, nous avons utilisé des hépatocytes humains, HepG2, traités avec un ASO provoquant la diminution d'expression de *NEAT2* et un ASO contrôle. Dans ces deux modèles de sous-expression de *NEAT2*, une diminution de la prolifération cellulaire a été observée lorsque l'expression de *NEAT2* était nulle ou très faible. Ces résultats sont d'une grande importance étant donné qu'ils

sont validés autant dans un modèle murin qu'humain. D'autres études ont déjà démontré une absence d'effet ou une diminution de la prolifération lorsque l'expression de *NEAT2* est diminuée [177, 185, 186]. Toutefois, certaines de ces études utilisent des techniques d'interférence à l'ARN comme les shRNA ou des ARN silencieux (siRNA). Les résultats obtenus à l'aide de ces techniques doivent être analysés attentivement, car il est connu que les shRNA et les siRNA peuvent dégrader ou cliver leur ARN cible dans le cytoplasme. Toutefois la localisation de *NEAT2* est nucléaire [187]. En utilisant des ASO, dont le mode d'action se localise dans le noyau, ainsi que des cellules provenant de souris dont le gène *NEAT2* a été invalidé, la validité des résultats est assurée [188]. D'un autre côté, cette même variation d'expression de *NEAT2* dans les HepG2 n'avait aucun effet sur l'apoptose ne suggérant ainsi aucun impact sur ce type de mort cellulaire. Ce résultat est contradictoire avec d'autres études démontrant que l'inhibition de *NEAT2* par la méthode de siRNA augmente l'apoptose dans différentes lignées cellulaires [165, 185]. La différence des conditions expérimentales entre les études pourrait expliquer la divergence des résultats. Cela suggère que l'effet de la variation d'expression de *NEAT2* sur l'apoptose pourrait être spécifique à des conditions bien précises, par exemple selon les niveaux d'expression de p53. Une étude de Tripathi et al. suggère que *NEAT2* pourrait être sensible au niveau de p53 [160]. Dans notre étude, les niveaux de p53 n'ont pas été évalués, mais cela pourrait expliquer la différence entre les divers résultats.

Ensuite, étant donné que la variation d'expression de *NEAT2* semble avoir un fort impact sur la prolifération cellulaire et afin de valider si cet impact est une conséquence ou bien une causalité de la prolifération cellulaire, nous avons surexprimé *NEAT2* et ses différents domaines dans des hépatocytes murins, AML12. L'évaluation de la prolifération à l'aide de deux marqueurs de prolifération différents, le Ki67 et le PCNA, nous a permis d'observer que la prolifération cellulaire était augmentée dans les cellules surexprimant *NEAT2* et mascRNA. Cet effet est remarqué en utilisant les deux marqueurs. Ces résultats permettent d'établir que *NEAT2* est un élément causal de la prolifération et que son effet proliférant pourrait être déclenché par son domaine cytoplasmique, mascRNA. L'effet de *NEAT2* sur l'augmentation de la prolifération avait déjà été remarqué, sans toutefois faire une distinction entre les différents domaines produits à la suite des modifications post-transcriptionnelles de *NEAT2* et sans utiliser une augmentation de l'expression de ces domaines par techniques virales [165]. De plus, aucune étude jusqu'à aujourd'hui n'avait pu démontrer clairement l'implication du domaine cytoplasmique de *NEAT2*

dans la prolifération. Toutefois, l'étude de Xu et al. propose l'implication du domaine 3' de *NEAT2* dans la prolifération cellulaire, la migration ainsi que dans l'invasion. Ils ont procédé en induisant la surexpression de 5 segments différents de *NEAT2* dans une lignée de cellules du colon. Le segment cloné ayant l'effet observé sur la prolifération cellulaire est un segment long de plus de 1000 nt contenant entre autres les 61 pb du domaine mascRNA [178]. Le segment utilisé ne contenant pas spécifiquement le domaine mascRNA, les effets observés pourraient donc être attribués à d'autres portions de *NEAT2*. Toutefois, la similarité des résultats conforte l'importance de mascRNA dans la prolifération. Les résultats obtenus au cours de notre étude sont donc d'une grande importance et permettent une meilleure compréhension du fonctionnement de *NEAT2*.

Afin d'investiguer d'avantage le rôle de *NEAT2* dans la prolifération et en sachant qu'une augmentation de la prolifération cellulaire engendre également une augmentation de la consommation de glucose, nous avons utilisé le modèle de sur- et sous-expression de *NEAT2* dans une étude de captation basale de glucose. En induisant la sous-expression de *NEAT2* dans les HepG2, nous n'avons observé aucun changement dans la captation de glucose comparativement au contrôle. Toutefois, lors de la surexpression des divers domaines de *NEAT2*, nous avons pu observer une augmentation considérable de la captation basale de glucose dans les cellules surexprimant mascRNA. Ces résultats obtenus correspondent en partie à nos attentes. En effet, étant donné que le domaine *NEAT2* et mascRNA ont un effet pro-prolifération, il aurait été attendu d'observer une augmentation de la consommation de glucose dans ces mêmes domaines et une diminution de la captation de glucose dans les cellules sous-exprimant *NEAT2*. Toutefois, autant en surexpression qu'en sous-expression, le domaine *NEAT2* n'a aucun impact sur la captation de glucose suggérant que ce dernier n'a pas de rôle central à jouer dans l'entrée de glucose. D'un autre côté, la surexpression de son domaine cytoplasmique engendre une grande consommation de glucose laissant suggérer que ce dernier pourrait provoquer un changement dans le métabolisme du glucose. À la lumière de ces résultats, il est fort probable que le rôle de *NEAT2* dans le métabolisme glucidique ne se fait pas au niveau nucléaire, mais bien au niveau cytoplasmique *via* le domaine mascRNA. C'est la première fois qu'on rapporte que mascRNA est impliqué dans le métabolisme du glucose.

Cette étude a permis de confirmer le rôle de *NEAT2* dans la prolifération cellulaire. Cet effet proliférant de *NEAT2* est déclenché par son domaine cytoplasmique de 61 pb, mascRNA. De plus, cette augmentation de la prolifération pourrait être en fonction d'un changement dans le métabolisme du glucose provoqué également par mascRNA. Il reste toujours à découvrir la voie exacte par laquelle mascRNA peut agir et favoriser, à l'insu des autres domaines, le métabolisme glucidique et si *NEAT2* n'a pas d'autres effets à différents niveaux pouvant expliquer son impact pro-prolifération.

Il serait intéressant de pousser plus loin les recherches quant au rôle de mascRNA dans le métabolisme du glucose. Des expériences permettant de voir si la variation d'expression de ce domaine n'induit pas également une variation d'expression de certaines protéines impliquées dans l'entrée du glucose comme les transporteurs de glucose, par exemple GLUT2 au niveau des hépatocytes. Il serait possible également d'évaluer l'expression d'autres protéines intermédiaires impliquées dans la glycolyse comme l'hexokinase, la phospho-fructo-kinase, la pyruvate kinase et bien d'autres. Si l'expression de mascRNA fait varier de façon positive des composantes de la glycolyse, il serait intéressant d'entreprendre des expériences afin d'évaluer les mécanismes d'interactions de mascRNA avec la protéine cible. Il serait également d'intérêt d'évaluer la synergie entre l'expression des divers domaines de *NEAT2* et l'ajout d'hormones favorisant la prolifération cellulaire, par exemple l'insuline.

La technologie du *Seahorse bioscience* nous permettrait également d'investiguer d'avantage le métabolisme de la cellule en analysant dans nos modèles cellulaires non seulement la fonction glycolytique des cellules en temps réel, mais également la fonction mitochondriale en évaluant entre autres la consommation d'oxygène, la génération et la consommation d'ATP. Cette technologie permettait d'avoir un portrait global de l'implication de *NEAT2* et de ses divers domaines dans le métabolisme cellulaire. En ayant en main ces résultats, il serait possible de pousser les recherches dans les voies où la variation d'expression de *NEAT2*, ou de l'un des domaines entraîne un changement drastique.

L'augmentation de la prolifération cellulaire, en plus d'induire un changement dans le métabolisme énergétique cellulaire, est également intimement liée au cycle cellulaire [189, 190]. Il serait donc très intéressant de voir l'implication de *NEAT2* dans le cycle cellulaire. Comme mentionné précédemment, l'étude de Tripathi, V. et al. a démontré que *NEAT2* permettait le

contrôle du cycle cellulaire en régulant l'expression d'un facteur de transcription, mybl2, et était sensible au niveau d'expression de p53 [160]. Nous avons observé qu'en surexprimant les différentes constructions de *NEAT2* et en synchronisant les phases, il n'y avait aucun changement significatif entre les différentes phases du cycle cellulaire (résultats non montrés). Ces deux résultats opposés pourraient être expliqués entre autres par l'utilisation de techniques différentes pour analyser le cycle cellulaire. En effet, même si nous avons analysé tous deux le cycle cellulaire en cytométrie de flux, les marqueurs utilisés étaient différents. Nous avons utilisé comme marqueur de cycle cellulaire l'iodure de propidium tandis que l'équipe de Tripathi a utilisé en plus de l'iodure de propidium, le BrdU. Ils ont également fait cette expérience en sous-expression, et non en surexpression, et évalué les niveaux d'expression de *NEAT2* dans chaque phase du cycle cellulaire dans des cellules de l'os et des fibroblastes diploïdes de poumon. Une autre explication à cette divergence de résultats pourrait être que même si l'expression de *NEAT2* est ubiquitaire, son implication au niveau du cycle cellulaire pourrait être tissu-spécifique. Il serait tout de même intéressant de valider l'effet du cycle cellulaire dans notre modèle cellulaire de sous-expression. Afin de donner une idée globale de son implication dans le cycle cellulaire, l'évaluation de l'impact de la variation de l'expression de *NEAT2* sur différents gènes d'intérêts impliqués dans le cycle cellulaire pourrait être effectuée à l'aide d'une analyse *PCR array*. Par la suite, l'interaction directe de *NEAT2* et de ses divers domaines pourrait être évaluée et confirmée par qPCR.

NEAT2, comme mentionné précédemment, est un long ARNnc dont l'expression est hautement conservée chez les mammifères [167]. Cette conservation de séquence, à travers plusieurs espèces, permet de penser que l'expression de *NEAT2* est importante. Son rôle doit donc être confirmé autant chez la souris que chez l'humain. Ayant l'opportunité d'avoir actuellement les souris *NEAT2* KO en hébergement à l'animalerie de l'IUCPQ, il serait important de confirmer tous les effets cellulaires observés dans un modèle *in vivo* en utilisant des hépatocytes de souris ou encore des MEFs. Il serait possible d'effectuer entre autres une évaluation de la captation basale de glucose dans les MEFs. Une étude de la prolifération des hépatocytes primaires de souris à l'aide du BrdU, ou autre marqueur de prolifération pourrait être effectuée. Toutefois, certaines mises au point devraient être effectuées étant donné que l'isolation d'hépatocytes primaires murins est complexe et qu'il n'est pas vraiment possible d'exécuter plusieurs passages avec ce type de cellules.

Afin d'évaluer l'implication *in vivo* de *NEAT2* dans un contexte de cancer, un protocole débuté en septembre 2012 est présentement en cours. L'injection d'un carcinogène induisant le cancer du foie, le diéthylnitrosamine (DEN), a été accomplie chez les souris WT et *NEAT2* KO [191]. Les groupes contrôles ont reçu une injection de saline. Si notre hypothèse s'avère juste, l'absence de *NEAT2* confèrera une résistance au développement du cancer. Actuellement, aucune étude n'a permis de confirmer le rôle de *NEAT2* dans le cancer avec un modèle de souris *NEAT2* KO.

Dans un tout ordre d'idée, *NEAT2* étant localisé au noyau et mascRNA dans le cytoplasme, il est probable que ces deux domaines aient des fonctions et mécanismes différents. Si *NEAT2* subit naturellement des modifications post-transcriptionnelles, c'est que le domaine mascRNA doit avoir une importance biologique. Ayant une forme d'ARN de transfert, des études permettant d'évaluer si ce dernier n'est pas associé à un changement dans la composition d'acides aminés d'une protéine cible seraient une avenue de recherche à considérer. Un échange d'acide aminé pourrait causer un changement dans l'activité protéique et provoquer les effets cellulaires observés. Quant à *NEAT2*, étant localisé au noyau, il pourrait avoir des interactions possibles avec différents facteurs de transcription. D'autres longs ARNnc ayant des fonctions de remodelage de la chromatine, des études évaluant l'effet de *NEAT2* sur la chromatine pourraient être intéressantes à effectuer [192, 193].

Certaines limites sont associées à notre étude. En effet, la majorité de nos expériences se sont effectuées dans des modèles cellulaires. Bien que des lignées cellulaires murines et humaines aient été utilisées, il est important de confirmer les résultats obtenus dans les modèles cellulaires dans un modèle *in vivo*. Ensuite, la longueur extrême des segments, *NEAT2* environ 7 kb et mascRNA 61 pb, ne permet pas de faire le clonage dans n'importe quel vecteur et plusieurs sous-clonage sont requis. En procédant à une infection des différentes constructions dans les cellules, certains effets peuvent être dus non pas à l'expression de notre ARNnc étudié, mais bien à l'effet de l'infection elle-même ou des constructions dans la cellule pouvant engendrer des résultats erronés. De plus, le fait que *NEAT2* ne produit pas de protéine ainsi que la forme de son domaine cytoplasmique rend la validation de la quantification de son expression plus ardue.

Les longs ARNnc démontrent une importance biologique et physiologique marquée et leur implication dans le cancer est non équivoque. Une meilleure compréhension de leur

mécanisme d'action et de régulation, ainsi que de leur fonction exacte dans le cancer permettrait une avancée considérable à plusieurs niveaux. Il serait possible d'utiliser les longs ARNnc autant dans l'optique d'augmenter l'efficacité des traitements contre le cancer que pour améliorer les méthodes de détections de plusieurs types de cancer. Certains longs ARNnc sont déjà utilisés comme moyen de détection [116]. Toutefois, plusieurs longs ARNnc démontrent un potentiel thérapeutique considérable et l'avancée des recherches afin de concrétiser leur utilisation dans le cancer ou toute autre maladie reliée au vieillissement est primordiale. L'impact sur la prolifération cellulaire et le métabolisme glucidique de *NEAT2* via son domaine mascRNA pourrait être des éléments à considérer pour utiliser *NEAT2* comme modulateur de la prolifération ainsi que comme long ARNnc de détection précoce pour certains types de cancer.

Bibliographie

1. Ponting, C.P., P.L. Oliver, and W. Reik, *Evolution and functions of long noncoding RNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 629-41.
2. Harries, L.W., *Long non-coding RNAs and human disease*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(4): p. 902-6.
3. Gibb, E.A., C.J. Brown, and W.L. Lam, *The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 38.
4. Tano, K. and N. Akimitsu, *Long non-coding RNAs in cancer progression*. Front Genet, 2012. **3**: p. 219.
5. Gutschner, T. and S. Diederichs, *The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view*. RNA Biol, 2012. **9**(6): p. 703-19.
6. López-Otín, C., et al., *The Hallmarks of Aging*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-1217.
7. Naylor, R.M., D.J. Baker, and J.M. van Deursen, *Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and age-related diseases*. Clin Pharmacol Ther, 2013. **93**(1): p. 105-16.
8. Tosato, M., et al., *The aging process and potential interventions to extend life expectancy*. Clin Interv Aging, 2007. **2**(3): p. 401-12.
9. Brown, M.K. and N. Naidoo, *The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases*. Frontiers in physiology, 2012. **3**: p. 263.
10. Pinkston, J.M., et al., *Mutations That Increase the Life Span of C. elegans Inhibit Tumor Growth*. Science, 2006. **313**(5789): p. 971-975.
11. Niccoli, T. and L. Partridge, *Ageing as a risk factor for disease*. Curr Biol, 2012. **22**(17): p. R741.
12. Flatt, T. and P.S. Schmidt, *Integrating evolutionary and molecular genetics of aging*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(10): p. 951-62.
13. Saretzki, G. and T. Von Zglinicki, *Replicative aging, telomeres, and oxidative stress*. INCREASING HEALTHY LIFE SPAN: CONVENTIONAL MEASURES AND SLOWING THE INNATE, 2002. **959**: p. 24-29.
14. Campisi, J., et al., *Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease?* Semin Cancer Biol, 2011. **21**(6): p. 354-9.

15. Noda, S., H. Ichikawa, and H. Miyoshi, *Hematopoietic stem cell aging is associated with functional decline and delayed cell cycle progression*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **383**(2): p. 210-215.
16. Xu, D. and H. Tahara, *The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012.
17. Nyberg, K.A., et al., *Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints*. Annual review of genetics, 2002. **36**: p. 617.
18. Sirbu, B.M. and D. Cortez, *DNA Damage Response: Three Levels of DNA Repair Regulation*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013: p. cshperspect.a012724.
19. Moskalev, A.A., et al., *The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria*. Ageing Res Rev, 2013. **12**(2): p. 661-684.
20. Burtner, C.R. and B.K. Kennedy, *Progeria syndromes and ageing: what is the connection?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(8): p. 567-78.
21. Lombard, D.B., et al., *DNA Repair, Genome Stability, and Aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 497-512.
22. Lord, C.J. and A. Ashworth, *The DNA damage response and cancer therapy*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 287-94.
23. Hoeijmakers, J.H.J., *DNA Damage, Aging, and Cancer*. New England Journal of Medicine, 2009. **361**(15): p. 1475-1485.
24. Alt, Frederick W., et al., *Mechanisms of Programmed DNA Lesions and Genomic Instability in the Immune System*. Cell, 2013. **152**(3): p. 417-429.
25. Krokan, H.E. and M. Bjørås, *Base excision repair*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013. **5**(4): p. a012583.
26. Dianov, G.L. and U. Hübscher, *Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel*. Nucleic Acids Research, 2013. **41**(6): p. 3483-3490.
27. Gilchrest, B.A. and V.A. Bohr, *Aging processes, DNA damage, and repair*. FASEB J, 1997. **11**(5): p. 322.
28. Hayflick, L., *The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1965. **37**(3): p. 614-636.
29. Olovnikov, A.M., *Telomeres, telomerase, and aging: Origin of the theory*. Experimental Gerontology, 1996. **31**(4): p. 443-448.

30. Levy, M.Z., et al., *Telomere end-replication problem and cell aging*. J Mol Biol, 1992. **225**(4): p. 951-960.
31. Smekalova, E.M., et al., *Telomerase RNA biosynthesis and processing*. Biochemistry (Mosc), 2012. **77**(10): p. 1120-8.
32. Nandakumar, J. and T.R. Cech, *Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(2): p. 69-82.
33. Blasco, M.A., *Telomere length, stem cells and aging*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(10): p. 640-9.
34. Zhdanova, N.S., J.M. Minina, and N.B. Rubtsov, *Mammalian telomere biology*. MOLECULAR BIOLOGY, 2012. **46**(4): p. 481-495.
35. Fossel, M., *Use of Telomere Length as a Biomarker for Aging and Age-Related Disease*. Current Translational Geriatrics and Experimental Gerontology Reports, 2012. **1**(2): p. 121-127.
36. Jaskelioff, M., et al., *Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice*. Nature, 2011. **469**(7328): p. 102-6.
37. Park, C.B. and N.-g. Larsson, *Mitochondrial DNA mutations in disease and aging*. J Cell Biol, 2011. **193**(5): p. 809-818.
38. Liu, D., et al., *Tissue-specific implications of mitochondrial alterations in aging*. Frontiers in bioscience (Elite edition), 2013. **5**: p. 734.
39. Bratic, A. and N.G. Larsson, *The role of mitochondria in aging*. JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 2013. **123**(3): p. 951-957.
40. George, M.M. and A.L. Lawrence, *Ageing: Mice and mitochondria*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 357.
41. Hekimi, S., J. Lapointe, and Y. Wen, *Taking a "good" look at free radicals in the aging process*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(10): p. 569-576.
42. Liochev, S.I., *Reactive oxygen species and the free radical theory of aging*. Free radical biology & medicine, 2013. **60**: p. 1.
43. Buehler, B.A., *The Free Radical Theory of Aging and Antioxidant Supplements*. Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine, 2012. **17**(3): p. 218-220.
44. Doonan, R., et al., *Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in Caenorhabditis elegans*. Genes Dev, 2008. **22**(23): p. 3236-41.

45. Van Remmen, H., et al., *Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging*. *Physiol Genomics*, 2003. **16**(1): p. 29-37.
46. Ames, B.N., *Endogenous Oxidative DNA Damage, Aging, and Cancer*. *Free Radical Research*, 1989. **7**(3-6): p. 121-128.
47. Shringarpure, R. and K.J.A. Davies, *Protein turnover by the proteasome in aging and disease 1,2 1 This article is part of a series of reviews on "Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease." The full list of papers may be found on the homepage of the journal. Davies and Shringarpure are studying the mechanism by which the proteasome recognizes and degrades oxidatively damaged proteins, and how protein oxidation and proteolysis are affected by aging and disease. 2 Guest Editor: Earl Stadtman*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002. **32**(11): p. 1084-1089.
48. Pollack, M. and C. Leeuwenburgh, *Apoptosis and aging: role of the mitochondria*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2001. **56**(11): p. B475-82.
49. Green, D.R., L. Galluzzi, and G. Kroemer, *Mitochondria and the Autophagy–Inflammation–Cell Death Axis in Organismal Aging*. *Science*, 2011. **333**(6046): p. 1109-1112.
50. Ventura, N., et al., *p53/CEP-1 increases or decreases lifespan, depending on level of mitochondrial bioenergetic stress*. *Aging Cell*, 2009. **8**(4): p. 380-393.
51. Brondello, J.M., et al., *[Cellular senescence and the myth of Janus]*. *Med Sci (Paris)*, 2012. **28**(3): p. 288-96.
52. Itahana, K. and G.P. Dimri, *Cancer and Senescence*, in *International Encyclopedia of Public Health*, H. Editor-in-Chief: Kris, Editor 2008, Academic Press: Oxford. p. 391-395.
53. Djabali, M. and H. Agherbi, *[Cellular ageing, ageing and cancer]*. *Med Sci (Paris)*, 2007. **23 Spec No 3**: p. 19-21.
54. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. **92**(20): p. 9363-9367.
55. Jeyapalan, J.C., et al., *Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates*. *Mech Ageing Dev*, 2007. **128**(1): p. 36-44.
56. Judith, C., *The Role of Cellular Senescence in Skin Aging*. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 1998. **3**(1): p. 1.
57. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular Senescence in Cancer and Aging*. *Cell*, 2007. **130**(2): p. 223-233.

58. Kuilman, T., et al., *The essence of senescence*. GENES & DEVELOPMENT, 2010. **24**(22): p. 2463-2479.
59. Rodier, F. and J. Campisi, *Four faces of cellular senescence*. J Cell Biol, 2011. **192**(4): p. 547-56.
60. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell, 1997. **88**(5): p. 593-602.
61. Krishnamurthy, J., et al., *Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1299-307.
62. Qian, Y. and X. Chen, *Senescence regulation by the p53 protein family*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2013. **965**: p. 37.
63. Sharpless, N.E., *Ink4a/Arf links senescence and aging*. Experimental Gerontology, 2004. **39**(11-12): p. 1751-1759.
64. Alfonzo-Gonzalez, G., et al., *Greater than predicted decrease in resting energy expenditure with age: cross-sectional and longitudinal evidence*. Eur J Clin Nutr, 2006. **60**(1): p. 18-24.
65. Elmadfa, I. and A.L. Meyer, *Body composition, changing physiological functions and nutrient requirements of the elderly*. Ann Nutr Metab, 2008. **52 Suppl 1**: p. 2-5.
66. Terret, C. and F. Solari, *L'homéostasie métabolique au cœur du vieillissement*. Med Sci (Paris), 2012. **28**(3): p. 311-315.
67. Johnson, T.E., *Increased life-span of age-1 mutants in Caenorhabditis elegans and lower Gompertz rate of aging*. Science, 1990. **249**(4971): p. 908-12.
68. Kenyon, C., et al., *A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type*. Nature, 1993. **366**(6454): p. 461-4.
69. Garofalo, R.S., *Genetic analysis of insulin signaling in Drosophila*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(4): p. 156-62.
70. Bluher, M., B.B. Kahn, and C.R. Kahn, *Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue*. Science, 2003. **299**(5606): p. 572-4.
71. Carter, C.S., M.M. Ramsey, and W.E. Sonntag, *A critical analysis of the role of growth hormone and IGF-1 in aging and lifespan*. Trends in Genetics, 2002. **18**(6): p. 295-301.
72. Zoncu, R., A. Efeyan, and D.M. Sabatini, *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(1): p. 21-35.

73. Yang, Z. and X.f. Ming, *mTOR signalling: the molecular interface connecting metabolic stress, aging and cardiovascular diseases*. Obesity Reviews, 2012. **13**: p. 58-68.
74. Johnson, S.C., P.S. Rabinovitch, and M. Kaeberlein, *mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease*. Nature, 2013. **493**(7432): p. 338-45.
75. Lamming, D.W., et al., *Rapalogs and mTOR inhibitors as anti-aging therapeutics*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 980-989.
76. Krtolica, A. and J. Campisi, *Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(11): p. 1401-1414.
77. cancer, C.c.d.l.S.c.d., *Statistiques canadiennes sur le cancer 2013*, 2013: Toronto (Ontario).
78. Dimri, G.P., *What has senescence got to do with cancer?* Cancer Cell, 2005. **7**(6): p. 505-12.
79. Berenblum, I. and P. Shubik, *A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin*. Br J Cancer, 1947. **1**(4): p. 383-91.
80. Lowe, S.W., E. Cepero, and G. Evan, *Intrinsic tumour suppression*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 307-15.
81. Evan, G.I. and K.H. Vousden, *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 342-8.
82. Alenzi, F.Q., *Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle*. Br J Biomed Sci, 2004. **61**(2): p. 99-102.
83. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
84. Hickman, E.S., M.C. Moroni, and K. Helin, *The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer*. Current Opinion in Genetics & Development, 2002. **12**(1): p. 60-66.
85. Gabriele, B. and E.B. Laura, *Angiogenesis: Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(6): p. 401.
86. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
87. Pardee, A.B., *G1 events and regulation of cell proliferation*. Science (New York, N.Y.), 1989. **246**(4930): p. 603.
88. Bruce Alberts, D.B., Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter *Essential cell biology*. third ed2010, New York and London: Garland Science and Taylor and Francis Group. 860.

89. Weinberg, R.A., *Biology of Cancer* 2007, New-York. 796.
90. Sherr, C.J., *Cancer Cell Cycles*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1672-1677.
91. Hunter, T., *Signaling—2000 and Beyond*. Cell, 2000. **100**(1): p. 113-127.
92. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(5): p. 341-54.
93. Peter, B.-j. and H. Tony, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355.
94. Harbour, J.W. and D.C. Dean, *The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms*. Genes Dev, 2000. **14**(19): p. 2393-409.
95. Ivanchuk, S.M. and J.T. Rutka, *The cell cycle: accelerators, brakes, and checkpoints*. Neurosurgery, 2004. **54**(3): p. 692-9; discussion 699-700.
96. Bos, J.L., *ras Oncogenes in Human Cancer: A Review*. Cancer Research, 1989. **49**(17): p. 4682-4689.
97. Frame, M.C., *Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2002. **1602**(2): p. 114-130.
98. Fidler, I.J. and M.L. Kripke, *Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor*. Science (New York, N.Y.), 1977. **197**(4306): p. 893.
99. Lodish, B., Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell, *Biologie moléculaire de la cellule*. 3 ed. Molecular cell biology, ed. B.D. Boeck 2005. 973.
100. Sporn, M.B., *The war on cancer*. Lancet, 1996. **347**(9012): p. 1377-81.
101. Gout, S. and J. Huot, *Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer*. Cancer Microenviron, 2008. **1**(1): p. 69-83.
102. Johnson, J., *Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease*. Cancer and Metastasis Reviews, 1991. **10**(1): p. 11-22.
103. Christofori, G. and H. Semb, *The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene*. Trends in Biochemical Sciences, 1999. **24**(2): p. 73-76.
104. Kornelia, P. and A.W. Robert, *Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits*. Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(4): p. 265.
105. van't Veer, L.J., S. Paik, and D.F. Hayes, *Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker*. J Clin Oncol, 2005. **23**(8): p. 1631-5.

106. Robert, J., [*Biology of cancer metastasis*]. Bull Cancer, 2013. **100**(4): p. 333-42.
107. Khamis, Z.I., K.A. Iczkowski, and Q.-X.A. Sang, *Metastasis suppressors in human benign prostate, intraepithelial neoplasia, and invasive cancer: their prospects as therapeutic agents*. Med Res Rev, 2012. **32**(5): p. 1026-1077.
108. Ward, Patrick S. and Craig B. Thompson, *Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 297-308.
109. Munoz-Pinedo, C., N. El Mjiyad, and J.E. Ricci, *Cancer metabolism: current perspectives and future directions*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e248.
110. Metallo, Christian M. and Matthew G. Vander Heiden, *Understanding Metabolic Regulation and Its Influence on Cell Physiology*. Molecular Cell, 2013. **49**(3): p. 388-398.
111. Warburg, O., *On the Origin of Cancer Cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-314.
112. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
113. Robert, A.G. and J.G. Robert, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(11): p. 891.
114. DeBerardinis, R.J., et al., *The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 11-20.
115. Finley, L.W., et al., *SnapShot: cancer metabolism pathways*. Cell Metab, 2013. **17**(3): p. 466-466 e2.
116. Prensner, J.R. and A.M. Chinnaiyan, *The emergence of lncRNAs in cancer biology*. Cancer Discov, 2011. **1**(5): p. 391-407.
117. Yan, B. and Z. Wang, *Long noncoding RNA: its physiological and pathological roles*. DNA Cell Biol, 2012. **31 Suppl 1**: p. S34-41.
118. Moran, V.A., R.J. Perera, and A.M. Khalil, *Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(14): p. 6391-400.
119. Mercer, T.R., M.E. Dinger, and J.S. Mattick, *Long non-coding RNAs: insights into functions*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(3): p. 155-9.
120. Yoon, J.H., K. Abdelmohsen, and M. Gorospe, *Posttranscriptional Gene Regulation by Long Noncoding RNA*. J Mol Biol, 2012.

121. Marques, A.C. and C.P. Ponting, *Catalogues of mammalian long noncoding RNAs: modest conservation and incompleteness*. Genome Biol, 2009. **10**(11): p. R124.
122. Kung, J.T., D. Colognori, and J.T. Lee, *Long noncoding RNAs: past, present, and future*. Genetics, 2013. **193**(3): p. 651-69.
123. Brannan, C.I., et al., *The product of the H19 gene may function as an RNA*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(1): p. 28-36.
124. Brockdorff, N., et al., *The product of the mouse XIST gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus*. Cell, 1992. **71**(3): p. 515-526.
125. Brown, C.J., et al., *The human XIST gene: Analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus*. Cell, 1992. **71**(3): p. 527-542.
126. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
127. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(1): p. 57-63.
128. Rinn, J.L. and H.Y. Chang, *Genome regulation by long noncoding RNAs*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 145-66.
129. Guttman, M., et al., *Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals*. Nature, 2009. **458**(7235): p. 223-7.
130. Kaikkonen, M.U., M.T. Lam, and C.K. Glass, *Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics*. Cardiovasc Res, 2011. **90**(3): p. 430-40.
131. Wilusz, J.E., H. Sunwoo, and D.L. Spector, *Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world*. Genes Dev, 2009. **23**(13): p. 1494-504.
132. Wang, K.C. and H.Y. Chang, *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 904-14.
133. Mattick, J.S., et al., *RNA regulation of epigenetic processes*. Bioessays, 2009. **31**: p. 51-59.
134. Khalil, A.M. and J.L. Rinn, *RNA-protein interactions in human health and disease*. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2011. **22**(4): p. 359-365.
135. Rinn, J.L., et al., *Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1311-1323.

136. Gupta, R.A., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 1071-6.
137. Kotake, Y., et al., *Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene*. Oncogene, 2011. **30**(16): p. 1956-62.
138. Zhao, J., et al., *Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome*. Science, 2008. **322**(5902): p. 750-756.
139. Hung, T., et al., *Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters*. Nat Genet, 2011. **43**(7): p. 621-9.
140. Feng, J., et al., *The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator*. Genes Dev, 2006. **20**(11): p. 1470-84.
141. Bond, A.M., et al., *Balanced gene regulation by an embryonic brain ncRNA is critical for adult hippocampal GABA circuitry*. Nat Neurosci, 2009. **12**(8): p. 1020-7.
142. Annilo, T., K. Kepp, and M. Laan, *Natural antisense transcript of natriuretic peptide precursor A (NPPA): structural organization and modulation of NPPA expression*. BMC Mol Biol, 2009. **10**: p. 81.
143. Faghihi, M.A. and C. Wahlestedt, *Regulatory roles of natural antisense transcripts*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(9): p. 637-43.
144. Cesana, M., et al., *A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA*. Cell, 2011. **147**(2): p. 358-69.
145. Änkö, M.-L. and K.M. Neugebauer, *Long Noncoding RNAs Add Another Layer to Pre-mRNA Splicing Regulation*. Molecular Cell, 2010. **39**(6): p. 833-834.
146. Ounzain, S., S. Crippa, and T. Pedrazzini, *Small and long non-coding RNAs in cardiac homeostasis and regeneration*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2013. **1833**(4): p. 923-933.
147. Manel, E., *Non-coding RNAs in human disease*. Nature Reviews Genetics, 2011. **12**(12): p. 861.
148. Montecino-Rodriguez, E., B. Berent-Maoz, and K. Dorshkind, *Causes, consequences, and reversal of immune system aging*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 958-65.
149. Peng, X., et al., *Unique Signatures of Long Noncoding RNA Expression in Response to Virus Infection and Altered Innate Immune Signaling*. mBio, 2010. **1**(5).

150. Pang, K.C., et al., *Genome-Wide Identification of Long Noncoding RNAs in CD8+ T Cells*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(12): p. 7738-7748.
151. Barbagallo, M., et al., *Diabetes mellitus, hypertension and ageing: the ionic hypothesis of ageing and cardiovascular-metabolic diseases*. Diabetes Metab, 1997. **23**(4): p. 281-94.
152. Morton Warner, S.F., Marcus Longley and Brian Lawlor, *Alzheimer's Disease: Policy and practice across Europe*2002: Radcliffe Publisher. 200.
153. Sathya, M., et al., *BACE1 in Alzheimer's disease*. Clinica Chimica Acta, 2012. **414**(0): p. 171-178.
154. Faghihi, M.A., et al., *Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase*. Nat Med, 2008. **14**(7): p. 723-30.
155. Modarresi, F., et al., *Knockdown of BACE1-AS Nonprotein-Coding Transcript Modulates Beta-Amyloid-Related Hippocampal Neurogenesis*. Int J Alzheimers Dis, 2011. **2011**: p. 929042.
156. Qiu, M.-T., et al., *Long noncoding RNA: an emerging paradigm of cancer research*. Tumor Biology, 2013. **34**(2): p. 613-620.
157. Kim, K., et al., *HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer*. Oncogene, 2013. **32**(13): p. 1616-25.
158. Geng, Y.J., et al., *Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression*. J Int Med Res, 2011. **39**(6): p. 2119-28.
159. Ji, P., et al., *MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer*. Oncogene, 2003. **22**(39): p. 8031-41.
160. Tripathi, V., et al., *Long Noncoding RNA MALAT1 Controls Cell Cycle Progression by Regulating the Expression of Oncogenic Transcription Factor B-MYB*. PLoS Genet, 2013. **9**(3): p. e1003368.
161. Aguilo, F., M.-M. Zhou, and M.J. Walsh, *Long Noncoding RNA, Polycomb, and the Ghosts Haunting INK4b-ARF-INK4a Expression*. Cancer Research, 2011. **71**(16): p. 5365-5369.
162. Prensner, J.R., et al., *Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(8): p. 742-9.
163. Lin, R., et al., *A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas*. Oncogene, 2007. **26**(6): p. 851-8.

164. Gibb, E.A., et al., *Human Cancer Long Non-Coding RNA Transcriptomes (Cancer lncRNA Transcriptomes)*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25915.
165. Lai, M.C., et al., *Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation*. Med Oncol, 2011.
166. Ip, J.Y. and S. Nakagawa, *Long non-coding RNAs in nuclear bodies*. Dev Growth Differ, 2011.
167. Hutchinson, J.N., et al., *A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 39.
168. Clemson, C.M., et al., *An Architectural Role for a Nuclear Noncoding RNA: NEAT1 RNA Is Essential for the Structure of Paraspeckles*. Molecular Cell, 2009. **33**(6): p. 717-726.
169. Wilusz, J.E., S.M. Freier, and D.L. Spector, *3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA*. Cell, 2008. **135**(5): p. 919-32.
170. Hall, L.L., et al., *Molecular anatomy of a speckle*. Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2006. **288**: p. 664-675.
171. Angus, I.L. and L.S. David, *Nuclear speckles: a model for nuclear organelles*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003. **4**(8): p. 605.
172. Tripathi, V., et al., *The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation*. Mol Cell, 2010. **39**(6): p. 925-38.
173. Yang, L., et al., *ncRNA- and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs*. Cell, 2011. **147**(4): p. 773-88.
174. Schmidt, L.H., et al., *The long noncoding MALAT-1 RNA indicates a poor prognosis in non-small cell lung cancer and induces migration and tumor growth*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(12): p. 1984-92.
175. Tano, K., et al., *MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes*. FEBS Lett, 2010. **584**(22): p. 4575-80.
176. Gutschner, T., et al., *The Noncoding RNA MALAT1 Is a Critical Regulator of the Metastasis Phenotype of Lung Cancer Cells*. Cancer Res, 2013. **73**(3): p. 1180-9.
177. Guo, F., et al., *Inhibition of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in CaSki human cervical cancer cells suppresses cell proliferation and invasion*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2010. **42**(3): p. 224-9.

178. Xu, C., et al., *MALAT-1: a long non-coding RNA and its important 3' end functional motif in colorectal cancer metastasis*. *Int J Oncol*, 2011. **39**(1): p. 169-75.
179. Kelloff, G.J. and C.C. Sigman, *Cancer biomarkers: selecting the right drug for the right patient*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(3): p. 201-14.
180. Gillies, R.J., I. Robey, and R.A. Gatenby, *Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers*. *J Nucl Med*, 2008. **49 Suppl 2**: p. 24S-42S.
181. Fritz, V. and L. Fajas, *Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells*. *Oncogene*, 2010. **29**(31): p. 4369-77.
182. An, S. and J.J. Song, *The coded functions of noncoding RNAs for gene regulation*. *Mol Cells*, 2011. **31**(6): p. 491-6.
183. Huarte, M. and J.L. Rinn, *Large non-coding RNAs: missing links in cancer?* *Human molecular genetics*, 2010. **19**(R2): p. R152.
184. Bernard, D., et al., *A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression*. *EMBO J*, 2010. **29**(18): p. 3082-93.
185. Han, Y., et al., *Inducing Cell Proliferation Inhibition, Apoptosis, and Motility Reduction by Silencing Long Noncoding Ribonucleic Acid Metastasis-associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 in Urothelial Carcinoma of the Bladder*. *Urology*, 2013. **81**(1): p. 209.e1-209.e7.
186. Eissmann, M., et al., *Loss of the abundant nuclear non-coding RNA MALAT1 is compatible with life and development*. *RNA Biol*, 2012. **9**(8).
187. Achenbach, T.V., B. Brunner, and K. Heermeier, *Oligonucleotide-based knockdown technologies: antisense versus RNA interference*. *Chembiochem*, 2003. **4**(10): p. 928-35.
188. Dias, N. and C.A. Stein, *Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms*. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**(5): p. 347-55.
189. Mendelsohn, J., et al., *The molecular basis of cancer*. third ed2008, Philadelphia: Saunders Elsevier. 757.
190. Urruticoechea, A., I.E. Smith, and M. Dowsett, *Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(28): p. 7212-20.
191. Leenders, M.W., M.W. Nijkamp, and I.H. Borel Rinkes, *Mouse models in liver cancer research: a review of current literature*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(45): p. 6915-23.
192. Kogo, R., et al., *Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers*. *Cancer Research*, 2011. **71**(20): p. 6320.

193. Yap, K.L., et al., *Molecular Interplay of the Noncoding RNA ANRIL and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb CBX7 in Transcriptional Silencing of INK4a*. *Molecular Cell*, 2010. **38**(5): p. 662-674.