



CARACTÉRISATION DU MODE DE RÉGULATION DU RÉCEPTEUR 2B DE LA SÉROTONINE (HTR2B) DANS LE MÉLANOME UVÉAL

Mémoire

Manel Benhassine

Maitrise en biologie cellulaire et moléculaire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Manel Benhassine, 2017

**CARACTÉRISATION DU MODE DE RÉGULATION DU
RÉCEPTEUR 2B DE LA SÉROTONINE (HTR2B) DANS
LE MÉLANOME UVÉAL**

Mémoire

Manel Benhassine

Sylvain Guérin, directeur de recherche

Résumé

Le mélanome uvéal (MU) est la principale forme de cancer intraoculaire possédant la capacité d'engendrer des métastases au foie et aux poumons des patients atteints, cette maladie est incurable et fatale dans les 8 mois suivant le dépistage des métastases. Grâce à des analyses en profilage génique sur biopuces à ADN, une signature moléculaire de 12 gènes dérégulés permettant de subdiviser les MU en deux classes: à faible (classe 1) ou haut (classe 2) risque d'évoluer vers le stade métastatique a pu être identifiée. Parmi les 4 gènes de la classe 2, la surexpression du gène codant le récepteur 2B de la sérotonine (HTR2B) est l'indice le plus fiable menant à l'identification des patients à risque d'évoluer vers la maladie métastatique. Cette étude a pour but de caractériser le promoteur de ce gène et les mécanismes moléculaires menant à sa surexpression aberrante dans les lignées métastatiques de MU. Différents segments du promoteur du gène HTR2B ont été clonés dans le plasmide pCATbasic, puis introduits par transfection dans les lignées cellulaires MU. Des analyses d'interférence de méthylation au diméthylsulfate (DMS) et de retard sur gel de polyacrylamide (EMSA) ont été réalisées afin de démontrer la liaison de facteurs de transcription (FTs) au promoteur HTR2B. La transfection des délétants HTR2B/CAT a permis d'identifier des régions régulatrices positives et négatives en amont du promoteur HTR2B. Les analyses EMSA et d'interférence de méthylation au DMS nous ont permis de démontrer la liaison des FTs NFI et RUNX1 au promoteur du gène HTR2B. Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la surexpression du gène HTR2B et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient permettre le dépistage des patients à risque d'évoluer vers la maladie métastatique.

Abstract

Uveal melanoma (UM) is the most common type of primary intraocular tumor in the adult population. UM will propagate to the liver as the first metastatic site. Once this organ is invaded, survival becomes a matter of months for the patient as no treatment has proven to be effective. Among the candidates from the class II gene signature, the serotonin receptor-encoding gene (HTR2B) appears to be the most discriminating as its expression strongly increases in the tumors that will progress toward liver metastases. Our study aims at characterizing the molecular mechanisms that lead to this aberrant expression of HTR2B in metastatic UM cell lines. Expression of HTR2B was monitored by microarrays in a variety of UM cell lines. Various segments from the promoter and 5'-flanking sequence of the HTR2B gene were cloned upstream the CAT gene in the plasmid pCATbasic. The genomic areas of interest were 5'-end-labeled and used as probes in electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). DMS methylation interference footprinting was also used to precisely position the DNA target sites for transcription factors (TFs) that bind the HTR2B regulatory regions. Transfection analyses revealed that the upstream regulatory regions of HTR2B promoter is made up of a combination of alternative positive and negative regulatory elements. Repressive regions also bear a high number of target sites for the TF NFI. EMSA analyses provided evidence that multiple NFI isoforms can interact with the promoter of the HTR2B gene. In addition, the TF RUNX1 was shown by DMS methylation interference footprinting to bind a target site from the HTR2B distal silencer element. This project will help understand better the molecular mechanisms accounting for the abnormal expression of HTR2B in uveal melanoma. In the long term, this study will allow us to identify new potential targets that could help screening patients at high risk of evolving toward the liver metastatic disease.

Table des matières

RESUME	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABREVIATIONS	IX
REMERCIEMENTS	XI
AVANT PROPOS	XII
1. CHAPITRE 1	1
1.1 INTRODUCTION	1
1.1.1 ANATOMIE DU GLOBE OCULAIRE HUMAIN	1
1.1.2 LA CHOROÏDE	3
1.1.3 LES MELANOCYTES CHOROÏDIENS	5
1.2 LE MELANOME UVEAL	7
1.2.1 ÉTIOLOGIE	8
1.2.2 FACTEURS PRONOSTICS	10
1.2.3 LA DISSEMINATION METASTATIQUE	15
1.2.4 TRAITEMENTS	20
1.2.4.1 TRAITEMENT DE LA TUMEUR PRIMAIRE INTRAOCULAIRE	20
1.2.4.2 TRAITEMENT DES METASTASES SECONDAIRES	21
1.3. LES RECEPTEURS SEROTONINERGIQUES	23
1.4. PROBLEMATIQUE, HYPOTHESE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE	25
2. CHAPITRE 2 : TRANSCRIPTION OF THE HUMAN 5-HYDROXYTRYPTAMINE RECEPTOR 2B (HTR2B) GENE IS UNDER THE REGULATORY INFLUENCE OF THE TRANSCRIPTION FACTORS NFI AND RUNX1 IN HUMAN UVEAL MELANOMA	28
ABSTRACT	29
1. INTRODUCTION	30
2. MATERIAL AND METHODS	32
2.1. CELL CULTURE	32
2.2. INDIRECT IMMUNOFLOURESCENCE	32
2.3. PLASMID CONSTRUCTS AND OLIGONUCLEOTIDES	33
2.4. EXPRESSION OF THE HUMAN RECOMBINANT NFI ISOFORMS	34
2.5. TRANSIENT TRANSFECTIONS AND CAT ASSAYS	34
2.6. NUCLEAR EXTRACTS AND EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY-SHIFT ASSAY)	35
2.7 METHYLATION INTERFERENCE FOOTPRINTING	36
2.8. WESTERN BLOTS	36

2.9. GENE EXPRESSION PROFILING	37
2.10. CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION ASSAYS (CHIP)-qPCR	37
2.11. QUANTITATIVE PCR (qRT-PCR)	38
2.12. STATISTICAL ANALYSES	39
3. RESULTS	39
3.1. HTR2B EXPRESSION IN HUMAN UVEAL MELANOMA CELL LINES	39
3.2. HTR2B GENE TRANSCRIPTION IS MODULATED BY BOTH POSITIVE AND NEGATIVE REGULATORY ELEMENTS	46
3.3. MEMBERS FROM THE NFI FAMILY BIND TO THE HTR2B PROMOTER AND POSITIVELY REGULATE ITS TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY IN UVEAL MELANOMA	49
3.4. THE TRANSCRIPTION FACTOR RUNX1 BINDS TO THE HTR2B PROMOTER AND NEGATIVELY REGULATE ITS TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY IN UVEAL MELANOMA	59
3.5. BOTH RUNX1 AND NFI BINDS <i>IN VIVO</i> TO THE HTR2B PROMOTER IN UVEAL MELANOMA	66
4. DISCUSSION	68
5. CONCLUSIONS	73
6. ACKNOWLEDGMENTS	73
7. FUNDING	73
8. REFERENCES	77
3. DISCUSSION	85
3.1. NOS LIGNEES DE MELANOME UVEAL	85
3.1.1. CONTRIBUTION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION NFI	85
3.1.1.1. L'ISOFORME NFIA	87
3.1.1.2. L'ISOFORME NFIB	88
3.1.1.3. L'ISOFORME NFIC	88
3.1.1.4. L'ISOFORME NFIX	89
3.1.2. CONTRIBUTION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION RUNX1	92
3.1.2.1. LA FAMILLE DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION RUNX	93
3.1.2.2. PROFIL D'EXPRESSION DES ISOFORMES RUNX	96
3.1.2.2. INTERACTIONS DES RUNX AVEC LEURS COFACTEURS	96
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	101
BIBLIOGRAPHIE	104

Liste des tableaux

Tableau 1: Récapitulatif des facteurs pronostics du mélanome uvéal_____13

Liste des figures

Figure 1: Anatomie de l'œil humain.	2
Figure 2 : Histologie de la choroïde.	4
Figure 3 : Observation de mélanocytes uvéaux au microscope à contraste de phase.	7
Figure 4 : Localisation de la tumeur primaire intraoculaire.	9
Figure 5: Les différentes morphologies cellulaires du mélanome uvéal.	11
Figure 6: Mutations fréquentes dans les cas de mélanome uvéal.	14
Figure 7: Schématisation du processus métastatique.	16
Figure 8: Traitement de la tumeur intraoculaire par curiethérapie par plaque (brachythérapie).	21
Figure 9: Analyse en profilage génique des niveaux d'expression du gène HTR2B au sein de tumeurs primaires de patients atteints de mélanome uvéal.	25
Figure 10 : Domaines fonctionnels des isoformes NFI.	87
Figure 11 : Les différents isoformes RUNX communiquent avec une multitude de voies signalétiques clé définissant le devenir cellulaire.	93
Figure 12 : Domaines fonctionnels des isoformes RUNX.	94
Figure 13 : Exemples de protéines interagissant avec les membres de la famille de facteurs de transcription RUNX.	99

Liste des abréviations

5-HT : 5-hydroxy tryptamine (sérotonine)
ADN: Acide désoxyribonucléique
AML1 : « Acute myeloid leukemia 1 protein »
AP1 : Activator protein 1
ARN : Acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
BAP1: BRCA1 Associated Protein 1
C-terminal : Extrémité carboxy-terminale
CAM : Cell Adhesion Molecule
CAT: Chloramphénicol Acétyl Transférase
CBF β : Core Binding Factor β
CEBF/ α : E74-like factor 2
CKII : Casein Kinase 2
CREB : C-AMP Response Element-binding protein
CTF : CCAAT box binding transcription factor
DMS : Diméthylsulfate
DNase 1 : Deoxyribonuclease I
E12.5 : Stade embryonnaire 12.5 jours
EIF1AX: Eukaryotic translation Initiation Factor 1A X-linked
EMSA : « Electrophoretic mobility shift assay »
EPR : Épithélium Pigmentaire Rétinien
ETS : E26 transformation-specific
FC(s) : Facteur(s) de croissance(s)
FT(s) : Facteur(s) de transcription(s)
GNA11: Guanine nucleotide-binding protein subunits alpha-11
GNAQ: Guanine nucleotide-binding protein subunits alpha-q
GTPases : Enzymes qui lient et hydrolysent la guanosine triphosphate (GTP)
HDACs: Histones deacetylases
HTR2B: Récepteur 2B de la sérotonine
Ig : Immunoglobuline
IL1: Interleukine 1
IL6: Interleukine 6
JAK/STAT : Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription
KO : Knock Out
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MEC: Matrice extracellulaire
MH1 : Mad Homology 1
MMP: Métalloprotéases matricielles
MU : Mélanome uvéal
N-Terminal : Extrémité amino –terminale
NFI : Nuclear factor I
PEBP2 : Polyomavirus Enhancer Binding Protein 2
PLC : Phospholipase C
PRC1 : Polycomb repressive complex 1
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
Rac1 : Petite protéine G « Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 »
RACE : « Rapid Amplification of cDNA ends »

RD : Runt Domain
RUNX1 : « Runt-related transcription factor 1 »
SF3B1: Splicing Factor 3B Subunit 1
shRNA : « Short hairpin ribonucleic acid »
SMAD : SMA and MAD related protein
SP1 : Specificity Protein 1
TEM: Transition Épithélio-Mésenchymateuse
TIMPs : « Tumor Inhibitor of Metalloproteases »
TLE : Transducin-like enhancer protein
UVs : Ultra-violets

Remerciements

D'abord j'aimerais remercier toute personne qui a contribué d'une façon ou d'une autre à ce que j'accomplisse cette maîtrise, dont les membres du CUO-Recherche. J'ai été chanceuse, une succession de bonnes rencontres m'ont mené là où je suis aujourd'hui : qui aurait pensé qu'une scolarité commencée à plus de 6000km d'ici allait se poursuivre au Canada. Un cursus avec beaucoup d'imprévus, mais de très belles surprises.

Je remercie en premier lieu mon directeur de recherche, Professeur Sylvain Guérin, dont l'encadrement a été excellent à tous les niveaux. Depuis mon recrutement, il a su me motiver et me réorienter à chaque problème rencontré. Il a tout mis en œuvre pour que cette maîtrise se déroule dans les meilleures conditions. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir fait confiance et de m'avoir recruté dans cette équipe, qui est, et de loin, le meilleur laboratoire de recherche que je n'ai jamais eu la chance d'intégrer, j'en garderai des souvenirs inoubliables.

Un très grand merci à Karine Zaniolo, notre professionnelle de recherche, qui tient toujours à nous faire travailler dans le respect et la bonne humeur, des valeurs indispensables! Son aide m'a été très précieuse lors de ce projet. Un sincère merci pour ta gentillesse et ton aide, je n'oublierai jamais les bons moments que j'ai pu passer à vos côtés, et en y repensant, il n'y a eu que de bons moments !

Merci à la banque d'yeux du Centre universitaire d'ophtalmologie pour les tissus indispensables à la réalisation du projet, ainsi qu'aux organismes subventionnaires la Fondation HSS/CHUQ DE QUÉBEC et le CRSNG.

Finalement, ma famille, ma maman chérie qui a toujours été ma source de motivation qui me pousse à aller de plus en plus loin, donc merci mamayti, malgré la distance et le décalage horaire je ne peux passer un jour sans ton soutien et sans entendre ta voix, j'espère te rendre ne serait-ce que 1% de tout ce que tu as pu faire pour moi. Je n'oublie pas mes sœurs Zihar, Kenza, et mon mari Khaled, mon premier soutien ici au Canada, je vous aime très fort.

Avant propos

Ce mémoire regroupe l'ensemble de mes travaux de recherche réalisés au cours de ma maîtrise, qui feront bientôt partie d'un article scientifique (chapitre II) dont le titre est « Transcription of the human 5-Hydroxytryptamine receptor 2B (HTR2B) gene is under the regulatory influence of the transcription factors NFI and RUNX1 in human uveal melanoma ». Cet article est actuellement en fin de rédaction et sera très prochainement soumis au journal « BBA Gene Regulatory Mechanisms ». Il s'agira de mon premier article en tant que première auteure, avec la participation de Karine Zaniolo et de Sylvain L. Guérin.

J'ai participé grandement aux résultats obtenus lors de cette étude en effectuant la majorité des expériences telles que la culture cellulaire et la préparation de la majorité des extraits protéiques pour les analyses de profilage génique, de qPCR, et de retard sur gel. J'ai également réalisé la transfection des cellules en culture par trois approches différentes (Lipofectamine (Invitrogen), Trousse K2 (Biontex), ainsi qu'au *Néon* (Invitrogen)). J'ai aussi réalisé les expériences d'immunobuvardage de type Western, ainsi qu'une partie des analyses en retard sur gel EMSA. J'ai participé à la création des plasmides délétants de HTR2B par digestions enzymatiques, qu'on a pu produire en grande quantité par la suite chez la bactérie avec l'aide du Pr. Sylvain Guérin et de Karine Zaniolo.

Une partie des retards sur gels EMSA ont été réalisés par le Pr. Sylvain Guérin, ainsi que les données obtenues en interférence de méthylation au diméthylsulfate (DMS). Les analyses de profilage génique et de qPCR ont été réalisées par Karine Zaniolo, professionnelle de recherche de l'équipe, ainsi que le montage des figures de cet article. Par ailleurs, j'ai aussi participé à la rédaction du texte de cet article.

1. Chapitre 1

1.1 Introduction

L'évolution de l'espèce humaine lui a conféré cinq sens qui lui permettent d'analyser et d'interagir avec son environnement de manière adéquate. Ainsi, une altération ou une perte de l'un de ces sens peut très vite évoluer vers un handicap majeur, qui aura un impact indéniable sur la qualité de vie de l'individu en question. C'est le cas du mélanome uvéal, un cancer qui affecte la vision, un processus très complexe nécessitant la participation de nombreux acteurs, localisés dans l'œil jusqu'au cerveau, et qui permet de capter la lumière afin d'apercevoir notre environnement.

Le mélanome uvéal est la tumeur primaire intraoculaire la plus retrouvée chez la population adulte (1). Plus de 50% des individus atteints par cette maladie vont développer des métastases au foie et/ou aux poumons (2-4). Une fois ce stade métastatique atteint, la survie des patients n'est alors qu'une question de quelques mois (généralement inférieure à 8 mois) (5, 6) conférant à ce cancer un caractère très agressif. Il est alors primordial de bien comprendre les mécanismes sous-jacents à cette maladie afin de permettre le développement de nouvelles thérapies visant à empêcher la formation de métastases. De plus, ce cancer peut demeurer asymptomatique très longtemps, et aucun traitement curatif n'est efficace une fois que le stade métastatique est atteint. Ainsi, la perte de l'œil affecté peut malheureusement être suivie par la perte de la vie du patient, du fait de cette problématique de diagnostic tardif.

1.1.1 Anatomie du globe oculaire humain

L'œil humain est un organe très perfectionné, il s'agit de l'élément récepteur à la base de notre vision. Il intervient dans les étapes précoces du processus de phototransduction. Chez un adulte sain, le globe oculaire mesure environ 2,5 cm de diamètre et pèse environ 8 grammes, cet organe est relié au cerveau grâce au nerf optique.

Anatomiquement, l'œil humain est constitué de trois tuniques distinctes :

- Une tunique fibreuse : comprenant la sclérotique et la cornée.
- Une tunique uvéale : constituée de l'iris, la choroïde ainsi que le corps ciliaire.
- Une tunique nerveuse : composée de la rétine, soit la partie sensorielle de l'œil.

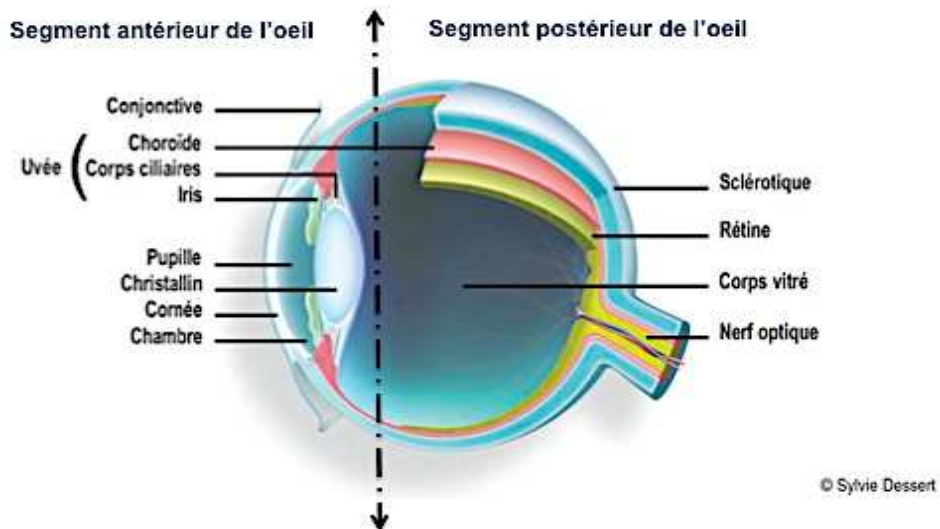


Figure 1: Anatomie de l'œil humain. Image adaptée de (7).

La sclérotique, tunique blanche qui entoure l'œil (en blanc sur la figure 1), est une tunique fibreuse très résistante qui protège des dégâts mécaniques, donne une forme à l'œil, et permet le maintien d'une pression intraoculaire. Sur la partie antérieure de l'œil elle devient transparente et forme la cornée, ce qui rend possible l'entrée des rayons lumineux dans le globe oculaire.

La choroïde (en rouge sur la figure 1), est une structure très richement vascularisée et pigmentée qui se révèle être brunâtre en dissection. Elle se situe entre la sclérotique et la rétine, et constitue la chambre noire de l'œil, puisqu'une partie de ses fonctions consiste à empêcher la propagation de rayons lumineux

épars en profondeur dans l'œil, ce qui augmente la netteté de l'image perçue (8). De plus, elle assure l'apport en nutriments aux structures qui lui sont sous-jacentes (entre-autre la rétine, en vert sur la figure 1).

La rétine, quant à elle, est un tissu très fragile dont le rôle est primordial puisqu'il permet la transformation de l'influx lumineux en influx nerveux. La rétine est la composante sensorielle de l'œil, elle contient les photorécepteurs (cônes et bâtonnets), siège de la phototransduction (9). Cette structure est organisée en deux parties distinctes : l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et la rétine sensorielle.

Ces différentes structures baignent et/ou entourent deux substances sécrétées à l'intérieur de l'œil, principalement composées d'eau, qui permettent le maintien d'une pression intraoculaire adéquate ainsi que la forme caractéristique de l'œil. Il s'agit de l'humeur aqueuse présente dans les chambres antérieure et postérieure de l'œil, ainsi que de l'humeur vitrée ou corps vitré, retrouvé en arrière du cristallin (Figure 1).

1.1.2 La choroïde

La composante anatomique d'intérêt dans ce travail est sans contredit la choroïde. Cette structure est la partie postérieure de l'uvée (10). Il s'agit donc d'une tunique très richement vascularisée localisée entre la sclérotique et la rétine. Elle assure de nombreuses fonctions, dont l'apport en nutriments à la rétine qui lui est sous-jacente, l'élimination des déchets métaboliques de cette dernière, une fonction de chambre noire en empêchant la dispersion aléatoire des rayons lumineux, mais aussi d'autres rôles annexes tels que la thermorégulation de l'œil, la modulation de la pression intraoculaire ainsi que la sécrétion de certains facteurs de croissance (10).

La choroïde chez l'humain est organisée en quatre couches distinctes : la suprachoroïde, la couche des vaisseaux vasculaires (comprenant les couches de Sattler et de Haller), la membrane de Bruch ainsi que la couche de choriocapillaires (Figure 2) (10).

Les cellules endothéliales composant les choriocapillaires comportent des jonctions fenestrées spécialisées qui assurent les échanges en nutriments, oxygène et déchets métaboliques de manière constante avec la partie externe de la rétine.

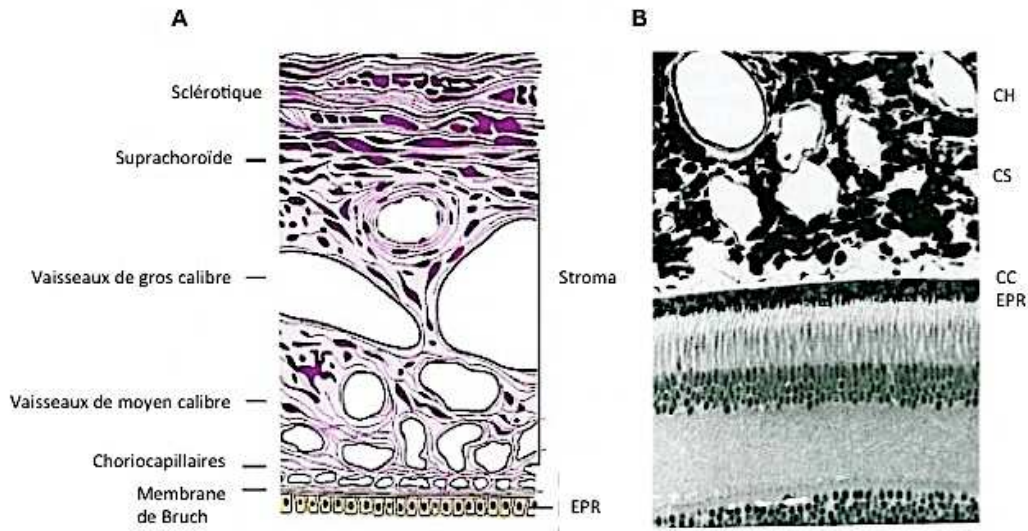


Figure 2 : Histologie de la choroïde. A. Reproduction schématique des couches de la choroïde. B. Coupe histologique de la rétine externe et de la choroïde chez un modèle de primate. CH : Couche de Haller, CS : Couche de Sattler, CC : Couche de choriocapillaires, EPR: Épithélium Pigmentaire Rétinien. Image adaptée de (10).

L'apport sanguin assuré par la choroïde provient de l'artère ophtalmique, qui longe le nerf optique avant de se ramifier à l'intérieur du globe oculaire, assurant ainsi un important apport sanguin vers les différentes structures de l'uvée. À son tour, l'uvée assure à elle seule la quasi totalité de l'apport sanguin de l'œil (à l'exception de la rétine interne qui est nourrie par les vaisseaux centraux de la rétine).

Il importe de souligner que l'œil humain possède une particularité : toutes les structures de l'uvée, à l'exception du corps ciliaire, sont dépourvues de vaisseaux lymphatiques, une observation qui peut expliquer le mode de dissémination caractéristique exclusivement par voie sanguine du mélanome uvéal (c.f. section 1.2).

1.1.3 Les mélanocytes choroïdiens

Dans cette section le terme «mélanocyte» désigne exclusivement les mélanocytes qui dérivent de la crête neurale (une structure embryonnaire transitoire qui se forme à partir de l'ébauche neurale primitive) lors de l'embryogénèse.

Chez l'adulte, ces cellules se retrouvent dans l'épiderme, le bulbe des cheveux, l'oreille interne ainsi que l'œil (11). Les crêtes neurales dérivent de la partie dorsale du tube neural. Elles donnent naissance à toutes les cellules pigmentées de l'organisme, exception faite des cellules de l'épithélium rétinien, qui proviennent quant à elles du neurectoderme (11).

Au niveau oculaire, les mélanocytes uvéaux se trouvent dans le stroma de l'iris, du corps ciliaire, ainsi que la choroïde (il s'agit d'ailleurs du principal type cellulaire composant la choroïde). Ces cellules sont à la base de la production d'un pigment nommé mélanine, qui confère cette propriété de chambre noire à la choroïde. Cette production de mélanine se fait au sein d'un organite cellulaire spécialisé contenu dans le cytoplasme de ces cellules : les mélanosomes (12).

La mélanogénèse désigne les mécanismes de contrôle et de synthèse de la mélanine. Ce phénomène est utilisé comme modèle d'étude de différenciation depuis longtemps car cette différenciation mène à l'apparition d'une cellule pigmentée caractéristique, facilement détectable en histologie (11). Cette synthèse se fait au sein du mélanosome, un organite spécialisé qui assure la biosynthèse de la mélanine, tout en confinant les différents intermédiaires de cette chaîne de biosynthèse. Certains de ces intermédiaires peuvent s'avérer être toxiques pour la cellule (11, 13).

La pigmentation finale visible est en réalité un mélange de deux types de mélanines : la phaéomélanine et l'eumélanine (14), présentes et mélangées dans des proportions variables selon les individus. L'eumélanine est d'une couleur foncée noire ou brune, alors que la phaéomélanine est caractérisée par sa coloration jaune orangée (15).

Malgré une origine embryonnaire commune, les mélanocytes cutanés et choroïdiens présentent néanmoins des différences à plusieurs niveaux. En effet, les mélanocytes cutanés synthétisent en continu de la mélanine qui est transférée aux kératinocytes avoisinants via leurs prolongements dendritiques, ce qui aurait pour rôle d'absorber les rayonnements lumineux qui n'auraient pas été réfléchis par la peau, et de protéger cette dernière des lésions causées par la lumière (16).

À l'inverse, les mélanocytes choroïdiens sont en état de quiescence métabolique et ne synthétisent pas de mélanine *de novo* : la petite taille de leur réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, ainsi qu'un nombre réduit de mitochondries témoignent de cette quiescence métabolique (17).

Contrairement aux mélanocytes cutanés, il ne semble pas y avoir de contacts ni d'échanges fonctionnels entre les mélanocytes choroïdiens et les différents types cellulaires de l'uvée. *In vivo*, les mélanocytes choroïdiens sains ne prolifèrent que très peu et sont statiques. Ainsi, toute prolifération anormale mène à la formation d'un nævus choroïdien (18), une tumeur bénigne qui modifie l'architecture locale du tissu choroïdien, et qui se définit comme une colonisation focale de mélanocytes clonaux (19). La présence de ces nævi pose un réel problème diagnostique, ces lésions bénignes étant retrouvées dans 6,5 % des yeux normaux (5), mais présentent des symptômes parfois très apparentés aux formes malignes de mélanomes, qui peuvent s'avérer être très agressifs et mener éventuellement au décès du patient (c.f. section 1.2). Il est donc particulièrement difficile de prédire clairement si le nævus choroïdien est une lésion précancéreuse ou un facteur de risque à part entière (6).

L'équipe de Gass en 1977 suggérait que les nævi de grande taille (6mm de diamètre ou plus de 2mm d'épaisseur) ont un risque plus accru de dégénérer en lésion cancéreuse (20). L'équipe du Dr. Mims en 1978 a constaté un taux de dégénérescence de 26% pour les nævi suspects (18) sur un suivi d'au moins quatre ans.

L'analyse précise des caractéristiques cliniques et angiographiques des nævi choroïdiens permet de déterminer un groupe de patients à haut risque de dégénérescence.

Ces patients doivent alors bénéficier d'un suivi rapproché voire éventuellement d'un traitement immédiat si celui-ci est possible, sans endommager la vision. Les naevi choroïdiens évoluent rarement en mélanome uvéal, ceci est estimé à 1 cas sur 8845 cas à 80 ans, ce risque augmente avec l'âge (21, 22).

Pour des raisons encore inconnues, les mélanocytes de l'œil peuvent subir une transformation maligne qui va provoquer un changement morphologique menant à la formation du mélanome uvéal, une structure visible au microscope à contraste de phase (Figure 3). Ainsi, les mélanocytes sains, qui présentent une morphologie fusiforme (Figure 3A) adoptent alors une morphologie de type épithélioïde (Figure 3B). Par ailleurs, elles perdent généralement leur pigmentation et se caractérisent également par une prolifération plus rapide.

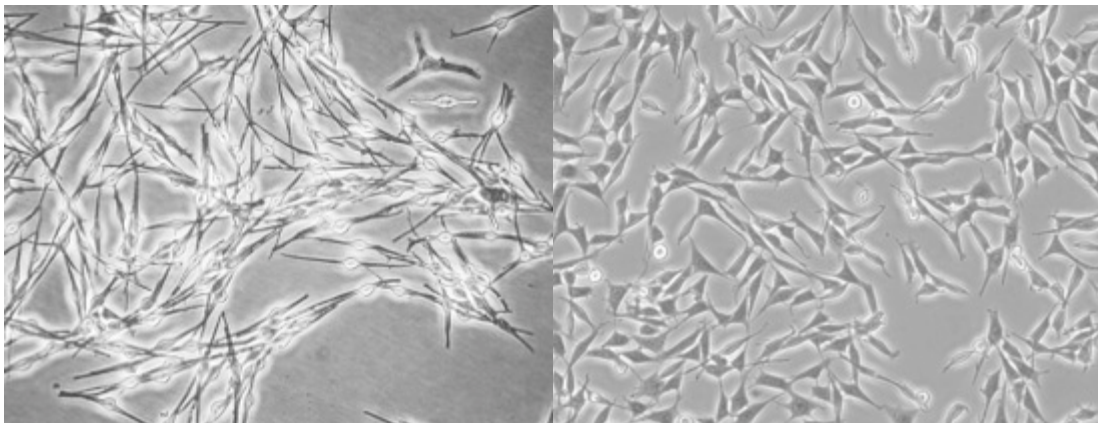


Figure 3 Observation de mélanocytes uvéaux au microscope à contraste de phase. A. Mélanocytes choroïdiens sains. B. Mélanocytes choroïdiens transformés.

1.2 Le mélanome uvéal

Bien que les mélanomes cutanés et uvéaux soient la conséquence de transformations malignes qui surviennent dans des mélanocytes dont les origines embryologiques sont identiques, il s'agit clairement de deux entités carcinologiques totalement distinctes.

Contrairement au mélanome cutané, jusqu'à présent aucune étude n'a pu démontrer une contribution éventuelle des rayonnements ultra-violet (UVs) dans la transformation maligne des mélanocytes choroïdiens (23).

Il arrive que les mélanocytes de l'uvée acquièrent un potentiel tumorigène et envahissent différentes structures de l'œil : nous parlons alors de mélanome uvéal. La moitié des patients atteints par cette maladie vont développer des métastases au foie et/ou aux poumons dans les quinze années suivant le dépistage de la tumeur primaire intraoculaire (1).

Une fois que ce diagnostic de lésions hépatiques est établi, la survie du patient varie de deux à neuf mois (24, 25), il s'agit alors d'une lésion sérieuse et très agressive, bien qu'elle soit relativement rare (5 à 7 cas par million d'habitants aux Etats-Unis (24, 26)).

1.2.1 Étiologie

Pour une raison encore inconnue, il semblerait que les personnes à peau et iris clairs soient plus susceptibles (150 fois plus de probabilité) de développer un mélanome uvéal (27), les individus de peau foncée ou d'origine asiatique étant quasiment exempts de cette condition. La plus grande majorité des individus diagnostiqués sont âgés de 50 à 70 ans. Le diagnostic d'un mélanome uvéal peut prendre plusieurs années lorsqu'il se situe dans une structure profonde qui n'affectera pas immédiatement la vision du patient.

De ce fait, la majorité des cas de mélanome uvéal sont découverts d'une manière fortuite lors d'un examen routinier chez un spécialiste de la vision. De plus, plusieurs études ont démontré que la dissémination des cellules cancéreuses du mélanome uvéal au foie (90% des cas) et aux poumons est déjà complétée bien avant le dépistage de la tumeur primaire intraoculaire ; des micro métastases sont déjà présentes dans ces foyers secondaires, expliquant l'absence de traitement curatif lorsque le stade métastatique est atteint (28, 29).

Le mélanome uvéal peut se déclarer dans les trois structures composant le tractus uvéal avec des probabilités d'apparition et des pronostics distincts :

Le mélanome de l'iris (Figure 4A) compte pour 8% de cas de mélanomes uvéaux. Il s'agit sans contredit de la forme de mélanome ayant le meilleur pronostic dû au fait de sa localisation antérieure qui facilite grandement sa détection lors d'un examen ophtalmologique routinier. Cette forme de mélanome uvéal mène à un taux de mortalité estimé à 8% sur 10 ans (30, 31).

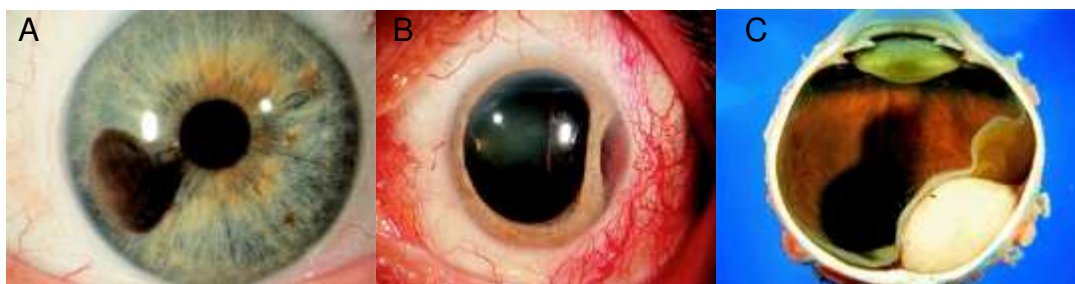


Figure 4 : Localisation de la tumeur primaire intraoculaire. A. Cas de mélanome uvéal de l'iris. B. Cas de mélanome uvéal du corps ciliaire. C. Cas de mélanome uvéal de la choroïde. Images tirées de (32).

Le mélanome du corps ciliaire (Figure 4B) est retrouvé dans 12% des cas de mélanome uvéal. Du fait de l'emplacement du corps ciliaire, cette forme de mélanome est la plus difficile à diagnostiquer. Le mélanome du corps ciliaire peut être identifié lorsque la taille de la tumeur en vient à obstruer le tractus visuel, ou lorsque le patient souffre de troubles de vision dus à un décollement rétinien causé par l'envahissement des structures plus en profondeur de l'œil. Avec 53% de mortalité sur 5 ans, cette forme de mélanome uvéal est aussi associée au pronostic le plus défavorable (31, 33).

Finalement, la forme la plus répandue de mélanome uvéal est indéniablement celle qui touche la choroïde (Figure 4C). Elle représente plus de 80% des cas de mélanomes uvéaux, et son pronostic dépend de nombreux facteurs dont la taille de la tumeur primaire intraoculaire. Globalement, elle est associée à un taux de mortalité d'environ 14% sur 5 ans (31, 33) (c.f. section 1.2.2).

1.2.2 Facteurs pronostics

Les raisons de la transformation néoplasique des mélanocytes demeurent à ce jour vagues. Certains facteurs environnementaux, tels qu'une irradiation aux rayonnements UVs, ne semblent pas avoir d'impact sur l'apparition de ce type de cancer, contrairement au cancer de la peau (23, 34, 35), ce qui suggère une contribution environnementale à priori mineure. De plus, la large majorité des cas de mélanome uvéal sont sporadiques, les formes familiales demeurant très rares (36).

De nombreuses anomalies génétiques sont retrouvées dans les cas de mélanomes uvéaux. En effet, dans 50% des cas, les patients présentent une perte de l'un des deux chromosomes 3 (monosomie du chromosome 3), ainsi qu'un gain sur le bras long du chromosome 8 (8q) (37), ce qui suggère que ces anomalies sont importantes lors de la progression tumorale. De manière un peu moins fréquente, des altérations structurales d'autres chromosomes telles que la délétion du bras court du chromosome 1 (1p), ainsi que du bras court du chromosome 6 (6p), ou parfois même des gains de matériel génétique sur ces mêmes chromosomes, ont été rapportées (38).

Comme c'est le cas dans plusieurs types de cancers, les cellules de mélanome uvéal cumulent d'innombrables anomalies génétiques (39). Il est donc recommandé de procéder à une analyse cytogénétique de la tumeur primaire lorsque l'occasion se présente.

Des analyses histopathologiques nous permettent d'observer trois morphologies distinctes des mélanocytes transformés (épithélioïdes, fusiforme ou mixte), celles-ci étant associées à des pronostics vitaux plus ou moins favorables (27, 31, 40).

Lorsque le profil cellulaire est fusiforme, les cellules sont de forme allongée, et présentent un cytoplasme réduit (Figure 5A). Ce type de morphologie laisse présager généralement un meilleur pronostic vital (27), puisque cette morphologie cellulaire semble permettre une moins bonne migration au foie et donc, à l'origine de moins de métastases (24, 41, 42).

Les mélanocytes qui présentent un profil épithélioïde (Figure 5B), possèdent un cytoplasme plus volumineux ainsi qu'un noyau arrondi et sont associés à un moins bon pronostic puisqu'ils sont retrouvés en majorité dans les tumeurs de plus grande taille (27).

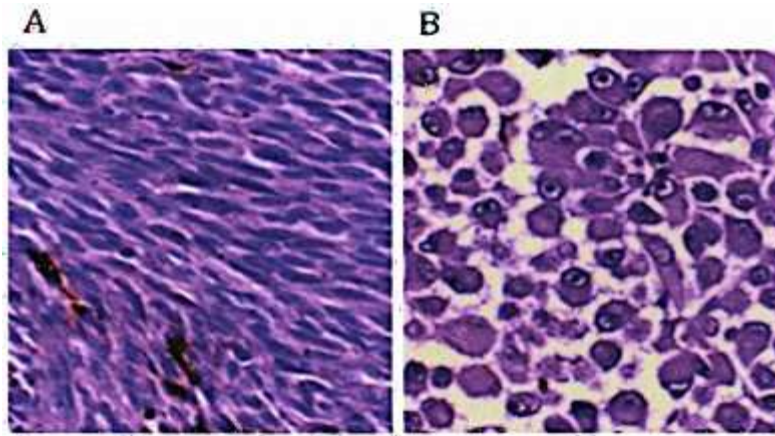


Figure 5: Les différentes morphologies cellulaires du mélanome uvéal. A. Mélanocytes à morphologie fusiforme. B. Mélanocytes à morphologie épithélioïde (27).

Les mélanocytes qui affichent un phénotype mixte sont en réalité un mélange entre les deux précédents phénotypes. Dans ce cas ci, le pronostic vital dépend des proportions auxquels sont présents ces deux phénotypes cellulaires : plus les cellules fusiformes sont abondantes, meilleur sera le pronostic du patient (27).

Il est tout de même important de noter qu'au sein d'une même tumeur, le phénotype cellulaire peut grandement varier du fait que la tumeur primaire intraoculaire est un tissu très hétérogène (43). D'autres observations sont également utilisées par le pathologiste afin qu'il puisse poser le bon pronostic (Tableau 1).

De ce fait, la taille et la localisation de la tumeur primaire, la présence d'extensions extra-sclérales, son index mitotique (pourcentage de cellules en mitose), ainsi qu'une vascularisation tumorale sont des observations non négligeables que les pathologistes notent afin de classifier les mélanomes uvéaux et de leur attribuer des pronostics vitaux (4, 6).

Une morphologie cellulaire épithélioïde, un gros diamètre tumoral (diamètre supérieur à 15mm, et/ou épaisseur supérieure à 8mm), ainsi qu'une invasion du corps ciliaire constitueraient un exemple d'un mauvais pronostic vital basé sur ces caractéristiques histopathologiques.

1.2.2.1 Les gènes mutés dans le mélanome uvéal

La mutation de certains gènes est aussi une caractéristique de certains cas de mélanome uvéal, telle qu'une mutation inactivatrice dans le gène «*BRCA1Associated Protein 1*» (BAP1) retrouvée dans les formes métastatiques de la maladie (44) (Figure 6B). Par ailleurs, des mutations dans les gènes GNAQ et GNA11, qui codent pour des protéines qui participent à la voie des «*Mitogen Activated Protein Kinase*» (MAPK), sont fréquemment observées dans les tumeurs de mélanome uvéal (fréquence de 83%) (45) (Figure 6A). Ces mutations entraînent une activation constitutive de ces petites protéines G qui, à leur tour, activent chroniquement d'autres intermédiaires de cette voie de signalisation telle que la phospholipase C (PLC), ce qui entraîne évidemment des répercussions sur de nombreux processus cellulaires, dont la croissance et la prolifération cellulaire, qui peuvent alors devenir anarchiques (44, 46, 47).

Finalement, certaines mutations redondantes dans les gènes «*Splicing Factor 3B Subunit 1*» (SF3B1) (dans 29% des tumeurs ayant une disomie du chromosome 3) (Figure 6C), ainsi que l'«*Eukaryotic translation Initiation Factor 1A X-linked*» (EIF1AX) (dans 48% des tumeurs ayant une disomie du chromosome 3) (Figure 6D) sont couramment retrouvées dans les tumeurs de mélanome uvéal, cependant, leur rôle dans le processus mitogénique demeure peu défini (48, 49).

Étude		Facteur	Pronostic
Clinique	Localisation	Iris	Bon
		Choroïde	Moyen
		Corps ciliaire	Mauvais
Clinique	Dimension	Petite	Bon
		Moyenne	Moyen
		Grosse	Mauvais
Histopathologique	Morphologie	Fusifforme	Bon
		Mixte	Moyen
		Épithélioïde	Mauvais
	Activité mitotique	Basse	Bon
		Moyenne	Moyen
		Élevée	Mauvais
	Patrons microvasculaires	Absence	Bon
		Présence	Mauvais
	Extension extra-sclérale	Absence	Bon
		Présence	Mauvais
Cytogénétique	Monosomie 3 et duplication 8q	Absence	Bon
		Présence monosomie 3	Mauvais
		Présence duplication 8q	
		Présence monosomie 3 et duplication 8q	Mauvais
			Mauvais

Tableau 2: Récapitulatif des facteurs pronostics du mélanome uvéal. Adapté de (24, 41).

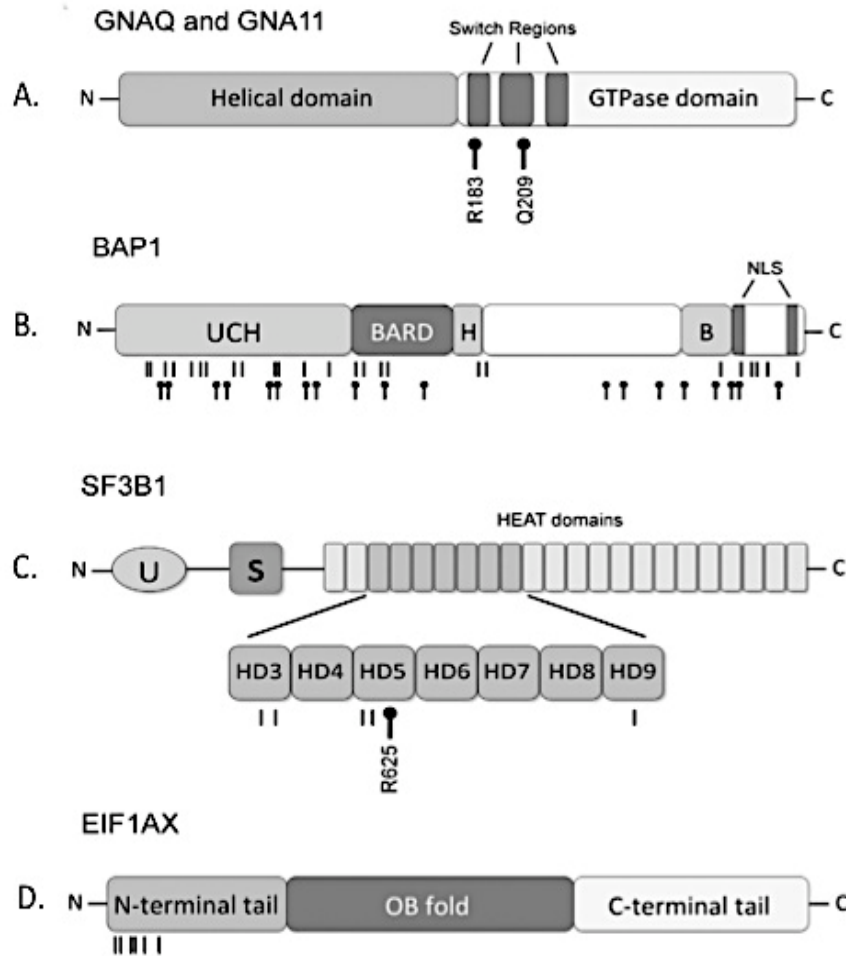


Figure 6: Mutations fréquentes dans les cas de mélanome uvéal. Figure adaptée de (46). A. GNAQ et GNA11, de petites protéines G à activité GTPase, présentent des mutations mutuellement exclusives dans les deux résidus R183 ou Q209 qui mènent à une activation chronique de leurs voies de signalisation. N : domaine N-terminal, C : domaine C-terminal. B. BAP1 comporte plusieurs domaines distincts : UCH : Domaine Ubiquitine Carboxy-terminale Hydrolase, BARD : domaine de liaison à BARD, H : domaine de liaison à HCF1, B : Domaine de liaison à BRCA1, NLS : signal de localisation nucléaire. Barres : Mutations qui n'entraînent pas de protéine tronquée. Ronds : Mutations entraînant une protéine tronquée. C. SF3B1 : U : Domaine d'interaction avec U2AF2, S : Domaines d'interaction avec SF3B14, HD : 17 domaines HEAT non redondants. HD5 résidu R625 est la mutation la plus retrouvée, les barres montrent des mutations moins fréquentes. D. EIF1AX : OB : Domaine de liaison d'oligonucléotides. Barres : substitutions ou délétions de quelques nucléotides.

Depuis 2010, l'équipe du Dr William Harbour a défini une signature moléculaire de 12 gènes dérégulés (49), qui nous permettent de subdiviser les cas de mélanomes uvéaux globalement en deux classes distinctes : une première classe qui comprend les individus à faible risque de développer des métastases hépatiques (risque compris entre 2% et 21% de développer des métastases sur une durée de 5 ans), ainsi qu'une classe 2 comprenant les patients à fort risque de développer des métastases (risque de 72% sur une durée de 5 ans). La surexpression du récepteur 2B de la sérotonine (HTR2B) est le facteur le plus discriminant de cette signature (49) puisqu'il est surexprimé dans les tumeurs primaires de patients à risque de développer des métastases (c.f. section 1.3.1).

1.2.3 La dissémination métastatique

Les taux de mortalité élevés du mélanome uvéal sont essentiellement dus aux métastases secondaires dont souffrent les patients atteints de ce cancer. En effet, chez 97% de ceux-ci, le foie est le site initial de formation de métastases, ces lésions hépatiques devenant alors la principale raison du décès de ces patients (50). Cependant, d'autres organes peuvent être sujets à la formation de métastases en plus du foie (dans 63% des cas). Il s'agit, entre autres, des poumons, des os, du cœur, du tractus gastro-intestinal, du pancréas, de la peau, du système nerveux central, des reins, des ovaires, ainsi que des ganglions lymphatiques (dans les rares cas où les cellules cancéreuses traversent la paroi sclérale antérieure et gagnent accès aux vaisseaux lymphatiques) (51). Il est rare que ces organes soient atteints seuls, sans lésions hépatiques (3% des cas) (50).

Le mode de dissémination des cellules cancéreuses provenant de la tumeur primaire intraoculaire aux tissus cibles se fait quasi exclusivement par voie hématogénique, dû au fait de l'absence de vaisseaux lymphatiques intraoculaires. Le processus métastatique est complexe et se fait en plusieurs étapes. La cellule cancéreuse doit se détacher de la tumeur primaire, passer dans la circulation sanguine (ou lymphatique) par un phénomène d'intravasation, puis occuper son organe cible de prédilection (Figure 7).

Ces cellules subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (52), elles perdent leur ancrage à la tumeur primaire et gagnent un pouvoir invasif, leur permettant d'occuper des tissus hôtes distants (Figure 7). Une fois le tissu cible atteint, ces cellules peuvent demeurer quiescentes pendant des dizaines d'années avant qu'elle ne se remette à croître et altérer le fonctionnement de l'organe envahi (53).

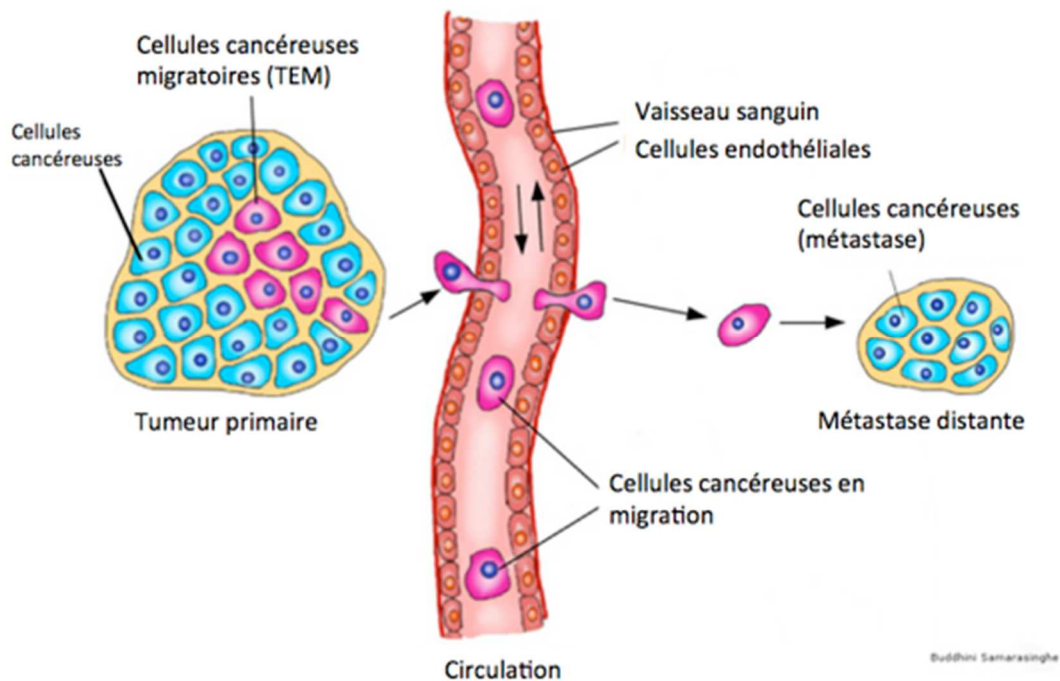


Figure 7: Schématisation du processus métastatique. Les cellules cancéreuses ayant subi une TEM acquièrent une mobilité et gagnent la circulation sanguine par intravasation à travers les vaisseaux sanguins puis occupent des organes distants et forment des métastases. Image adaptée de (54).

Il est important de rappeler que la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse est en premier lieu due à des modifications génétiques, qui ont comme impact de modifier les processus cellulaires de base (survie cellulaire, différenciation, prolifération...). Ces modifications génétiques doivent subvenir ou du moins impacter certains gènes clé, nommés gènes oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs (55).

Les cellules cancéreuses présentent une instabilité génétique qui altère entre autres les mécanismes de réparation de l'ADN, la résultante de ces altérations mène éventuellement à l'activation de ces oncogènes, ou à l'inverse, à l'inactivation de ces gènes suppresseurs de tumeurs (56).

Comme première étape, la cellule cancéreuse doit se détacher de la tumeur primaire. Plusieurs études ont démontré que cette capacité de la cellule cancéreuse à perdre ses ancrages à la tumeur primaire dépend de son degré de différenciation. Il est bien connu que la tumeur est un tissu hétérogène comprenant des cellules à des niveaux de différenciation distincts, dont les capacités migratoires sont diverses (57).

La dissociation de la cellule cancéreuse de la tumeur primaire nécessite la destruction des jonctions intercellulaires, ces dernières sont essentielles à l'intégrité des tissus, à la polarité cellulaire, ainsi qu'au processus de différenciation cellulaire. Les jonctions intercellulaires sont principalement formées par les complexes cadhérine/caténine. Les cadhérines étant des protéines transmembranaires dont les interactions homotypiques (lie une structure identique présentée par la cellule voisine) dépendent du calcium, elles font partie de la famille des CAMs (Cell Adhesion Molecule). Les caténines quant à elles servent à faire le lien avec le cytosquelette cellulaire, leur état de phosphorylation définit le degrés de cohésion cellulaire (58). D'autres protéines membranaires telles que la super-famille des immunoglobulines (Ig) sont aussi des actrices des contacts cellule/cellule. Ainsi, tout changement dans les capacités d'adhérence de la cellule cancéreuse se reflète sur le répertoire de protéines membranaires qu'elle exprime.

Au niveau moléculaire, la motilité cellulaire fait intervenir la petite GTPase Rac1 qui fait le lien entre le cytoplasme et le cytosquelette d'actine, permettant ainsi une migration cellulaire. Des études ont démontré qu'une surexpression de Rac1 mène à une augmentation de la motilité cellulaire (53).

La cellule maintenant détachée de la tumeur primaire doit pouvoir interagir avec la MEC (matrice extracellulaire) qui l'entoure jusqu'à son arrivée à son organe cible. Ces interactions sont gouvernées par des récepteurs membranaires spécialisés appelés intégrines (59). Les intégrines sont des protéines transmembranaires composées de 2 sous unités (α et β) dont les ligands sont des constituants de la MEC environnante. Ces protéines sont impliquées dans l'embryogénèse, la migration cellulaire et l'invasion tumorale (60). À ce jour, 24 hétérodimères $\alpha\beta$ ont été répertoriés (61).

Le répertoire d'intégrines exprimées par des cellules tumorales est très variable d'un cancer à l'autre, ceci étant principalement dû au fait que la modulation des niveaux d'expression de ces intégrines est médiée par leurs ligands présents dans la MEC environnante. De plus, peu d'études s'intéressent à l'expression des intégrines dans la dissémination du mélanome uvéal. On a néanmoins rapporté que la sous-unité d'intégrine α_4 , dont le principal ligand est la fibronectine, semble être majoritairement exprimée par les cellules invasives, leur permettant un meilleur ancrage à la MEC environnante (62). La sous-unité α_6 n'est pas exprimée par les tumeurs fusiformes et mixtes, ainsi que par les mélanocytes uvéaux normaux et pourrait servir de marqueur du potentiel invasif des tumeurs primaires intraoculaires (63). Par ailleurs, on a également démontré une corrélation inverse entre les niveaux d'expression du transcrit α_4 et le potentiel métastatique de certaines lignées de mélanome uvéal (64).

En résumé, les cellules tumorales en migration changent l'expression de leur répertoire d'intégrines afin de s'adapter à la MEC qui les entourent.

Le processus de dissémination métastatique est peu efficace. En effet plusieurs cellules tumorales circulent, cependant leur capacité à proliférer est limitée. La cellule en migration est soumise à de nombreuses formes de stress cellulaires, tels que les chocs mécaniques (pression sanguine, frictions dans les capillaires...) (65). Cette étude de l'équipe du Dr. Weiss démontre qu'une infime fraction de ces cellules survit effectivement à ces conditions, et que ces dernières présentent un haut potentiel métastatique.

Une fois cette migration accomplie, la cellule tumorale doit pouvoir envahir son organe cible. Cette étape nécessite la sécrétion de protéases capables de dégrader la matrice extracellulaire entourant les organes, telles que les métalloprotéases matricielles (MMPs) (66). Les MMPs sont des enzymes capables de dégrader les différents composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la laminine et la fibronectine. Les métalloprotéases jouent un rôle primordial dans le développement embryonnaire, le remodelage tissulaire, ainsi que lors des guérisons des plaies (67).

L'organisme maintient un équilibre fin entre les MMPs et leurs inhibiteurs, tels que les TIMPs (« Tumor Inhibitor Metallo Proteases ») afin d'assurer l'intégrité des tissus. Ces deux acteurs jouent alors un rôle déterminant lors des processus de remodelage tissulaire, si bien que la mesure de ces déterminants moléculaires peut s'avérer être un marqueur pronostique de malignité (68).

Il existe une notion déterminante en cancérologie. Paget a décrit en 1889 la théorie du « seed and soil » (69), la graine et le sol, la graine étant la cellule cancéreuse, et le sol l'organe cible. Dans la quasi-totalité des cancers, les cellules ont des organes cibles préférentiels (foie puis poumons dans le cas du mélanome uvéal par exemple). Certes, cette préférence est dépendante, entre autre, du volume sanguin drainé par ces organes cibles, mais elle fait aussi intervenir des notions de microenvironnement.

Le microenvironnement cellulaire inclut la sécrétion de différents facteurs de croissance (FCs) dans l'organe cible, ce dernier devant être adéquat à la prolifération de la cellule tumorale. Ainsi, des cytokines stimulant la prolifération cellulaire telles que l'interleukine 1 (IL1), peuvent être sécrétées par les cellules endothéliales, les macrophages, et les fibroblastes (dans le cas de l'IL6) de l'organe envahi (70). Une fois l'organe cible atteint, la cellule cancéreuse l'envahit en produisant son propre microenvironnement cellulaire, dans lequel elle peut proliférer rapidement ou, à l'inverse, demeurer en dormance (quiescence) sur des durées plus ou moins longues.

Ce mécanisme de quiescence soulève plusieurs questions qui restent à ce jour sans réponse. Il n'en demeure pas moins que la modulation du microenvironnement tumoral dans l'organe cible demeure une thématique de recherche très active depuis plusieurs années (70).

1.2.4 Traitements

Puisque le mélanome uvéal peut mener à l'apparition de métastases à des sites distants, il faut concevoir qu'il existe deux volets distincts au traitement d'une telle maladie : le traitement de la tumeur primaire intraoculaire et celui des métastases hépatiques (si besoin est).

1.2.4.1 Traitement de la tumeur primaire intraoculaire

Même si par le passé le traitement préconisé de la tumeur primaire intraoculaire était l'énucléation de l'œil atteint, de nos jours, des possibilités plus grandes s'offrent aux patients. Celles-ci dépendent de la taille de la tumeur, de sa localisation, de l'état général du patient, ainsi que de l'extension éventuelle de la tumeur intraoculaire (71). Cependant, l'énucléation est toujours de mise pour les tumeurs de grosse taille ou celles qui sont insensibles aux traitements de radiothérapie.

Il est possible de traiter le patient ayant des tumeurs primaires de petites et moyenne taille par radiothérapie, qui demeure tout de même un traitement conservateur. Bien que plusieurs formes de radiothérapie soient disponibles (protonthérapie, radiothérapie stéréotaxique...) (72, 73), la curiethérapie (ou brachythérapie) semble être la plus attrayante. Dans cette approche, des granules radioactifs (ex : Iode 125) sont fixés sur une plaque métallique en or (Figure 8B) qui sera placée chirurgicalement sur la sclérotique, au dessus de la tumeur intraoculaire, ce qui permet de détruire les cellules cancéreuses sous-jacentes à la plaque (Figure 8A).

Par ailleurs, les traitements combinés semblent donner des résultats prometteurs (74). En effet, les traitements de radiothérapies peuvent être appliquées avant une chirurgie (radiothérapie néoadjuvante), après une chirurgie (radiothérapie adjuvante), ou même en dehors de toute intervention chirurgicale, afin de soulager la douleur des patients (radiothérapie palliative).

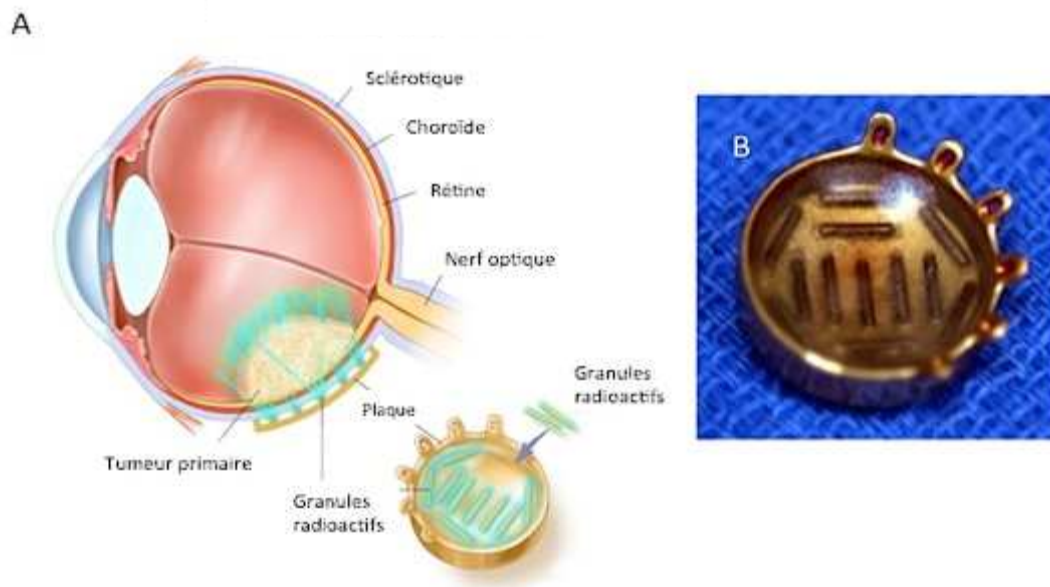


Figure 8: Traitement de la tumeur intraoculaire par curiethérapie par plaque (brachythérapie). A. Positionnement de la plaque contenant des granules radioactifs vis à vis de la tumeur intraoculaire. B. Plaque concave en or qui sera cousue sur la sclérotique, servant à maintenir les granules radioactifs pour une durée de 4 à 7 jours. Images adaptées de (75, 76).

1.2.4.2 Traitement des métastases secondaires

Même si les traitements de la tumeur primaire s'avèrent être efficaces, il n'existe hélas aucun traitement curatif lorsque le stade métastatique est atteint, cette atteinte hépatique étant la principale cause de décès des patients souffrants de mélanome uvéal.

Les cellules cancéreuses qui ont gagné les sites métastatiques secondaires semblent accomplir leur migration dans les étapes les plus précoces de la maladie, puisque le traitement ou l'ablation de la tumeur primaire intraoculaire n'empêche en rien la formation de métastases.

Cette problématique a tout de même été longuement débattue. En effet, en 1978, le Dr. Zimmerman, un pathologiste Américain, a publié un article proposant que le traitement intraoculaire de la tumeur primaire par énucléation pouvait aider à la dissémination mécanique des cellules cancéreuses vers la circulation générale, accélérant ainsi le risque de métastases secondaires. Cette étude était basée sur un pic de mortalité observé dans la deuxième année suivant le traitement chirurgical des tumeurs intraoculaires des patients atteints de mélanome uvéal (77).

25 ans plus tard, une nouvelle étude a revu les résultats proposés par Zimmerman (78), celle-ci venant confirmer la présence de ce pic de mortalité après l'intervention chirurgicale au niveau de la tumeur primaire intraoculaire. Cependant, aucune évidence n'attribue cette augmentation du taux de mortalité à l'énucléation de l'œil atteint, celle-ci pouvant être expliquée simplement par une dissémination précoce des cellules cancéreuses aux organes cibles.

Depuis, plusieurs études proposent que ces cellules cancéreuses semblent demeurer quiescentes, dans un état de dormance, au sein de leurs organes cibles secondaires, démontrant alors une absence totale de symptômes sur de longues durées (28).

Parmi les traitements envisageables, il est possible de tenter une résection chirurgicale du foie, en retirant les parties atteintes de cet organe. Dans certains cas, cette procédure augmente la durée de vie des patients traités de 9 à 36 mois (79). Il y a aussi possibilité de procéder à une chimioembolisation de l'artère hépatique (bloquer l'apport de sang aux parties atteintes du foie) qui améliore de 6 à 14 mois la survie des patients (19), ou à une chimiothérapie hépatique intra-artérielle qui améliore de la survie des patients de 14 à 24 mois (19).

Des traitements anticancéreux systémiques ont été expérimentés mais les métastases semblent y être résistantes (80). Les regards se tournent désormais vers d'autres stratégies thérapeutiques telles que l'inhibition des petites protéines G mutées GNAQ et GNA11 (47).

Par ailleurs, on tente également de cibler des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, telle que la voie des MAPK, afin de bloquer les effets angiogéniques observés dans ce cancer (81).

Depuis 2014, des essais cliniques (NCT01587352, NCT02068586; phase II) mettent à profit la connaissance de la signature génique de classe 2 définie par le Dr. Harbour. Ces essais cliniques étudient l'efficacité thérapeutique d'inhibiteurs qui ciblent une famille d'enzymes qui participent à la compaction de la chromatine, les histones déacétylases (HDACs), le but final étant de modifier la signature moléculaire présentée par les patients atteints de mélanome uvéal de la classe 2 (fort risque de métastases) vers celui de la classe 1 (faible risque de métastases). Dans cette approche, les modifications apportées sont de l'ordre de l'épigénétique (82).

1.3. Les récepteurs sérotoninergiques

La sérotonine chez les mammifères accomplit deux rôles distincts, le premier au niveau du système nerveux central, et le second en périphérie, via la liaison de récepteurs sérotoninergiques spécifiques, qui stimulent des cascades signalétiques particulières (83).

La sérotonine (ou 5- hydroxytryptamine 5-HT) est une monoamine de la famille des indolamines. Elle agit comme neurotransmetteur au niveau du système nerveux central (sécrétée par les neurones sérotoninergiques), mais aussi en périphérie comme hormone locale, où elle est sécrétée par les cellules entérochromaffines (intestinales) ainsi que les thrombocytes. La sérotonine joue différents rôles biologiques tels que la régulation du rythme circadien, la régulation de l'hémostase, la mobilité digestive, ainsi que dans la régulation de l'humeur et la dépression (79).

Les effets engendrés par la liaison de la sérotonine à ses récepteurs dépendent de leur diversité. En effet, de nos jours, plus de 14 gènes codant les récepteurs sérotoninergiques ont été définis, l'ensemble de ces gènes codant plus de 30 récepteurs protéiques différents (dont certains sont produits par épissage alternatif) (84).

Ces récepteurs sont regroupés en 7 sous-familles classées par analogie de structure de gènes. Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G (84).

La liaison de la sérotonine à ces récepteurs entraîne l'activation des petites protéines G GNAQ, GNA11, et GNA13 qui sont associées à ceux-ci. À leur tour, ces petites protéines G vont activer des intermédiaires signalétiques en aval tels que certains médiateurs de la voie des MAPK, de la Phospholipase C (PLC), ainsi que celle des JAK/STAT (85).

1.3.1 Le gène HTR2B

L'isoforme 2B des récepteurs à la sérotonine (HTR2B) est notre gène d'intérêt dans cette étude. Ce récepteur joue des rôles dans la morphogénèse embryonnaire en prévenant la différenciation des cellules des crêtes neurales (86) pendant leur migration. Le récepteur HTR2B est aussi impliqué dans la résistance à l'apoptose en prévenant le relargage du cytochrome C par les mitochondries ainsi que l'activation des caspases (87).

Parmi les gènes de la signature du Dr. W. Harbour qui permettent de subdiviser les mélanomes uvéaux en deux classes (fort risque versus faible risque de développer des métastases hépatiques) (41), la surexpression du gène HTR2B constitue l'indicateur le plus fiable du risque d'évoluer vers le volet métastatique. En effet, des analyses de profilage génique sur biopuce à ADN réalisées dans notre laboratoire ont permis d'observer de hauts niveaux d'expression du transcrite du gène HTR2B humain uniquement dans les tumeurs primaires intraoculaires provenant de patients atteints de ce cancer et qui sont décédés suite aux complications liées à l'apparition de métastases au foie, tels que le patient 138, 139, 141, 142 et 151 (Figure 8).

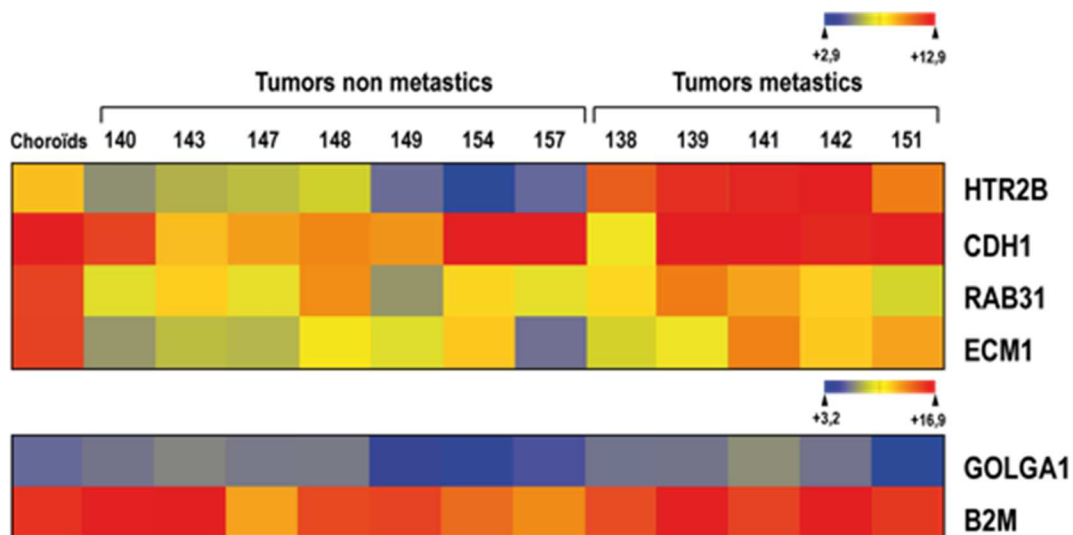


Figure 9: Analyse en profilage génique des niveaux d'expression du gène HTR2B au sein de tumeurs primaires de patients atteints de mélanome uvéals. Sur cette échelle logarithmique, les niveaux élevés d'expression génique sont indiqués en couleur chaude, tandis que les niveaux bas d'expression génique apparaissent en couleur froide. (Équipe S. Guérin et S. Landreville).

Il est intéressant de noter que le gène HTR2B humain présente une dualité fonctionnelle intrigante, sa dérégulation étant rapportée dans de nombreux types de cancers. Étonnamment, parfois le produit de ce gène semble jouer un rôle d'oncogène, comme c'est le cas dans le cancer hépatocellulaire ainsi que le cancer de la prostate (88-90), tandis qu'à l'inverse, il peut jouer un rôle de suppresseur de tumeur, comme c'est le cas pour le cancer de l'ovaire (91). Quoiqu'il en soit, ce gène semble jouer un rôle clé du fait de son implication dans plusieurs types de cancers.

1.4. Problématique, hypothèse et objectifs des travaux de recherche

Le mélanome uvéal est certes un cancer rare, mais il n'en demeure pas moins qu'il soit très agressif puisqu'il mène au décès du patient dans près de 50% des cas. En raison de sa grande résistance aux traitements de radiothérapie et de chimiothérapie, ainsi qu'à sa capacité de former des métastases, il est donc évident que ce cancer affecte grandement la qualité de vie des patients qui en souffrent.

Tel qu'établi par l'équipe du Dr. Harbour, le suivi de l'expression du gène HTR2B semble être un excellent outil de prédiction du risque d'apparition des métastases chez les patients atteints de ce cancer. Ainsi, bien que le gène HTR2B soit le plus discriminant de cette signature, aucune étude jusqu'à présent n'a approfondi les mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression aberrante de ce gène chez les patients à haut risque d'évoluer vers la maladie métastatique.

Nous émettons ici l'hypothèse selon laquelle l'expression aberrante du gène HTR2B au sein de lignées de mélanome uvéal dérivées d'une tumeur primaire ayant mené à la formation de métastases hépatiques chez le patient atteint, serait due à une différence d'expression des facteurs de transcription qui en régulent l'expression et/ou à une modification de leur capacité à lier leur séquence cible dans les régions régulatrices du gène HTR2B, menant finalement à sa surexpression aberrante.

Le but de notre étude consistait donc à définir l'organisation du promoteur du gène HTR2B et à étudier les facteurs de transcription, ainsi que les régions régulatrices liées par ceux-ci, qui participent à l'expression de ce gène dans des lignées de mélanome uvéal qui expriment des niveaux variables de HTR2B.

La réalisation d'un tel objectif nécessitait l'accomplissement des volets suivants :

- Évaluer le niveau d'expression du gène HTR2B au sein de nos lignées de mélanome uvéal par profilage génique sur biopuce à ADN, qPCR, ainsi que son expression protéique par immunobuvardage Western.
- Cloner le promoteur du gène HTR2B humain ainsi que sa région 5'-régulatrice dans le plasmide pCATbasic, en amont du gène rapporteur Chloramphénicol Acétyl Transférase (CAT).
- Localiser les régions régulatrices que contient le promoteur du gène HTR2B humain à l'aide d'analyses de délétion du promoteur couplées à la transfection des plasmides recombinants produits dans nos lignées de mélanome uvéal.

- Déterminer quels facteurs de transcription lient ces régions régulatrices ainsi que la position de ces sites de liaison le long du promoteur du gène HTR2B par des analyses de retard sur gel EMSA ainsi que par la technique d'analyse d'interférence de méthylation au diméthylsulfate.
- S'assurer que ces facteurs de transcriptions sont bien exprimés par nos lignées de mélanome uvéal et qu'ils reconnaissent leur séquence d'ADN cible en exploitant les analyses par qPCR et buvardages Western.
- Créer des mutations ponctuelles dans les sites de liaison de ces facteurs de transcription et en évaluer l'impact sur les niveaux d'expression du gène HTR2B.

La réalisation de ce projet nous permettra, à plus long terme, d'étudier la contribution du gène HTR2B aux propriétés de dissémination métastatique non seulement du mélanome uvéal, mais également de nombreux autres types de cancers.

2. Chapitre 2 : Transcription of the human 5-Hydroxytryptamine receptor 2B (HTR2B) gene is under the regulatory influence of the transcription factors NFI and RunX1 in human uveal melanoma.

Manel Benhassine^a, Karine Zaniolo^a and Sylvain L. Guérin^{a,b}

^aCentre Universitaire d'Ophtalmologie-Recherche (CUO-Recherche), Axe médecine régénératrice, Hôpital du Saint-Sacrement, Centre de Recherche FRQS du CHU de Québec-Université Laval, Québec, Canada; ^bDépartement d'ophtalmologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada

Corresponding author:

Dr. Sylvain L. Guérin, CUO-Recherche, Hôpital du Saint-Sacrement, Centre de recherche FRQS du CHU de Québec, Québec, QC, Canada

Phone: (418) 682-7565

Fax: (418) 682-8000

E-mail: Sylvain.Guerin@fmed.ulaval.ca

ABSTRACT

Uveal melanoma (UM) is the most common type of primary intraocular tumor in the adult population. The gene encoding the serotonin receptor 2B (HTR2B) appears to be the most discriminating among the candidates from the class II gene signature as its expression strongly increases in the tumors of UM patients that will progress toward liver metastases. In this study, we investigated the molecular mechanisms that lead to this aberrant expression of HTR2B in metastatic UM cell lines. Transfection analyses revealed that the upstream regulatory regions of the HTR2B promoter is made up of a combination of alternative positive and negative regulatory elements that are functional in HTR2B⁻ but not in HTR2B⁺ uveal melanoma cell lines. Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) provided evidence that the transcription factor (TF) NFI could interact with the promoter and the upstream negative regulatory element from the HTR2B gene. In addition, the TF RUNX1 was also shown by DMS methylation interference footprinting and EMSA to bind a target site from the distal silencer element. Site-directed mutagenesis analyses indicated that NFI and RUNX1 function respectively as activator and repressor of HTR2B gene transcription. The results of this study will help understand better the molecular mechanisms accounting for the abnormal expression of the HTR2B gene in uveal melanoma.

KEYWORDS

HTR2B, gene promoter, NFI, RUNX1, transcription factor, uveal melanoma

1. INTRODUCTION

Uveal melanoma (UM) is the most common primary ocular malignancy in adults, accounting for 70% of all eye cancers. The overall mean age-adjusted incidence in the United States is 4 to 6 per million individuals [1]. The actuarial 15-year metastatic mortality is approximately 50% despite efficient treatment of the primary ocular tumor [2]. Factors associated with metastatic disease include pathological features [3], cytogenetic abnormalities such as monosomy 3 and 8q gain [4, 5], *BAP1* mutations [6], and the class 2 gene signature [7]. Indeed, a gene expression signature comprising 12 genes that can discriminate between UM primary tumors at low (class I genes: *FXR1*, *LTA4H*, *ID2*, *ROBO1*, *MTUS1*, *LMCD1*, *STAB1* and *EIF1B*) or high (class II genes: *HTR2B*, *CDH1*, *RAB31* and *ECM1*) risk of evolving towards the formation of liver metastases has been described [8]. The 8-year survival probability has been established to be 95% in class 1 patients against only 31% in class 2 patients [8]. The human gene encoding the 5-Hydroxytryptamine receptor 2B (*HTR2B*), also known as the serotonin receptor 2B, turn out to be the most discriminating among the class II genes in order to identify UM patients at high risk of evolving toward liver metastatic disease [9, 10].

The serotonin receptor *HTR2B* belongs to a larger family of proteins that comprises seven sub-families (*HTR1* to *HTR7*) [11]. When it binds its ligand serotonin (5-HT), *HTR2B* activates the G proteins *GNAQ*, *GNA11* and *GNA13* and participates to development and both cell proliferation and survival through the activation of a few signal transduction pathways such as PLC, JAK/STAT and RAF/MEK/ERK pathways [6, 11-13]. A recent study conducted in primary cultured hepatocytes also reported the activation of the *HTR2B* receptor/(Gq)/PLC pathway and the RTK/PI3K/ERK/mTOR signaling pathways in response to the binding of 5-HT to the *HTR2B* receptor [14].

By preventing differentiation of the neural crest cells, HTR2B also plays a role in embryonic morphogenesis [15]. A few studies ascribed mitogenic and angiogenic properties to serotonin [16-19]. Curiously, the HTR2B receptor has been described as an oncogene in certain types of cancers (hepatocellular and prostate cancers) [19-21] but also as a tumor suppressor in others (such as ovarian cancers) [22]. Moreover, alteration of HTR2B expression in *Xenopus* embryos was reported to cause alterations in the proliferation rate and survival of retinal precursors in retina that also result in abnormal retinal physiology [23]. Interestingly, excess serotonin signaling that results from the overexpression of the HTR2B receptor was found to cause the formation of irregularly shaped eyes that are inappropriately positioned and oriented in *Xenopus* embryos [24].

Although the signal transduction cascades activated by the binding of serotonin to HTR2B has been investigated for years, yet no study ever reported the characterization of the regulatory sequences that are critical to ensure proper transcription of the HTR2B gene. In this study, we cloned both the promoter and 5'-flanking sequence from the human HTR2B gene and studied its regulation in human uveal melanoma (UM) cell lines that express this gene to various levels. We identified the presence of both a distal and a proximal silencer that negatively regulate the transcription directed by the HTR2B promoter in the UM cell lines T97, T108 and T143 that do not express this gene, but not in the HTR2B-expressing T142 UM cell line. Members from the NFI family of transcription factors (TFs) were found to activate HTR2B transcription by binding to its promoter region whereas the TF RUNX1 was found to repress HTR2B promoter activity by interacting with the distal silencer element. These results suggest that HTR2B gene expression is likely dictated by subtle alterations in the nuclear ratio of TFs that either repress (RUNX1) or activate (NFI) HTR2B transcription in UM cells.

2. MATERIAL AND METHODS

This study was conducted in accordance with our institution's guidelines and the Declaration of Helsinki. The protocols were approved by the hospital and the University Committees for the Protection of Human Subjects.

2.1. Cell Culture

The uveal melanoma cell lines T97, T98, T108, T111, T128, T131, T132, T142, T143, T151 and T157 were each cultured from the primary tumors of different patients diagnosed with this type of cancer and many of them have been previously described [25-28]. Human embryonic kidney 293T cells were obtained from ATCC (ATCC CRL-3216; Manassas, VA, USA). All cells were cultured in DMEM Multicell (high glucose, with l-glut, without L-Pyruvate; Wisent, Québec, QC, Canada) supplemented with 10% FBS High quality (Wisent, Québec, QC, Canada) and 0,002% v/v gentamicin (Gibco) at 37°C under 5% CO₂.

2.2. Indirect immunofluorescence

Indirect immunofluorescence assays were performed on uveal melanoma cell lines (T97, T1108, T142 and T143) grown on glass coverslips and acetone-fixed (10 min at -20 °C). Cells were incubated for 45 min with a primary antibody directed against the HTR2B protein (SAB4501476, Sigma-Aldrich, Oakville, On. Canada) and used at an optimal dilution of 1:100 in phosphate-buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na₂HPO₄ and 1.5 mM KH₂PO₄) containing 1% bovine serum albumin. The secondary antibody (rabbit anti-mouse IgG (H + L) conjugated with Alexa-fluor[®] 488 (1:400; Molecular Probes)) was incubated for 30 min. Cell nuclei were also labeled with Hoechst reagent 33258 (1:100; Sigma Chemicals) following immunofluorescence staining. Cell samples were then observed with an epifluorescence microscope (Eclipse E600; Nikon) and photographed with a numeric CCD camera (AxioVision). Negligible background was observed for controls (primary antibodies omitted).

2.3. Plasmid constructs and oligonucleotides

A near 2 kb fragment bearing the 5' flanking sequence of the human HTR2B gene (from position -2000 to +96 relative to the theoretical mRNA start site) was synthesized and cloned by *Blue Heron* (Bothell, WA, USA) upstream of the CAT reporter gene into the pCATBasic vector (Promega, Madison, WI, USA). Derivatives from the -2000/HTR2B construct bearing various deletions of the HTR2B promoter were then produced by first digesting the parental plasmid with the restriction enzyme SbfI (target site located 5' into the multiple cloning site (MCS) of pCATBasic) followed by a second digestion with one of the following enzymes: SpeI (cuts at position -1297), NsiI (cuts at -710), StuI (cuts at -430) or SacI (cuts at -138). The restriction site overhangs of the double-digested plasmids were blunt ended by treatment with Klenow (New England Biolabs Whitby, ON, Canada) and ligated using T4 DNA ligase (New England Biolabs). All recombinant HTR2B/CAT plasmids therefore share the same 3' end (at position +96) but different 5' termini (5' positions: -2000, -1297, -710, -430 -138). Target sites for the transcription factor NFI identified at position -9, -210, -1249 and -1275 as well as that for the transcription factor RUNX1 at position -1134 were mutated using the *QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) according to manufacturer's instructions.

Construction of the pLenti6V5A derivatives that express high levels of each of the four human NFI isoforms (NFIA, -B, -C and -X) have been recently described [26]. The double-stranded oligonucleotides used either as labeled probe or unlabeled competitors in the EMSAs were chemically synthesized using a Biosearch 8700 apparatus (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, WA, USA). Their DNA sequences are listed in Supplementary Table 1.

2.4. Expression of the human recombinant NFI isoforms

Expression and purification of each of the NFI isoforms was performed using the IMPACT (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*) protein purification system as recommended by the supplier (New England Biolabs). cDNAs encoding each of the NFI isoforms were cloned in the plasmid pTXB1 and then transformed in *E. coli* ER2566 cells. Bacterially produced NFI proteins were then bound to the chitin resin, washed with 100 ml of lysis buffer (20 mM Na-HEPES pH8.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100), incubated overnight in 1 column volume of lysis buffer containing 50 mM DTT. NFI proteins were then collected into 2 fractions of 500 μ l. The proteins remaining on the column were collected following the addition of 5 ml of DTT-free lysis buffer. All collected fractions were dialyzed against DNaseI buffer A (50 mM KCl, 20 mM K₃PO₄ pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 1 mM β -mercaptoethanol, 20% glycerol) and kept frozen at -80°C. When needed, 30 μ l of dialyzed, recombinant NFI proteins were phosphorylated for 1 h at 30°C with casein kinase II (500 U; New England Biolabs) in CKII buffer containing 19 μ M ATP (final volume of 75 μ l) prior to their use in EMSA.

2.5. Transient Transfections and CAT Assays

All HTR2B/CAT recombinant plasmids were transiently transfected into the uveal melanoma cell lines T97, T108, T142 and T143 grown to sub-confluence (70% coverage of the culture plate) into 6-wells tissue-culture plates using either the polycationic detergent Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) [29] or the K2® Transfection System (BIONTEX, München, Germany). Each tissue-culture well received 1 μ g of the test plasmid and 0.5 μ g of the hGH-encoding plasmid PXGH5 except for T143 cells, that were transfected with 2 μ g of the test plasmid and 0.5 μ g of PXGH5. When indicated, high levels NFI expressing pLenti6V5A derivatives (0.5 μ g) were co-transfected along with the HTR2B/CAT constructs (0.5 μ g) in T108 cells. All cells were harvested 48 hrs following transfection and CAT activities were determined and normalized to the hGH secreted in the medium. The value presented for each test plasmid transfected corresponds to the mean of at least three separate transfections performed in

triplicate. Student's t-test was performed for comparison of the groups. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$. All data are expressed as mean \pm SD.

2.6. Nuclear extracts and EMSA (electrophoretic mobility-shift assay)

Nuclear extracts were prepared from all cell types cultured to mid-confluence (70% coverage of the culture flasks) and dialyzed against DNase I buffer [50 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 20 mM K_3PO_4 pH 7.4, 1 mM β -mercaptoethanol (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) and 20% (v/v) glycerol], as described in ref. [30]. EMSAs were then conducted as described previously [31] by incubating nuclear proteins with a 5' ^{32}P -end-labelled BglIII/BstXI, 278 bp DNA fragment bearing most of the distal silencer of the $\alpha 9$ gene from position -1315 (BstXI site) to -1037 (BglIII site) and labeled at its BglIII site. When indicated, a 238 bp XbaI/SacI DNA fragment bearing the entire basal promoter of the HTR2B gene, or double-stranded oligonucleotides bearing either the high affinity binding site for the transcription factor NFI [32] or the RUNX1 binding site identified in the HTR2B distal silencer were also 5' ^{32}P -end-labeled and used as probes in EMSAs. Briefly, 5×10^4 cpm labeled probe was incubated with the amount of crude nuclear proteins specified in the legend of each figure in the presence of 2 μ g of poly(dIdC)-(dI-dC) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and 50 mM KCl in buffer D [10 mM Hepes pH 7.9, 10% v/v glycerol, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT (dithiothreitol; Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada) and 0.25 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma-Aldrich Canada)]. Double-stranded oligonucleotides bearing various binding sites for known transcription factors (Supplementary Table 1) were added as competitors (10- to 750-fold molar excesses, as specified in the figure's legends) during the assay. DNA-protein complexes were next separated by gel electrophoresis through either 6% (for both the 278- and 238 bp HTR2B labeled probe) or 8% (for both the NFI and RUNX1 probes) native polyacrylamide gels run against Tris-glycine buffer (50 mM Tris, 2.5 mM EDTA, 0.4 M glycine) at 4°C. Gels were dried and auto-radiographed at $-80^\circ C$ to reveal the position of the shifted DNA-protein complexes generated. Super-shift experiments were conducted by incubating 5 μ g nuclear proteins from T143 UM cells in the presence of 2 μ l of a

polyclonal antibody raised against NFI (SC-5567; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA).

2.7 Methylation Interference footprinting

The BglII/BstXI 278 bp HTR2B distal silencer fragment used in the EMA was 5' end-labeled at its BglII site and partially methylated with DMS as described [33]. Approximately 5×10^5 cpm methylated, labeled probe was incubated with 30 μ g crude nuclear proteins from T143 cells in the presence of 5 μ g poly(dI:dC) in buffer D and DNA-protein complexes were separated by electrophoresis through a 6% native polyacrylamide gel in Tris-glycine buffer. Following electrophoresis, the DNA-protein complexes were visualized by autoradiography and isolated by electroelution as described [34]. The isolated labeled DNA was then treated with piperidine and further analyzed on a 8% sequencing gel as described [33].

2.8. Western blots

Sample buffer (63 mM Tris PH8.0, 10% glycerol, 2% SDS, 0.0025% bromophenol blue, 300 nM β -mercaptoethanol) was added directly to cells cultures and a rubber policeman was used to collect the cells. Western blots were conducted as described [35] using primary antibodies directed against the following proteins: total NFI (sc-5567 (polyclonal), 1:2000; Santa Cruz Biotechnology), NFI-A (cat# (polyclonal), 1:500; Abcam, Toronto, ON, Canada), NFI-B (cat# (monoclonal), 1:100; Abcam), NFI-C (cat# (monoclonal), 1:500; Abcam), NFI-X (cat# (polyclonal), 1:100; Abcam), RUNX1 (ab23980, 1:1000; Abcam) and a peroxidase-conjugated AffiniPure Goat secondary antibody against mouse IgG (1:2500 dilution; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). The labeling was revealed using ECL Plus Western Blotting Detection Reagents Kit (Amersham) [36, 37].

2.9. Gene expression profiling

All microarray analyses were conducted by the gene profiling service of the molecular genetic platform (Genetiquemoleculaire.com) from the CUO-Recherche (Québec, QC, Canada). Briefly, cyanine 3-CTP labeled cRNA targets were prepared from 50 ng of total RNA isolated from all types of cells using the Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis kit (Agilent Technologies Canada Inc., Mississauga, ON, Canada). Then, 600 ng cRNA were incubated on a G4851A SurePrint G3 Human GE 8x60K array slide (60 000 probes, Agilent Technologies). Slides were then washed, stained and scanned on an Agilent SureScan Scanner and data further analyzed using the ArrayStar V12.1 (DNASTAR, Madison, WI) software for scatter plots and generation of the heat maps of selected genes of interest as recently described [25, 27]. All data generated from the array were also analyzed by RMA ('Robust Multiarray Analysis') for background correction of the raw values. They were then transformed in log₂ base and quantile normalized before a linear model was fitted to the normalized data in order to obtain an expression measure for each probe set. All microarray data presented in this study comply with the Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) requirements. The gene expression data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are accessible through GEO Series accession number GSE GSE86915.

2.10. Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP)-qPCR

ChIP analyses were conducted using the Zymo-Spin™ ChIP kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) on the UM cell lines T97, T108, T142 and T143. Briefly, when they reached 80% confluence on 150-mm tissue culture dishes, UM cells were harvested and 5×10^6 cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 7 minutes prior to sonication of cross-linked chromatin. The average size of the sonicated DNA ranged between 300-600 bp. Cross-linked chromatin was then immunoprecipitated with 1 µg antibodies against the transcription factors RUNX1 and NFI as previously reported [36, 38]. Incubation was also performed with a mouse antibody against IgG2a Fc (Chemicon, Temecula, CA) as a negative control.

qPCR analyses were then performed using the specific primers listed in Supplementary Table 1. The values for the samples immunoprecipitated by the anti-NFI, anti-RUNX1 and control IgG were normalized both to the input chromatin and the IgG signal. ChIP results were confirmed by two independent experiments and qPCR was performed in quadruplicate for each sample. As a negative control, each ChIP sample was also subjected to qPCR using primers (p21-F and p21-R; Supplementary Table 1) specific to a region located ~2 Kbp upstream from the human p21 promoter (cycle parameters are described in the next sub-section).

2.11. Quantitative PCR (qRT-PCR)

Quantity and quality of total RNA from all UM cell lines was assessed using an Agilent Technologies 2100 bioanalyzer and RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA). RNAs were used for qPCR and gene profiling analyses only if their *RNA integrity number* (RIN) was greater than 7 over 10. Reverse transcription was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit random hexamer primers following the manufacturer's protocol for synthesis the first strand cDNA (AB applied biosystems, Foster City, CA, USA). Equal amounts of cDNA were run in quadruplicate and amplified in a 20 µl reaction containing 10 µL of 2X SYBR green Advanced qPCR mastermix (Wisent, Québec, QC, Canada), 100 nM of upstream and downstream primers, and 1 ng of cDNA target. No-template controls were also used as recommended. The mixture was incubated at 95°C for 3 min, and then cycled at 95°C for 10 sec and at 60°C for 20 sec for 35 cycles using the QIAGEN Rotor-Gene Q real-time cycler. Amplification efficiencies were validated and normalized to the actin mRNA transcript and quantity of target genes were calculated according to a standard curve. The primers were designed using PrimerQuest Tool (IDT, Integrated DNA technologies, Coralville, WA, USA) and are listed in Supplementary table 1.

2.12. Statistical analyses

Student's t-test was performed for comparison of the groups in both transfection and qRT-PCR analyses. Differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$. All data are also expressed as mean \pm SD.

3. RESULTS

3.1. HTR2B expression in human uveal melanoma cell lines

Gene profiling on microarrays was first exploited in order to monitor the expression of the four candidates (HTR2B, CDH1, RAB31 and ECM1) that belong to the UM class II gene signature in a variety of UM cell lines cultured at low passage (P1 to P16). As shown on Figure 1A, UM cell lines that express high levels of HTR2B also often express elevated levels of the CDH1, RAB31 and ECM1 genes (ratio of signal normalized to the internal control β 2-microglobulin (RNS) ranging from 0.0002 to 0.3661; Figures 1A, left). The highest normalized level of HTR2B expression was observed in the UM cell lines T142 (RNS: 0.0205), T151 (RNS: 0.3661) and T157 (RNS: 0.0134) whereas the lowest levels were observed in T97, T98, T108, T111, T128, T131, T132, and T143 cells (with RNS of 0.0004, 0.0009, 0.0002, 0.0004, 0.0007, 0.0005, 0.0007 and 0.0002, respectively). When analyzed as replicates (Figure 1A, right), low HTR2B-expressing UM cell lines present with an RNS of 0.0005 ± 0.0002 whereas it is of 0.1333 ± 0.2016 for high HTR2B-expressing UM cell lines (which corresponds to a 267-fold difference between low and high HTR2B-expressing UM cells). The variations in HTR2B expression observed by microarrays between UM cell lines were also validated by qPCR (Figure 1B). However, despite that T97, T108 and T143 cells were found to express no or only very low levels of the HTR2B transcript (as revealed by both gene profiling and qPCR analyses), a significant amount of HTR2B protein could be observed by Western blot (and further validated by indirect immunofluorescence) in these UM cell lines (as well as in T142; Figure 1C and 1D). Interestingly, normalization of the HTR2B signal to that of the actin internal control provided evidence that T108 cells, which express a very low, barely detectable HTR2B mRNA level, also have the highest normalized level of HTR2B protein (ratio of 2.79; Figure 1C). This result is also consistent with the higher, more uniform and less diffuse signal obtained in immunofluorescence analysis for

T108 cells (Figure 1D). On the other hand, T142 cells, which express the most HTR2B at the mRNA level, had the lowest normalized ratio of HTR2B protein (0.92; Figure 1C) therefore suggesting that a reverse relationship may exist between expression of HTR2B at the mRNA and protein levels.

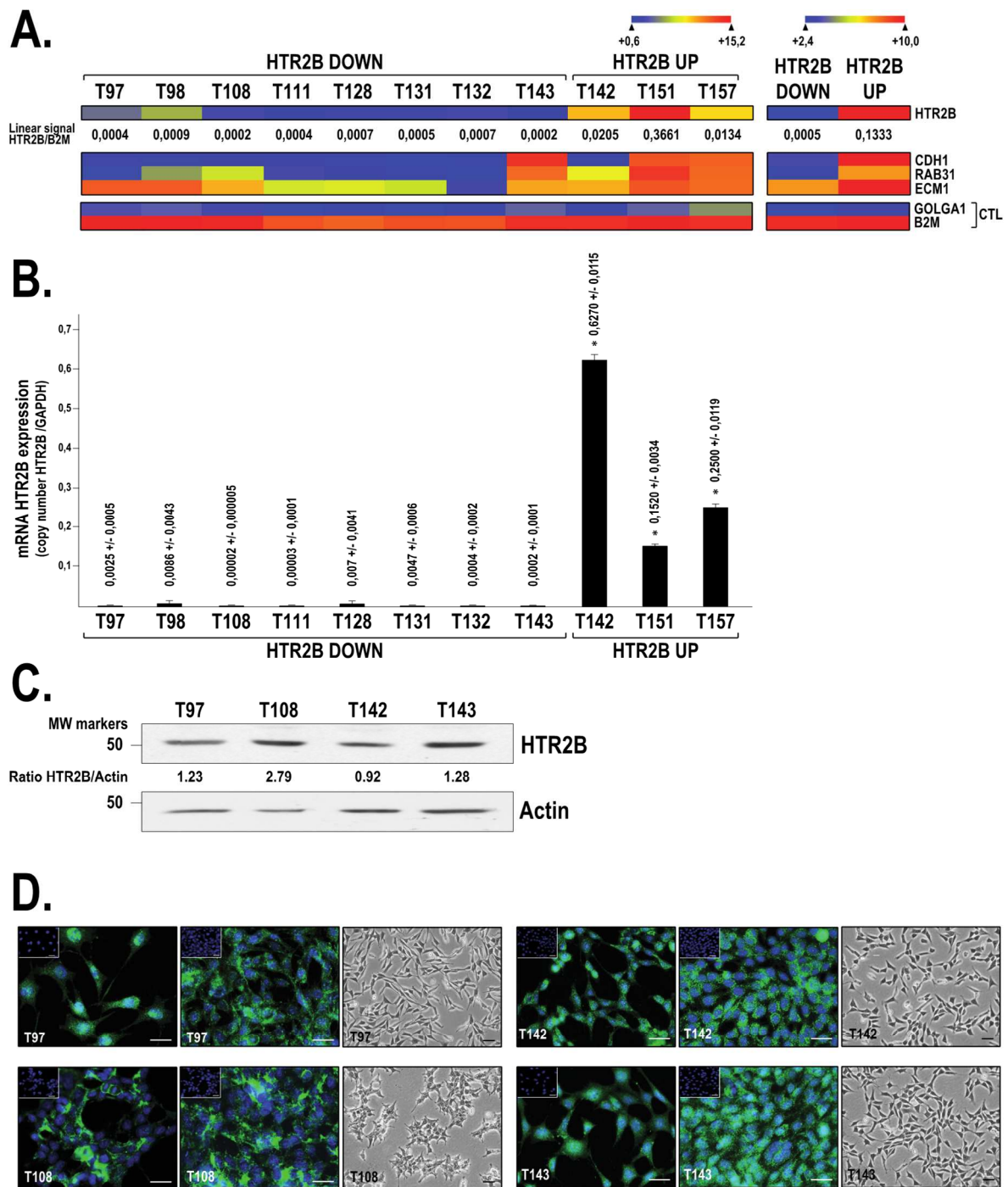


Figure 1

Figure 1. Expression of HTR2B in UM cell lines. A) Heatmap representation of the transcriptional profiles of the class 2 genes from the uveal melanoma gene signature (HTR2B, CDH1, RAB31 and ECM1) expressed by UM cell lines. Data for each individual UM cell lines are organized into two different categories: those that express either no or only very low levels of HTR2B are grouped in the 'HTR2B Down' category whereas those that express moderate to high levels of HTR2B are within the 'HTR2B Up' category. Microarray data for the housekeeping genes β 2-microglobulin (B2M) and golgin subfamily A member 1 (GOLGA1) that are expressed respectively to very high and low levels in all types of cells are also shown. B) qPCR analysis of HTR2B expression in cells used on Panel A. Data are presented as the ratio of $\square\square\square\square$ mRNA copy number over that of the GAPDH. Standard deviation is provided. C) Western blot analysis of HTR2B expression in T97, T108, T142 and T143 cells. Actin expression was monitored as a normalization control. D) Immunofluorescence analysis of HTR2B expression (in green) in the UM cell lines T97, T108, T142 and T143 grown to sub- (left panel) or mid-confluence (middle panel). Phase contrast micrographs of the cells used for immunofluorescence analyses are also provided for each cell line (right panel). Insets: negative controls in which the primary antibody was omitted. Nuclei were counterstained with Hoechst 33258 reagent and appear in blue. Scale bar: 20 μ M.

To identify putative target sites for transcription factors (TFs) that may be important for expression of the HTR2B gene in UM cell lines, we subjected a segment from the HTR2B gene extending up to approximately 2 Kbp upstream from the theoretical HTR2B mRNA start site to a search with the TFSEARCH program. Target sites for 25 different TFs (or families of TFs) that can potentially bind the HTR2B promoter were identified using this program (Figure 2A). Interestingly, a particularly high number of putative target sites were identified for the TF RUNX1 (9 sites) and the members of the NFI family (17 sites). Proteins from these two TF families are of a particular interest in that they have been reported to function either as transcriptional activators or repressors of many genes [39-43]. We next examined the pattern of expression for each of these TFs in the different UM cell lines that also express the HTR2B gene to different levels by searching the microarray data files used for generating the data from Figure 1A. As shown on Figure 2B, some of these TFs, such as GATA-1, GATA-2, HNF-3B, SOX-5, RUNX2 and c-Myb are either not expressed or only barely detectable in all UM cell lines examined and thus are not worth paying them too much attention. The low HTR2B expressing cells (T97, T98, T108, T111, T128, T131, T132 and T143) distinguish themselves from those that moderately or highly express that gene (T142, T151 and T157) by their lower level of expression of the TFs RUNX1, NFIA, some of the C/EBP and STAT family members, and all the AP-1 constituting subunits (most particularly c-Jun, c-Fos, FRA-1, FRA-2 and FosB) (Figure 2B, right column (replicates)) therefore suggesting that these TFs might contribute to the variations observed in the expression of the HTR2B gene between UM cell lines.

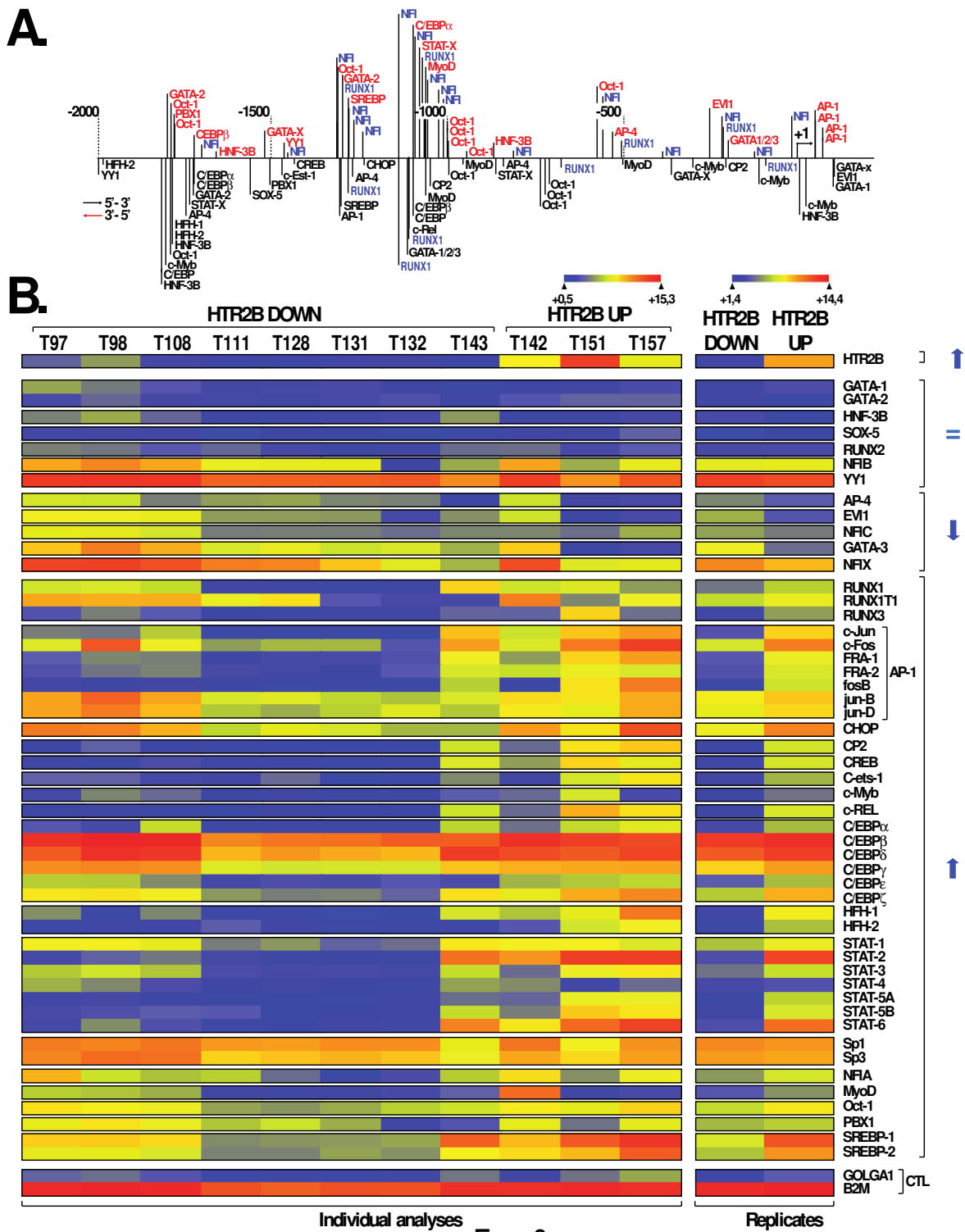


Figure 2. Putative transcription factor binding sites along the HTR2B promoter and 5'-flanking sequence. Schematic representation of the human

HTR2B promoter and 5'-flanking sequence. Potential binding sites for a variety of transcription factors (Sp1, AP-1, AP-2, NF- κ B, CREB, NFI, etc...) are indicated, along with the position of the theoretical transcriptional start site (+1). Negative values are positions relative to the mRNA start site. B) Heatmap representation of the transcriptional profiles of all the TFs expressed by UM cell lines for which a putative target site was identified in panel A. Data for each individual UM cell lines that express either no or only very low level of HTR2B (HTR2B Down) are aligned with those that express moderate to high levels of HTR2B (HTR2B Up). They are also expressed as HTR2B down and up replicates (right column). Microarray data for the housekeeping genes β 2-microglobulin (B2M) and golgin subfamily A member 1 (GOLGA1) that are expressed respectively to very high and low levels in all types of cells are also shown. The data presented were extracted from the microarray data files used for generating Figure 1.

3.2. HTR2B gene transcription is modulated by both positive and negative regulatory elements

To precisely delineate the position of the regulatory elements required for ensuring basal expression of the HTR2B gene, recombinant plasmids bearing the CAT reporter gene fused to different segments from the HTR2B gene promoter and 5'-flanking sequences (Figure 3B) were transfected into UM cell lines that express either very low (T97, T108 and T143) or intermediate (T142) levels of HTR2B, respectively (Figure 3A). Transfection of the plasmid HTR2B/-138 that contains the HTR2B promoter sequence from 3' position +96 to 5' position -138 relative to the transcriptional start site yielded easily detectable CAT activities upon transfection of all UM cell lines (Figure 3C). However, extending the HTR2B promoter to position -430 (in plasmid HTR2B/-430) caused a significant 2.7- to 5.3-fold repression in the HTR2B-negative UM cell lines T97, T108 and T143 but not in the HTR2B-positive T142 cells (Figure 3C). Extending the HTR2B promoter by 280 bp to position -710 (in HTR2B/-710)) partly rescued basal CAT activity in T97, T108 and T143 cells but had no influence in T142 cells. Extending further the HTR2B promoter to position -1297 resulted in a strong repression (7- to 12-fold repression) of the CAT activity relative to the level directed by the HTR2B/-138 construct in T97, T108 and T143 but not in T142 cells. Again, this repression was partly released upon transfection of the plasmid HTR2B/-2000 in T97, T108 and T143 cells. Collectively, these results indicate clearly that transcription of the HTR2B gene is under the control of two negative silencer elements: a strong one (designated as the distal silencer (Silencer D)) located between positions -710/-1297, and a weaker one (designated as the proximal silencer (Silencer P)) present between positions -138/-430 (Figure 3D). They also suggest that regulatory elements required to ensure basal expression of HTR2B are present between positions +96 and -138.

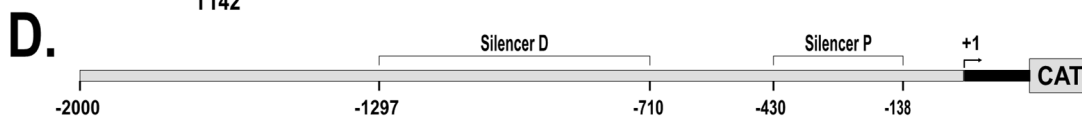
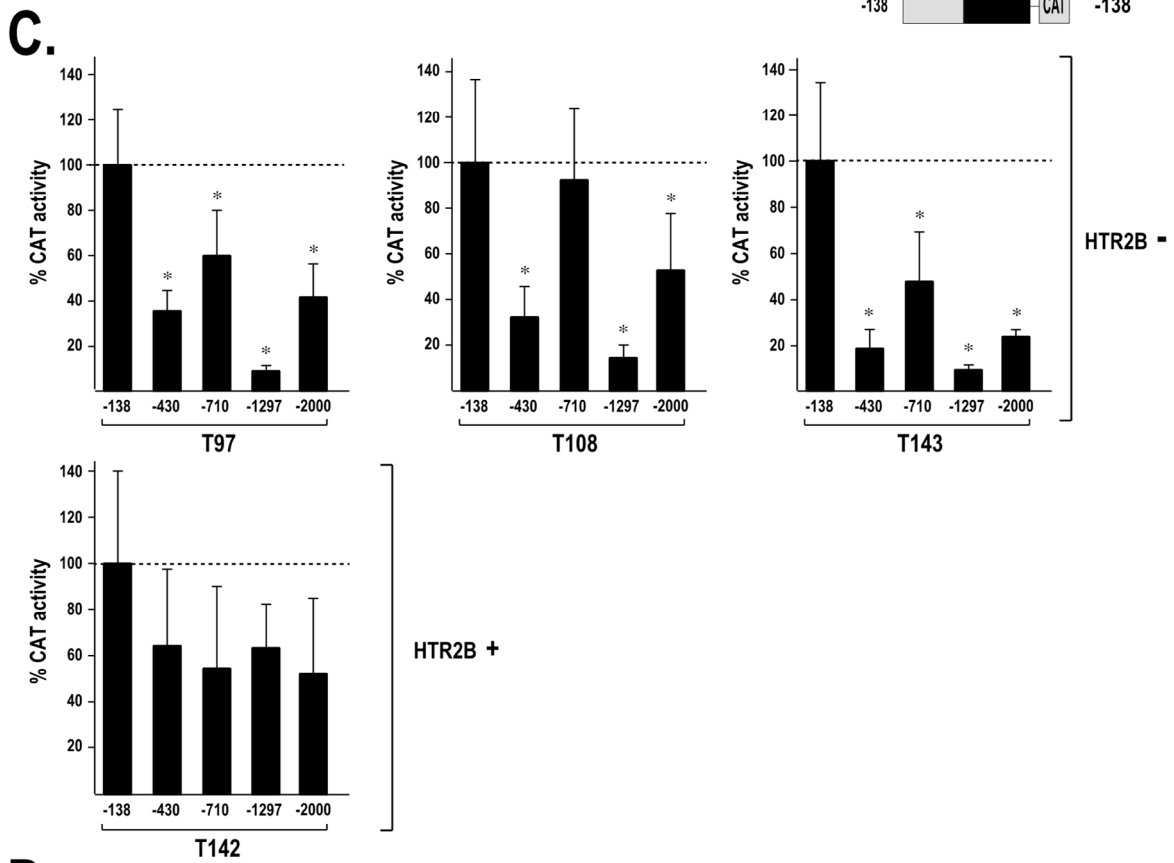
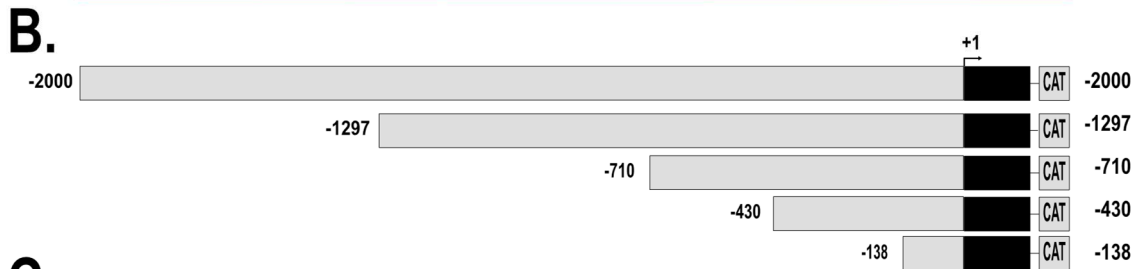
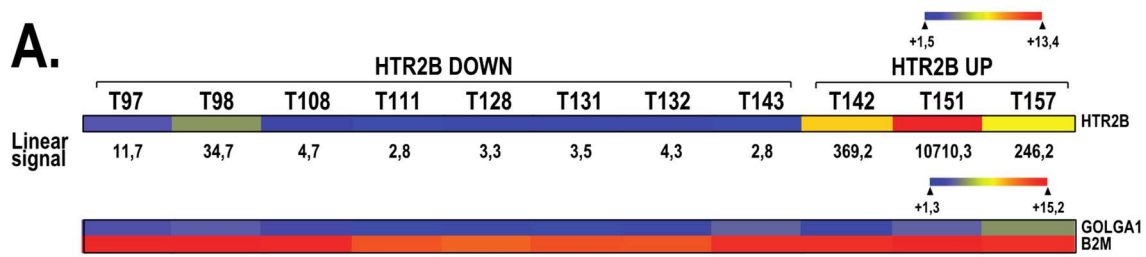


Figure 3

Figure 3. Transfection of the HTR2B gene promoter in UM cell lines.

A) Heatmap representation of HTR2B expression in UM cell lines. The color scale used to display the log₂ expression level values is determined by the Hierarchical clustering algorithm of the Euclidian metric distance between genes. A dark blue color corresponds to very low level of HTR2B gene expression whereas high levels appear in yellow/red. The values of the HTR2B linear signals are also provided. B) Schematic representation of recombinant constructs bearing the CAT reporter gene fused to various segments from the human HTR2B gene promoter. Numbers indicate position relative to the HTR2B theoretical mRNA start site (indicated by a curved arrow). C) CAT activities measured following transfection of the HTR2B constructs shown in panel A in the UM cell lines that express either low (HTR2B⁻; T97, T108 and T143) or high (HTR2B⁺; T142) levels of the HTR2B transcript. CAT activity is expressed relative to the level directed by the HTR2B/-138 construct. *: Values considered to be statistically significant from those obtained with the HTR2B/-138 construct (P value < 0.001). D) Schematic representation of both the proximal (Silencer P) and distal (Silencer D) silencers along the HTR2B promoter and 5'-flanking region based on the transfection results from panel B. Positions of the 5' end-point of each HTR2B/CAT construct is indicated.

3.3. Members from the NFI family bind to the HTR2B promoter and positively regulate its transcriptional activity in uveal melanoma

To assess whether UM cell lines express NFI *in vitro*, nuclear extracts were prepared from T97, T108, T142 and T143 cells and used in electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). A single, diffuse DNA-protein complex typical of NFI binding to DNA was observed upon incubation of nuclear proteins from all UM cell lines with a labeled probe bearing the high affinity NFI target site (Fig. 4A). Although equal amounts of nuclear proteins (5µg) were used for the assay, the extract from T108 cells yielded only a weak DNA-protein signal on gel whereas that from T142 generated the strongest shifted complex. Addition of either a 25- or 250-fold molar excess of the unlabeled NFI oligonucleotide, but not that of a double-stranded oligonucleotide bearing the target site for the unrelated transcription factor Sp1, entirely eliminated formation of the specific NFI complex (Figure 4B). The binding specificity was further demonstrated by the significant reduction of the NFI complex and the formation of a new supershifted complex (SSC) of low electrophoretic mobility upon addition of a polyclonal antibody that recognizes all NFI isoforms (Fig. 4B; NFI Ab).

To decipher which of the four NFI isoforms are expressed by our UM cell lines, nuclear proteins prepared from T97, T108, T142 and T143 UM cells were Western blotted using antibodies specific to the NFIA, -B, -C and -X isoforms. An antibody that can recognize all NFI isoforms (NFI Total) has also been used as a control. As shown on Figure 4C, T97, T142 and T143 cells express all four NFI isoforms, although to different levels (T97 primarily express both NFIA and NFIB whereas T142 and T143 cells predominantly express the NFIC isoform). On the other hand, T108 only expresses the NFIA and NFIX isoforms. The multiple bands detected for some of the NFI isoforms (particularly noticeable for both NFIA and NFIC) are most likely indicative of post-translational modifications occurring in some UM cell lines (for instance T97 and T108 for NFIA and T142 and T143 for NFIC).

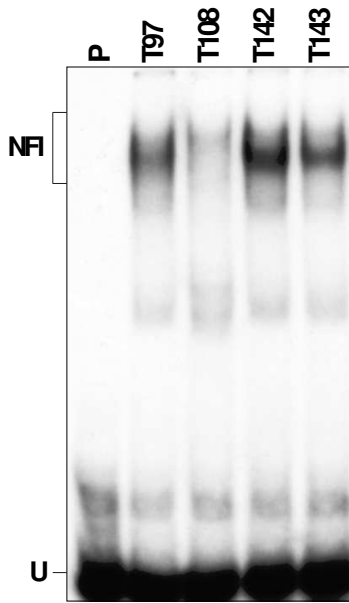
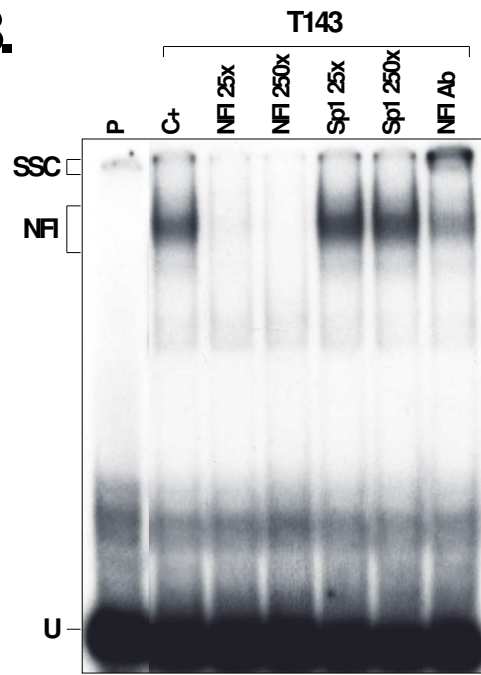
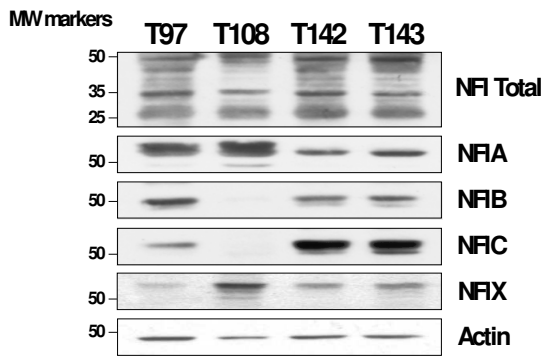
A.**B.****C.**

Figure 4

Figure 4. Expression of NFI in the UM cell lines. A) Nuclear proteins (5 μ g) obtained from the UM cell lines T97, T108, T142 and T143 were incubated with a double-stranded oligonucleotide, 5' end-labeled probe bearing the high affinity binding site for NFI. Formation of DNA-protein complexes was then monitored by EMSA. The position of the NFI DNA-protein complex is indicated along with that of the free probe (U). P: labeled probe without added proteins. B) Nuclear proteins from T143 cells were incubated with the NFI labeled probe either alone (C+) or in the presence of a 25- or 250-fold molar excess of unlabeled competitor oligonucleotides bearing the high affinity target site for either NFI or Sp1. When indicated (last track), a polyclonal antibody that can recognize all NFI isoforms (NFI Ab) has been added along with T143 nuclear proteins. The position of the DNA-protein complexes corresponding to NFI bound to the labeled probe is indicated as well as that of a supershifted complex (SSC) yielded by the addition of the NFI antibody. C) Western blot analysis of the NFIA, NFIB, NFIC and NFIX isoforms in the UM cell lines T97, T108, T142 and T143. UM cell nuclear extracts were also blotted using an antibody that can recognizes all four NFI isoforms (NFI Total). Actin expression was monitored as a normalization control.

The -710/-1297 distal silencer bears the highest number of putative NFI target sites identified along the HTR2B promoter and 5'-flanking sequence (10 out of 17; Figure 2A). We therefore examined the ability of each of the four NFI isoforms to interact with the HTR2B distal silencer element by EMSA. To that purpose, we 5' end-labeled a 278bp BglIII/BstXI restriction fragment bearing a large segment from the HTR2B sequence (from position -1037 to -1315; 7 NFI sites) and incubated this labeled probe with bacterially produced, recombinant NFIA, NFIB, NFIC and NFIX proteins prior to analysis of the DNA-protein complexes by EMSA. As shown on Figure 5A, incubation of each of the recombinant NFI isoforms with the labeled probe bearing the prototypical, high affinity NFI binding site used in Figure 4 yielded a typical NFI-protein complex on the EMSA. However, when the NFI labeled probe is replaced by the HTR2B 278bp *Silencer D* labeled probe, only the NFIC and NFIX isoforms could yield a shifted DNA-protein complex on gel (Figure 5B; the position of the complexes yielded by NFIC and NFIX is different from that obtained in panel A because of the variation in the size of the labeled probe used (26 bp in panel A and 278 bp in panel B) which also required a much longer time of gel migration in panel B in order to bring the free probe to the bottom of the gel). The NFIC and NFIX isoforms have been shown to be expressed at both the mRNA (Figure 2B) and protein (Figure 4C) level in most of our UM cell lines.

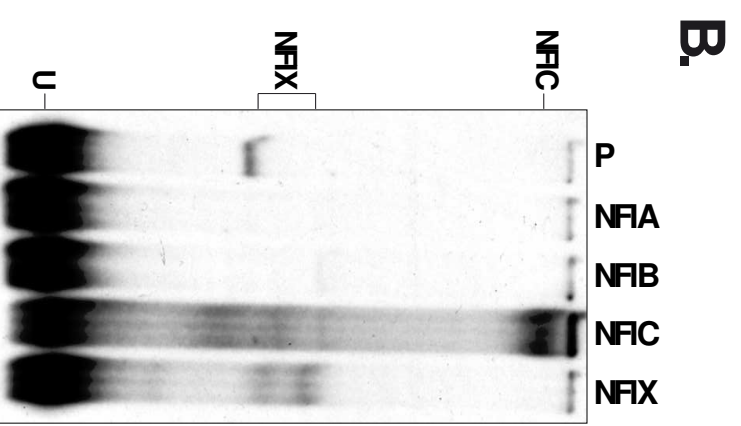
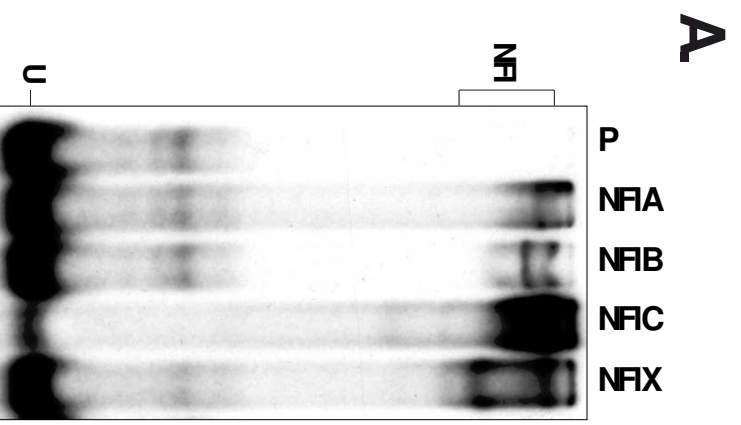


Figure 5

Figure 5. Differential binding of the NFI isoforms to the HTR2B silencer D region. A) The high affinity NFI labeled probe used in Figure 4A was incubated with equal amounts of bacterially produced, recombinant NFIA, NFIB, NFIC and NFIX proteins prior to analysis of the DNA-protein complexes by EMSA (the reaction mix was loaded on a 8% native polyacrylamide gel run at 40 V for 18 hours). The position of the various NFI complexes is shown along with the position of the free probe (U). P: labeled probe without added proteins. B) Same as in panel A except that a 278bp BglII/BstXI restriction fragment bearing most of the HTR2B distal silencer sequence from position -1037 to -1315 was 5' end-labeled at its BglII site and used as the probe in the EMSA (the reaction mix was loaded on a 6% native polyacrylamide gel run at 80 V for 18 hours). The position of both the NFIC and NFIX DNA-protein complexes is indicated.

In order to evaluate whether binding of NFI to the target sites identified in the HTR2B gene promoter and 5'-flanking sequence function as activators or repressors of gene transcription, we identified those whose sequence is the closest from the prototypical NFI target site [44, 45] and used site-directed mutagenesis combined with transfection experiments to evaluate their contribution to the HTR2B promoter activity. Four putative target sequences (located at positions -9, -210, -1249 and -1275 relative to the HTR2B mRNA start site) with identities to the prototypical NFI sequence ranging from 12 to 14 preserved nucleotides (relative to the 15 residues of the prototypical NFI site) were therefore chosen (Figure 6A). Each of these NFI sites was mutated in the HTR2B promoter-bearing plasmids, either individually or in combination, and the derivative constructs transfected along with their parental unmutated constructs in T108. As indicated on Figure 6C, mutation of the -9 NFI site in the context of the complete promoter (in the plasmid -2000/NFI(-9)) yielded a near 7-fold reduction in T108 cells when compared to its parental vector HTR2B/-2000 (considered as 100%). On the other hand, mutating either the -210 (in -2000/NFI(-210)) or the -1249 (in -2000/NFI(-1249)) NFI site reduced CAT activity by only 40% and 27% in these cells, respectively. Interestingly, mutation of both the -9 and -210 NFI sites in the plasmid -2000/NFI(-9,-210) caused a dramatic reduction of the CAT activity to only 6% (17-fold repression) relative to the level driven by the parental, unmutated plasmid -2000/HTR2B. Mutating both the -1279 and -9 sites in -2000/NFI(-9,-1249) did not reduce promoter activity beyond the level of the -9 NFI mutant alone (18% vs 15%, respectively) suggesting that the regulatory impact of the -1275 NFI site is negligible. Similarly, mutating the -1275 NFI site along with both the -9 and -210 sites in plasmid -2000/NFI(-9,-210,-1275) did not reduce further the CAT activity (5% of the level directed by the parental plasmid -2000/HTR2B) than the level observed with the plasmid -2000/NFI(-9,-210). Mutation of all four NFI sites in -2000/NFI(-9,-210,-1249, -1275) reduced CAT activity to very much the same level (9%) as that yielded by the -9/-210 double mutant (6%). These results suggest that most of the positive influence exerted by the TF NFI is mediated by the -9 site whereas the three remaining NFI sites only exert a marginal influence on the HTR2B promoter under the conditions used.

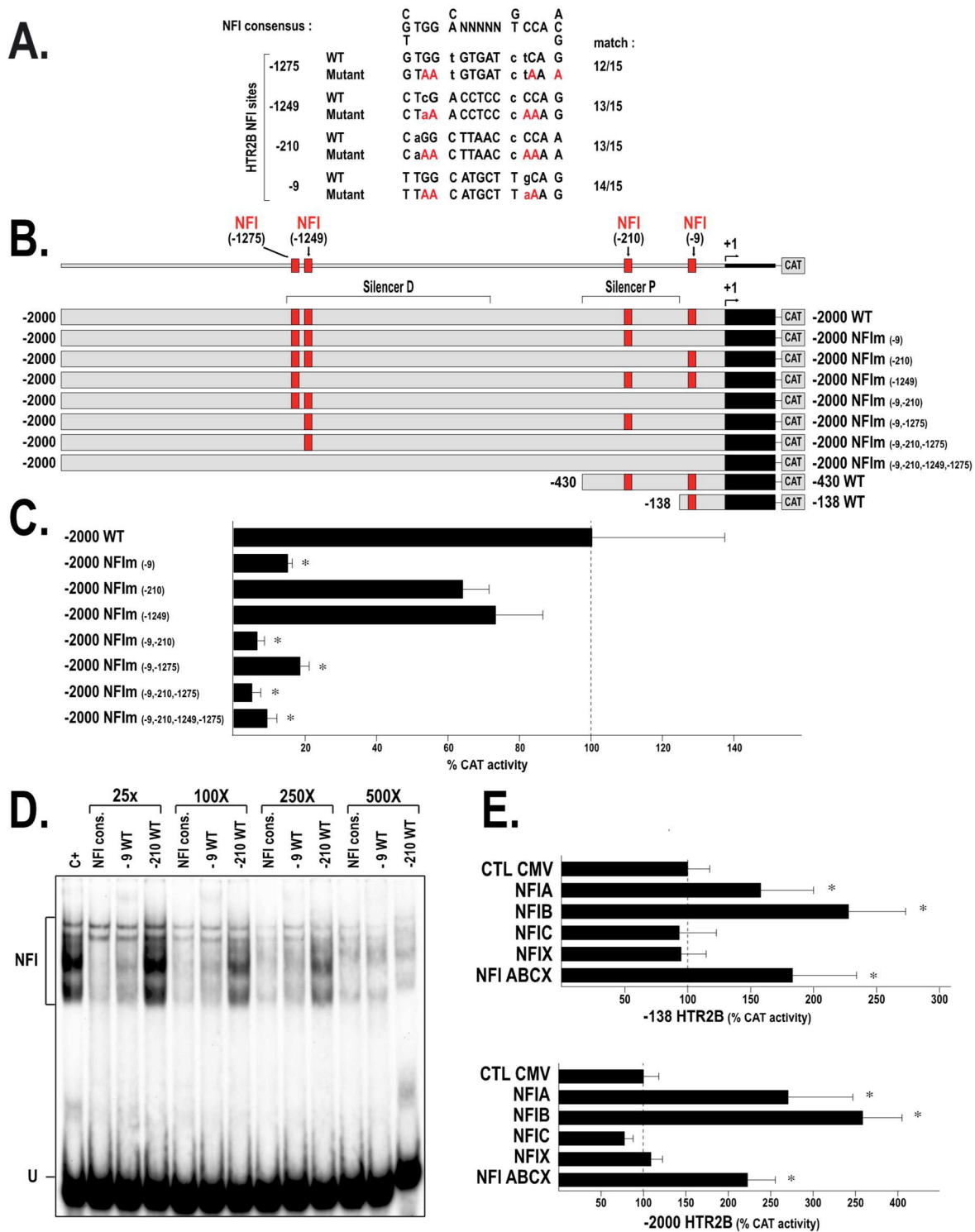


Figure 6

Figure 6. Transfection of the mutated NFI constructs in the UM cell lines. A) The DNA sequences of four NFI target sites identified in the HTR2B regulatory region at position -9, -210, -1249 and -1275 are aligned with the high affinity consensus sequence for NFI. The nucleotides preserved between each of the HTR2B NFI sites and the NFI consensus sequence (all shown in capital letters) are indicated (match) along with those that have been selected for site-directed mutagenesis (mutations are shown in red). B) Schematic representation of the HTR2B/-2000, HTR2B/-430 and HTR2B/-138 wild-type (WT) parental plasmids along with their derivatives that have been mutated in one or more of the NFI sites shown in panel A (the NFI sites preserved in each construct are shown in red). C) CAT activities measured following transfection of the HTR2B constructs from panel B in T108 cells. CAT activity is expressed relative to the level directed by the parental construct HTR2B/-2000. *: Values considered to be statistically significant from those obtained with the corresponding unmutated, parental construct (P value < 0.001). D) Nuclear proteins (15 μ g) from 293T cells were incubated with the consensus NFI labeled probe either alone (C+) or in the presence of a 25-, 100-, 250- or 500-fold molar excess of unlabeled competitor oligonucleotides bearing the high affinity prototypical NFI site (NFI cons.) or the NFI sites identified at position -9 (-9WT) or -210 (-210WT) in the HTR2B gene promoter. The position of the NFI complexes is indicated as well as that of the free probe. E) The HTR2B/-2000 and HTR2B/-138 plasmids were co-transfected in T108 cells with expression plasmids encoding high levels of each of the NFI isoforms (either individually or in combination) or with the pLenti6V5A empty vector (CtICMV). CAT activities were measured and expressed relative to the level directed by the parental constructs HTR2B/-2000 and HTR2B/-138. *: Values considered to be statistically significant from those obtained with the corresponding unmutated, parental construct (P value < 0.001).

Competitions in EMSA using increasing amounts (25- to 500-fold molar excesses) of unlabeled double-stranded oligonucleotides bearing the DNA sequence of either the -9 or -210 HTR2B NFI site revealed that the HTR2B -9 NFI oligonucleotide was as efficient as the prototypical NFI site to compete for the formation of the NFI DNA-protein complex yielded by the nuclear extract prepared from 293T cells (which has been used as the source of proteins as we have found them to express high levels of nuclear NFI; Figure 6D). On the other hand, the -210 NFI oligonucleotide was 20-times less effective (as revealed by the ratio of the cpm from the shifted NFI DNA-protein complex over the total cpm counts) than the -9 oligonucleotide at competing for the formation of the NFI complex. This is consistent with the fact that the -9 NFI site is divergent from the consensus NFI site by only one nucleotide whereas the -210 site diverges from the consensus by 2 nucleotides (Figure 6A).

We next transfected the wild-type HTR2B/-138, HTR2B/-430 and HTR2B/-2000 constructs in T108 cells along with expression vectors encoding each of the NFI isoforms. As shown on Figure 6E, the basal HTR2B/-138 plasmid (this plasmid was selected because it is deleted from the -210 NFI site and therefore bears only the -9 NFI site) responded to both NFIA (increase to $168 \pm 33\%$) and NFIB (increase to $227 \pm 46\%$) in T108 cells but not to NFIC and NFIX. Its activity also increased (to $184 \pm 52\%$) when all four NFI isoforms were co-transfected along with HTR2B/-138. As for HTR2B/-138, the HTR2B/-2000 plasmid responded very efficiently to both NFIA (increase to $286 \pm 61\%$) and NFIB (increase to $358 \pm 57\%$) but not to NFIC and NFIX whereas its activity also increased (to $220 \pm 35\%$) when co-transfected along with all four NFI isoforms.

3.4. The transcription factor RUNX1 binds to the HTR2B promoter and negatively regulate its transcriptional activity in uveal melanoma

As NFI does not appear to significantly contribute to the repressive influence mediated by the HTR2B distal silencer, we next exploited *in vitro* DMS methylation interference footprinting combined to EMSA in order to determine whether transcription factors other than NFI can bind this area from the HTR2B gene. Again, we 5' end-labeled the 278bp BglIII/BstXI restriction fragment bearing most of the HTR2B distal silencer sequence (from position -1037 to -1315) and partly methylated the labeled DNA with dimethylsulfate (DMS). This methylated, labeled probe was then incubated with nuclear proteins from T143 UM cells and the DNA-protein complexes analyzed by EMSA. As shown on Figure 7A, incubation of T142 nuclear proteins with the 5'-end labeled, DMS methylated 278bp probe yielded three distinct DNA-protein complexes on gel (S1, S2 and S3). Interestingly, the methylated G residues that interfere with binding of the nuclear proteins yielding the S1, S2 and S3 complexes were the same (Gs at position -1125, -1126 and -1128) for each of them (Figure 7B). Detailed analysis of the DNA sequence bearing the protected G residues revealed that they were all located into one of the nine putative target sites identified for the transcription factor RUNX1 (Figure 2A and Supplementary Figure 1). This HTR2B distal silencer DNA sequence bears no target site for other TFs besides RUNX1, as revealed by its analysis using the TFSEARCH program. We next derived a 28bp, double-stranded oligonucleotide bearing the DNA sequence of the HTR2B RUNX1 site identified by DMS methylation interference and used it as a labeled probe in EMSA to monitor binding of this TF in nuclear extracts from our UM cell lines. Consistent with the EMSA results from Figure 7A, nuclear extracts from T97, T108, T142 and T143 cells all yielded multiple DNA-protein complexes when incubated with the RUNX1 labeled probe, although much weaker signals were observed with the extract from T108 cells (C+; Figure 8A). Addition of a 100-fold molar excess of unlabeled RUNX1 oligonucleotide entirely prevented formation of the RUNX1 complexes whereas an unlabeled RUNX1 derivative (RUNX1-mut) in which the three G residues identified by DMS footprinting were mutated into adenines could not, thereby demonstrating the specificity for the formation of the multiple RUNX1 complexes seen on the EMSA. A DNA-protein complex of very low electrophoretic mobility on gel was also

observed on the EMSA for all UM cell lines (arrowhead on Figure 8A). However, the protein yielding this complex could be competed both by the wild-type and mutated RUNX1 oligonucleotides indicating clearly that besides RUNX1, another nuclear protein expressed by all UM cell lines can bind the 28bp RUNX1 oligonucleotide used as a probe.

EMSA were repeated again by substituting the 28bp RUNX1 labeled probe with the 278bp BgIII/BstXI labeled probe used for DMS footprinting. Incubation of nuclear proteins from T143 cells with the 278bp labeled probe from the HTR2B distal silencer yielded the formation of multiple, diffuse complexes on gel (C+; Figure 8B). Addition of a 100-fold excess of unlabeled RUNX1 oligonucleotide reduced formation of the RUNX1 complexes by approximately 60% whereas the mutated RUNX1-mut oligo had no impact. Interestingly, competing with unlabeled oligonucleotides bearing the high affinity target site for either NFI or AP-1 also reduced formation of the RUNX1 DNA-protein complexes on gel (compare the results from lanes 5 and 6 with that of lane 2; Figure 8B) suggesting that both NFI and AP-1 likely contribute to the formation of the complexes seen in lane 2. Addition of both the RUNX1 and AP-1 unlabeled oligonucleotides together in the reaction mix entirely prevented the formation of the DNA-protein complexes yielded by the T143 nuclear extract (compare lane 9 with lane 2). Analysis of RUNX1 mRNA expression by microarray (Figure 8C) and qPCR (Figure 8D) confirmed that T97 and T108 UM cells express the highest and lowest level of the RUNX1 transcript, respectively. Consistent with the results of the EMSA from panel A, the UM cell lines T97 and T142 were found by Western blot to express high levels of the RUNX1 protein whereas T143 and T108 express moderate and low levels of that protein, respectively (Figure 8E). Transfection of a derivative from HTR2B/-2000 that has its RUNX1 site mutated (-2000/RUNX1m) in both T108 and T142 UM cells resulted in a 2.8- and 2.7-fold increase in CAT activity, respectively, relative to the level directed by the wild-type parental construct (Figure 8F) indicating that RUNX1 functions as a repressor of HTR2B gene transcription in these cells.

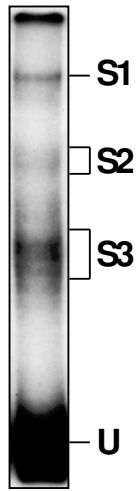
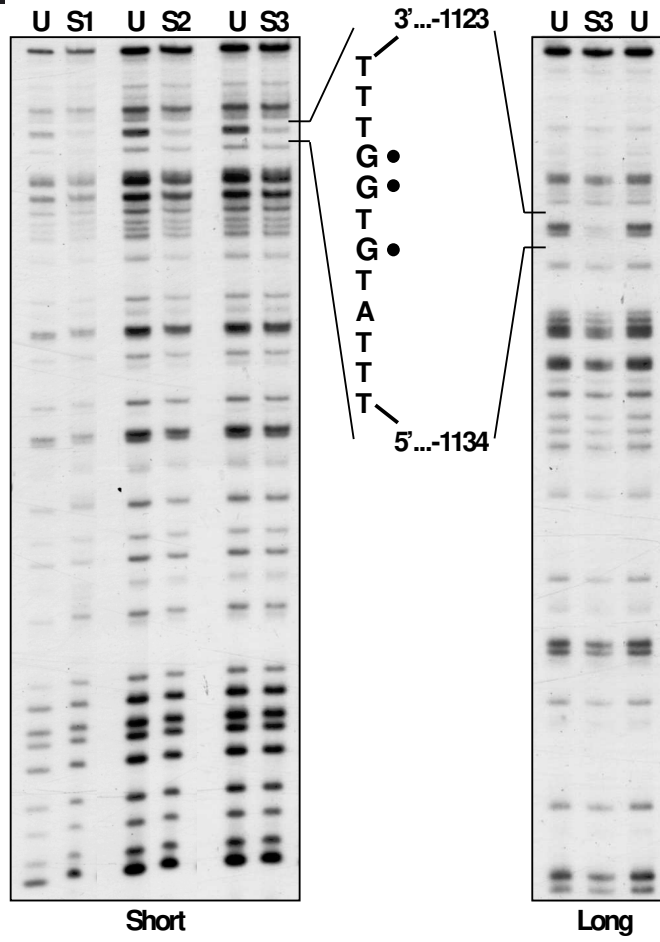
A**B**

Figure 7

Figure 7. *In vitro* DMS footprinting of RUNX1 binding to the HTR2B promoter.

A) The 278bp -1037/-1315 BglII/BstXI restriction fragment bearing most of the HTR2B distal silencer sequence used in Figure 5B was 5' end-labeled at its BglII site, methylated with DMS and then incubated with 30 μ g nuclear proteins from T142 cells before separation of the DNA/protein complex by EMSA. B) Both the labeled DNA-protein complexes (S1, S2 and S3) and the unbound fraction of the probe (U) from panel A were isolated and further treated with piperidine before being analyzed on a 8% polyacrylamide sequencing gel. Labeled DNA samples were separated at 1800 V for either 90 (short run) or 180 min (long run) to improve readability of the sequence over a longer stretch of DNA. The DNA sequence from the HTR2B promoter that includes the protected G residues (protected G residues are identified by black dots) is indicated along with its positioning relative to HTR2B mRNA start site.

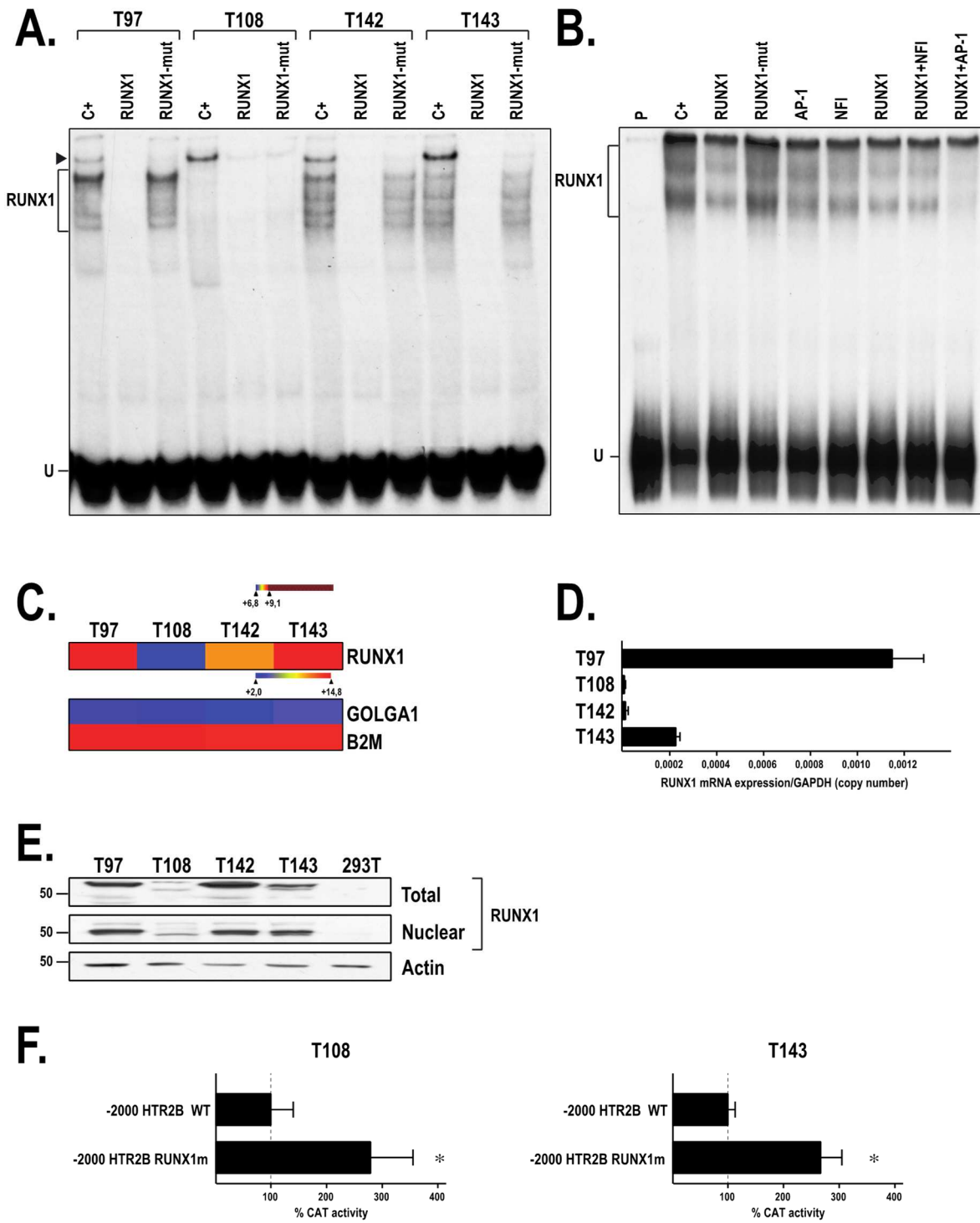


Figure 8

Figure 8. Expression of RUNX1 in the UM cell lines. A) Nuclear proteins (20 µg) obtained from the UM cell lines T97, T108, T142 and T143 were incubated with a 5' end-labeled, 28bp oligonucleotide bearing the DNA sequence of the RUNX1 site identified in the HTR2B distal silencer, either alone (C+) or in the presence of a 500-fold molar excess of unlabeled RUNX1 or its mutated derivative (RUNX1-mut). Formation of DNA-protein complexes was then monitored by EMSA. The position of the RUNX1 DNA-protein complexes is indicated along with that of the free probe (U). B) Nuclear proteins from T143 cells were incubated with the 5' end-labeled 278bp -1037/-1315 BglII/BstXI restriction fragment from the HTR2B distal silencer either alone (C+) or in the presence of a 100-fold molar excess of unlabeled RUNX1 or RUNX1-mut oligonucleotides, or with oligonucleotides bearing the high affinity target sites for NFI and AP-1. The position of the RUNX1 DNA-protein complexes is indicated. Expression of RUNX1 was monitored at the transcriptional level in T97, T108, T142 and T143 cells by microarrays (panel C) and qPCR analyses (panel D). E) Western blot analysis of RUNX1 in the UM cell lines T97, T108, T142 and T143. Actin expression was monitored as a normalization control. F) CAT activities measured following transfection of the parental HTR2B/-2000 construct or its RUNX1-mutated derivative (-2000/RUNX1m(-1175)) in T97 and T143 UM cells. CAT activity is expressed relative to the level directed by the parental construct HTR2B/-2000. *: Values considered to be statistically significant from those obtained with wild-type HTR2B/-2000 (P value < 0.001).

Table 1. *In vivo* detection of NFI and RUNX1 binding to the HTR2B basal promoter and 5' -flanking region by ChIP-qPCR

UM cell line	T97	T108		T142		T143	
Immunoprecipitated TF	NFI*	RUNX1*	NFI*	RUNX1*	NFI*	RUNX1*	NFI*
HTR2B promoter region							
-123/+83 (-9 NFI)	2 766 666	158	1 082	8	5 260	6	554 945 054
-387/-133 (-210 NFI)	19 814	43	14 938 271	93	1 682	515	5 586 956
-1420/-1229 (-1249 and -1275 NFI)	3 533	1 596 666	132 564	4	28 220	8 458	12
-1234/-1022 (-1127 RUNX1)	1 882 926	760 975 609	1 067	1	66	2 368 750	34 982
							1 269 624

Data are presented as fold changes of NFI or RUNX1 enrichment (relative to input chromatin) over IgG enrichment (relative to input chromatin). *: x10⁻¹⁰

3.5. Both RUNX1 and NFI binds *in vivo* to the HTR2B promoter in uveal melanoma

Binding of NFI and RUNX1 to either the basal promoter or the distal silencer of the HTR2B gene was next examined *in vivo* by ChIP-qPCR analyses. The chromatin immunoprecipitated in each cell line by the NFI and RUNX1 antibodies was quantified by qPCR. As a negative control, the sonicated chromatin was also immunoprecipitated with an anti-IgG antibody. Data were normalized to both the input chromatin and the IgG signal. ChIP assays were performed on cross-linked chromatin isolated from the UM cell lines T97, T108, T142 and T143. The pairs of primers used for the qPCR analyses were selected to amplify the -123 to +83 (-9 NFI), -387 to -133 (-210 NFI), -1420 to -1229 (-1249 and -1275 NFI) and -1234 to -1022 (-1127 RUNX1) areas from the HTR2B gene (Supplementary Table 1). Consistent with the transfection results, a strong enrichment of the HTR2B basal promoter DNA segment was obtained when the chromatin was immunoprecipitated with an antibody that recognizes all NFI isoforms (Table 1). Indeed, the basal promoter area bearing the -9 NFI site was found to be occupied by NFI in all four UM cell lines (enrichment of the amplified region in T97, T108, T142 and T143 was defined as 'strong', 'weak', 'weak' and 'very strong', respectively). A similar scenario was also observed for the -210 NFI site which was found to be occupied by NFI in all UM cells with a clear predominance for both T108 and T143 cells ('weak', 'very strong', 'weak' and 'strong' enrichment of the amplified region in T97, T108, T142 and T143, respectively; Table 1). The area bearing both the -1249 and -1275 NFI sites, which is also very close from the footprinted RUNX1 site (this area also bears two putative RUNX1 sites at positions -1280 and -1295), was 'moderately' bound by NFI in T97, T108 and T142 cells. Interestingly, and unlike the two previous promoter proximal areas that could not bind the RUNX1 TF *in vivo*, the -1420/-1229 area could efficiently bind RUNX1 in all but T108 UM cells ('strong', 'very weak', 'weak' and 'weak' enrichment of the amplified region in T97, T108, T142 and T143, respectively; Table 1). Finally, bindings of RUNX1 ranging from strong (in T142 and T143) to very strong (in T97) were observed in all but T108 UM cells when the area bearing the footprinted -1127 RUNX1 site was amplified using the -1234/-1022 specific primers (Table 1). Binding of NFI to this particular region could also be observed in T97 (strong), T108 (weak) and T143

(intermediate) cells. We conclude from these results that both NFI and RUNX1 cell-specifically interact *in vivo* with the promoter and 5'-flanking region of the HTR2B gene.

4. DISCUSSION

Malignant uveal melanoma (UM) is the most common primary intraocular tumor in the adult population. Despite that it remains a rare disease (4 to 6 per million individuals), what makes UM so insidious is its propensity to remain dormant under the form of micro-metastases for as much as 12 to 15 years after enucleation before they progress into a clinically detectable metastatic disease. One particular characteristic that is clearly becoming a discriminating mark in order to identify those primary UM tumors at risk of progressing toward the metastatic disease is the detection of high levels of the HTR2B mRNA transcript [9, 10, 46] However, no study has ever explored the mechanistic of this deregulated HTR2B gene expression at the transcription level. In this study, we investigated, both *in vitro* and *in vivo*, the molecular mechanisms that may contribute to the abnormally elevated expression of the HTR2B gene in UM. We demonstrated that HTR2B gene transcription is ensured in part by the binding of the transcription factors NFI and RUNX1 to distinct target sites within the basal promoter and upstream silencer elements. NFI was found to exert a strong positive regulatory influence on HTR2B gene expression whereas RUNX1 acted as a repressor of that gene.

Transfection analyses revealed that alternating positive and negative regulatory regions are present along the HTR2B gene promoter and 5'-flanking region. Our search for putative target sites within these regulatory sequences revealed the presence of a particularly high number of target sites for the transcription factor NFI. This family of TFs comprises four isoforms (NFIA, -B, -C and -X) that have been reported to act either as activators or repressors of gene expression [47]. Microarrays, qPCR and Western blot analyses revealed that our UM cell lines express different combinations of NFI proteins that exert their regulatory influences by interacting with multiple target sites along the HTR2B gene regulatory sequences. In each of the gene systems we studied so far, NFI turned out to be a potent repressor of those target genes [39-41, 48]. However, in the case of HTR2B, the members of this family clearly turned out to be activators of that gene as site-directed mutation of both the -9 and -210 NFI sites almost completely

abolishes transcription directed by the HTR2B promoter. Overexpression of the human NFI isoforms in T108 cells revealed that NFIA and NFIB acted positively on the transcription directed by the HTR2B gene promoter and 5'-flanking sequence whereas both NFIC and NFIX had no impact under the conditions used. The stronger positive influence that both NFIA and NFIB exerted on the HTR2B/-2000 promoter activity (2.9- and 3.6-fold increase, respectively) relative to its impact on the HTR2B/-138 basal promoter construct (1.7- and 2.3-fold increases, respectively) is consistent with the presence of additional NFI sites along the -2000 HTR2B 5'-flanking sequence.

As stated above, T108 UM cells distinguishes themselves from the other cell lines by their clearly reduced NFI binding capacity in EMSA (Figure 4A) which likely results from the absence of both the NFIB and NFIC isoforms (Figure 4C). However, the lack of NFIB and NFIC proteins in T108 UM cells does not correlate with their corresponding mRNA, which are abundantly expressed in these cells (Figure 2B). Many different mechanisms may be raised to explain why expression of any given protein does not match that of its corresponding mRNA transcript as both mRNA translation and the protein translated from the mRNA are known to be heavily regulated in any given cell by mechanisms, such as glycosylation, phosphorylation, ubiquitinylation, that will in turn alter the half-life of that protein. The NFI-C2 isoform (a splice variant of NFIC) has been reported to be subjected to proteosomal degradation through a Jak2-dependent tyrosine phosphorylation mechanism [49]. In addition, glycosylation of NFI has been postulated to delay its degradation by the proteasome in human skin keratinocytes [50]. One particularly interesting aspect of our work was the demonstration that not all the NFI isoforms could bind to the distal silencer elements. Indeed, although all four recombinant NFI isoforms could bind with varying affinities to the consensus NFI site in EMSA, binding was only observed with the NFIC and NFIX isoforms when the NFI site-bearing distal silencer element is used as the labeled probe (Figure 5). This particularly interesting result suggests that besides their ability to recognize the prototypical NFI site [47, 51], specific NFI isoforms likely possess the ability to discriminate amongst NFI degenerated DNA target sites. Such an interesting

characteristic would confer the ability to differentially regulate different target genes within a single cell by target site-selection recruitment of different NFI isoforms.

As binding of NFI to the distal silencer apparently could not account for the negative regulatory influence directed by this element, we kept searching for other TFs that may repress HTR2B gene expression by interacting within the HTR2B distal silencer. The use of both EMSA and DMS methylation interference footprinting allowed us to demonstrate the interaction of RUNX1, a transcription factor widely expressed in hematopoietic cells and indispensable for the establishment of definitive hematopoiesis, to a target site (at position -1127) located within the distal silencer. That DNA-protein complexes with very distinctive electrophoretic mobilities on gel all protected the same G residues in DMS methylation interference footprinting suggest that a single protein (for instance RUNX1) establishes contact with a specific target site in the HTR2B distal silencer (at position -1127) and that its interaction with other nuclear proteins (through protein-protein interactions) reduces its electrophoretic mobility to yield the multiple band pattern seen in the EMSA (Figure 7A and Figure 8A and B). RUNX1 has been reported to physically interact, or synergize with a variety of other factors, such as Ets-1 [52], C/EBP [53], c-Myb [54], and most interestingly, AP-1 [55, 56]. This is consistent with the results from the EMSA shown on Figure 8 that clearly suggests the cooperative binding of both the RUNX1 and AP-1 transcription factors to/or nearby the -1127 RUNX1 target site identified in the HTR2B distal silencer. Indeed, three putative AP-1 target sites with a 6/7 match to the AP-1 consensus site (5'-TGAG/CTCA-3') were identified nearby the RUNX1 site in the HTR2B distal silencer at positions -1225/-1219 (5'-TGcCTCA-3'), -1074/-1068 (5'-aGACTCA-3') and -1021/-1015 (5'-TGAGcCA-3'), the closest being located at only 49 nucleotides downstream from the RUNX1 site. RUNX1 has also been reported to bind either as a monomer or a dimer to the GM-CSF enhancer, which also cause the formation of multiple bands on the EMSA [57]. Besides AP-1, many RUNX1-regulated genes have been reported to be co-occupied also by the TF MyoD during muscle regeneration [58]. It is interesting to point out that low to high expression of MyoD is observed in our UM cell-lines and that two putative target sites for MyoD have

been identified 65bp downstream from the -1127 RUNX1 site (Supplementary Figure 1).

We can't rule out the possibility that RUNX1 may interact with other putative target sites along the 5' flanking region of the HTR2B gene, as other such sites have been identified using the TFSEARCH program. Two of these degenerated RUNX1 sites have been identified by the program in the basal promoter region (at positions -86 and -205). However, neither are likely functional at binding RUNX1 as none of the regions bearing these two sites could be efficiently enriched in qChIP *in vivo* analyses (Table 1; promoter regions -123/+83 and -387/-133). Furthermore, we demonstrated that the area from the HTR2B gene that also contains the -1127 RUNX1 site footprinted in the present study was dramatically enriched by this TF in all but T108 UM cells (Table 1; promoter region -1234/-1022), which is consistent with the much reduced expression of this TF at the protein level in this cell line (Figure 8E). Interestingly, the area bearing both the -1249 and -1275 NFI sites located immediately upstream of that containing the -1127 footprinted RUNX1 site was considerably enriched by immunoprecipitation of RUNX1 in qChIP analyses in all but T108 UM cells (Table 1; promoter region -1420/-1229). Interestingly, two additional RUNX1 putative target sites were also identified upstream of the site footprinted in this study, at positions -1278 and -1290. Our qChIP results therefore suggest that besides the -1127 site, RUNX1 may also bind to one (or both) of these additional target sites *in vivo*.

Identifying RUNX1 as a regulator of HTR2B gene expression in UM cancer cells is particularly relevant to our study in that deregulation of this TFs appears to be a characteristic of many types of cancers, besides acute leukemia (reviewed in [59]), including human colorectal [60], prostate [61], endometrial, ovarian [62], and human skin and oral squamous cell carcinomas [63]. Interestingly, Recouvreux et al. have recently demonstrated a physical interaction between the tumor suppressor Foxp3 and Runx1 that suppresses the trans-activating properties of Runx1 and suggested that any disruption in this equilibrium in favor of Runx1

(which is viewed as a tumor enhancer based on their results) may contribute to breast cancer development [64]. It should prove interesting to examine if Foxp3 is also expressed in UM cells and define whether the multi-band pattern observed in the EMSA for Runx1 may also be accounted for, at least in part, by a direct physical interaction between Runx1 and Foxp3. Meanwhile, it may help solve a particularly puzzling result from our study in that the transfection of the RUNX1 mutated HTR2B promoter in T143 cells yielded barely the same increase in reporter gene expression than when transfected in T108 cells (2.7- vs 2.8-fold increase, respectively), despite that the former cell line expresses levels of RUNX1 at the protein level much higher than the latter. These results suggest that a yet unidentified co-repressor (such as Foxp3) rather than RUNX1 itself, must be the limiting factor in the repression mediated by this TF. Defining a putative function for the inhibition of Runx1 by Foxp3 in the pathogenesis of uveal melanoma should certainly prove a promising avenue.

5. CONCLUSIONS

The present study highlighted the important contribution of the transcription factors NFI and RUNX1 to the abnormal expression of the HTR2B gene in uveal melanoma. The fact that deletion of the RUNX1 gene provided evidence that its encoded protein is not essential for normal skin and oral epithelium homeostasis and that complete disruption of the RUNX1 gene in mice had only mild effects on the mouse physiology [65, 66] position Runx1 (and also Foxp3) as a very promising therapeutic target in the treatment of UM.

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Solange Landreville (CUO-Recherche, CHU de Québec) for providing some of the UM microarray annotation files whose data were used in this study.

7. FUNDING

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to S.L.G. (grant #138624-2012). The Québec Ocular tissue bank and the Uveal Melanoma Infrastructure are financially supported by the Réseau de recherche en santé de la vision from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS).

Supplementary Figure 1. DNA sequence of the human HTR2B promoter and 5' flanking region

DNA sequence of the human HTR2B gene promoter that depicts the position of the predicted mRNA start site (red arrow). Curved blue arrows with numbers above (-2000HTR2B, -1297HTR2B, etc...) denote the 5' position of the HTR2B promoter segment cloned into pCATbasic and used for transfection. Sequence positions indicated on the left are relative to the predicted mRNA start site. Brackets indicate the position of each putative transcription factor target site identified by the TFSEARCH program. The areas covered by the primers used for ChIP-Seq analyses are indicated in red and green. The mutated oligonucleotides used for site directed mutagenesis of the NFI sites are also shown.

Supplementary Table 1. DNA sequence of the primers and double-stranded oligonucleotides

Primers used for qPCR analyses

Gene	Forward Primer (5'-3') Reverse Primer (5'-3')	Genebank #
HTR2B	TCTTTTCAACCGCATCCATCA TGCTGTAGCCCGTGAGTTATA	NM_000867
NFIA	CAGGTGTGATCCTCCTTGAG TTAACTGCTGACTGCTGAACC	NM_005595
NFIB	TCCTGCCAAGAATCCTCCAG TTGGTGGAGAAGACAGAGACC	NM_001282787
NFIC	CGCACACACTCAGGAGGAA AGGCGGAGAGGAGATGAATAA	NM_205843
NFIX	TCTGGAATGTGACGGAGCTG CTGTCATCGATGGACTTGGG	NM_002501
RUNX1	GCAACGGGAAATGTGGTCCT GGAGAGAGGGTTCTGGGAT	NM_001754
GAPDH	AAGGTCGGAGTCAACGGAT GGAAGATGGTGTATGGGATTTC	NM_002046

Oligonucleotides used as labeled probes or competitors in the EMSAs

Oligonucleotide	Top strand (5'-3') Bottom strand (5'-3')
AP-1	GATCCCCGCGTTGAGTCATTGCCTC GATCGAGGCGAATGACTCAACGCGGG
NFI	TTATTTTGGATTGAAGCCAATATGAG CTCATATTGGCTTCAATCCAAAATAA
RUNX1	GATCGGCTAATTTATGTGGTTTTTTTTGTAGA GATCTCTACAAAAAAAACCACATAAATTAGCC
RUNX1 Mutant	GATCGGCTAATTTATTTTTTTTTTTTTGTAGA GATCTCTACAAAAAAAATAAATTAGCC
-9 HTR2B NF1	GATCAACCTCCTTGGCATGCTTGCAGCTATACAA GATCTTGATAGCTGCAAGCATGCCAAGGAGGTT
-9 HTR2B NF1 Mutant	GATCAACCTCCTTAACATGCTTAAAGCTATACAA GATCTTGATAGCTTTAAGCATGTTAAGGAGGTT
-210 HTR2B NF1	GATCAACAGCTCAGGCTTAACCCAAAACAAAAC GATCAGTTTTGTTTGGGGTTAAGCCTGAGCTGTT
-210 HTR2B NF1 Mutant	GATCAACAGCTCAAACTTAACCAAAAACAAAAC GATCAGTTTTGTTTTGGTTAAGTTTGAGCTGTT

8. REFERENCES

- [1] A.D. Singh, A. Topham, Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997, *Ophthalmology*, 110 (2003) 956-961.
- [2] E. Kujala, T. Makitie, T. Kivela, Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44 (2003) 4651-4659.
- [3] A.D. Singh, C.L. Shields, J.A. Shields, Prognostic factors in uveal melanoma, *Melanoma Res*, 11 (2001) 255-263.
- [4] G. Prescher, N. Bornfeld, H. Hirche, B. Horsthemke, K.H. Jockel, R. Becher, Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma, *Lancet*, 347 (1996) 1222-1225.
- [5] V.A. White, J.D. Chambers, P.D. Courtright, W.Y. Chang, D.E. Horsman, Correlation of cytogenetic abnormalities with the outcome of patients with uveal melanoma, *Cancer*, 83 (1998) 354-359.
- [6] J.W. Harbour, M.D. Onken, E.D. Roberson, S. Duan, L. Cao, L.A. Worley, M.L. Council, K.A. Matatall, C. Helms, A.M. Bowcock, Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas, *Science*, 330 (2010) 1410-1413.
- [7] J.W. Harbour, A prognostic test to predict the risk of metastasis in uveal melanoma based on a 15-gene expression profile, *Methods in molecular biology*, 1102 (2014) 427-440.
- [8] M.D. Onken, L.A. Worley, J.P. Ehlers, J.W. Harbour, Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death, *Cancer research*, 64 (2004) 7205-7209.
- [9] M.D. Onken, L.A. Worley, M.D. Tuscan, J.W. Harbour, An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma, *J Mol Diagn*, 12 (2010) 461-468.

- [10] Y. Zhang, Y. Yang, L. Chen, J. Zhang, Expression analysis of genes and pathways associated with liver metastases of the uveal melanoma, *BMC medical genetics*, 15 (2014) 29.
- [11] J.R. Raymond, Y.V. Mukhin, A. Gelasco, J. Turner, G. Collinsworth, T.W. Gettys, J.S. Grewal, M.N. Garnovskaya, Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction, *Pharmacol Ther*, 92 (2001) 179-212.
- [12] C.D. Van Raamsdonk, V. Bezrookove, G. Green, J. Bauer, L. Gaugler, J.M. O'Brien, E.M. Simpson, G.S. Barsh, B.C. Bastian, Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi, *Nature*, 457 (2009) 599-602.
- [13] A.K. Banes, S.M. Shaw, A. Tawfik, B.P. Patel, S. Ogbi, D. Fulton, M.B. Marrero, Activation of the JAK/STAT pathway in vascular smooth muscle by serotonin, *American journal of physiology. Cell physiology*, 288 (2005) C805-812.
- [14] K. Naito, C. Tanaka, M. Mitsuhashi, H. Moteki, M. Kimura, H. Natsume, M. Ogihara, Signal Transduction Mechanism for Serotonin 5-HT_{2B} Receptor-Mediated DNA Synthesis and Proliferation in Primary Cultures of Adult Rat Hepatocytes, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 39 (2016) 121-129.
- [15] D.S. Choi, S.J. Ward, N. Messaddeq, J.M. Launay, L. Maroteaux, 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardiac cells, *Development*, 124 (1997) 1745-1755.
- [16] E. Vicaut, E. Laemmel, O. Stucker, Impact of serotonin on tumour growth, *Ann Med*, 32 (2000) 187-194.
- [17] E.J. Siddiqui, C.S. Thompson, D.P. Mikhailidis, F.H. Mumtaz, The role of serotonin in tumour growth (review), *Oncol Rep*, 14 (2005) 1593-1597.
- [18] B. Svejda, M. Kidd, F. Giovinazzo, K. Eltawil, B.I. Gustafsson, R. Pfragner, I.M. Modlin, The 5-HT_{2B} receptor plays a key regulatory role in both neuroendocrine tumor cell proliferation and the modulation of the fibroblast component of the neoplastic microenvironment, *Cancer*, 116 (2010) 2902-2912.

- [19] C. Soll, J.H. Jang, M.O. Riener, W. Moritz, P.J. Wild, R. Graf, P.A. Clavien, Serotonin promotes tumor growth in human hepatocellular cancer, *Hepatology*, 51 (2010) 1244-1254.
- [20] G.G. Fernandez-Ranvier, J. Weng, R.F. Yeh, E. Khanafshar, I. Suh, C. Barker, Q.Y. Duh, O.H. Clark, E. Kebebew, Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression profiling, *Arch Surg*, 143 (2008) 841-846; discussion 846.
- [21] N. Dizeyi, A. Bjartell, P. Hedlund, K.A. Tasken, V. Gadaleanu, P.A. Abrahamsson, Expression of serotonin receptors 2B and 4 in human prostate cancer tissue and effects of their antagonists on prostate cancer cell lines, *Eur Urol*, 47 (2005) 895-900.
- [22] R. Henriksen, N. Dizeyi, P.A. Abrahamsson, Expression of serotonin receptors 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2B and 5-HT4 in ovary and in ovarian tumours, *Anticancer research*, 32 (2012) 1361-1366.
- [23] S. De Lucchini, M. Ori, F. Cremisi, M. Nardini, I. Nardi, 5-HT2B-mediated serotonin signaling is required for eye morphogenesis in *Xenopus*, *Molecular and cellular neurosciences*, 29 (2005) 299-312.
- [24] E. Reisoli, S. De Lucchini, T. Anelli, S. Biagioni, I. Nardi, M. Ori, Overexpression of 5-HT2B receptor results in retinal dysplasia and defective ocular morphogenesis in *Xenopus* embryos, *Brain research*, 1244 (2008) 32-39.
- [25] V. Molloy-Simard, J.F. St-Laurent, F. Vigneault, M. Gaudreault, N. Dargis, M.C. Guerin, S. Leclerc, M. Morcos, D. Black, Y. Molgat, D. Bergeron, Y. de Launoit, F. Boudreau, S. Desnoyers, S. Guerin, Altered expression of the poly(ADP-ribosyl)ation enzymes in uveal melanoma and regulation of PARG gene expression by the transcription factor ERM, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53 (2012) 6219-6231.
- [26] C. Duval, K. Zaniolo, S. Leclerc, C. Salesse, S.L. Guerin, Characterization of the human alpha9 integrin subunit gene: Promoter analysis and transcriptional regulation in ocular cells, *Experimental eye research*, 135 (2015) 146-163.

- [27] S. Landreville, F. Vigneault, M. Bergeron, S. Leclerc, M. Gaudreault, M. Morcos, F. Mouriaux, C. Salesse, S.L. Guerin, Suppression of $\alpha 5$ gene expression is closely related to the tumorigenic properties of uveal melanoma cell lines, *Pigment Cell Mel Res*, In press (2011).
- [28] F. Mouriaux, K. Zaniolo, M.A. Bergeron, C. Weidmann, A. De La Fouchardiere, F. Fournier, A. Droit, M.W. Morcos, S. Landreville, S.L. Guerin, Effects of Long-term Serial Passaging on the Characteristics and Properties of Cell Lines Derived From Uveal Melanoma Primary Tumors, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57 (2016) 5288-5301.
- [29] K. Larouche, S. Leclerc, C. Salesse, S.L. Guerin, Expression of the alpha 5 integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells in vitro, *The Journal of biological chemistry*, 275 (2000) 39182-39192.
- [30] R.J. Roy, P. Gosselin, S.L. Guerin, A short protocol for micro-purification of nuclear proteins from whole animal tissue, *Biotechniques*, 11 (1991) 770-777.
- [31] M. Gaudreault, M.E. Gingras, M. Lessard, S. Leclerc, S.L. Guerin, Electrophoretic mobility shift assays for the analysis of DNA-protein interactions, *Methods in molecular biology*, 543 (2009) 15-35.
- [32] E. de Vries, W. van Driel, S.J. van den Heuvel, P.C. van der Vliet, Contactpoint analysis of the HeLa nuclear factor I recognition site reveals symmetrical binding at one side of the DNA helix, *Embo J*, 6 (1987) 161-168.
- [33] A.S.J. Baldwin, *Current Protocols in Molecular Biology*, in: K. Struhl (Ed.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds Wiley, New York, 1989, pp. 12.18-12.10.
- [34] M. Harvey, I. Brisson, S.L. Guerin, A simple apparatus for fast and inexpensive recovery of DNA from polyacrylamide gels, *Biotechniques*, 14 (1993) 942-948.
- [35] K. Larouche, S. Leclerc, C. Salesse, S.L. Guerin, Expression of the alpha 5 integrin subunit gene promoter is positively regulated by the extracellular matrix

component fibronectin through the transcription factor Sp1 in corneal epithelial cells in vitro, *J Biol Chem*, 275 (2000) 39182-39192.

[36] M. Gaudreault, F. Vigneault, S. Leclerc, S.L. Guerin, Laminin reduces expression of the human alpha6 integrin subunit gene by altering the level of the transcription factors Sp1 and Sp3, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48 (2007) 3490-3505.

[37] M.E. Gingras, K. Larouche, N. Larouche, S. Leclerc, C. Salesse, S.L. Guerin, Regulation of the integrin subunit alpha5 gene promoter by the transcription factors Sp1/Sp3 is influenced by the cell density in rabbit corneal epithelial cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44 (2003) 3742-3755.

[38] S. Ouellet, F. Vigneault, M. Lessard, S. Leclerc, R. Drouin, S.L. Guerin, Transcriptional regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) gene by NFI in proliferating human cells, *Nucleic Acids Res*, 34 (2006) 6472-6487.

[39] M. Gaudreault, F. Vigneault, M.E. Gingras, S. Leclerc, P. Carrier, L. Germain, S.L. Guerin, Transcriptional regulation of the human alpha6 integrin gene by the transcription factor NFI during corneal wound healing, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49 (2008) 3758-3767.

[40] M.E. Gingras, B. Masson-Gadais, K. Zaniolo, S. Leclerc, R. Drouin, L. Germain, S.L. Guerin, Differential binding of the transcription factors Sp1, AP-1, and NFI to the promoter of the human alpha5 integrin gene dictates its transcriptional activity, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50 (2009) 57-67.

[41] M.A. Laniel, G.G. Poirier, S.L. Guerin, Nuclear factor 1 interferes with Sp1 binding through a composite element on the rat poly(ADP-ribose) polymerase promoter to modulate its activity in vitro, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 20766-20773.

[42] K.H. Brettingham-Moore, P.C. Taberlay, A.F. Holloway, Interplay between Transcription Factors and the Epigenome: Insight from the Role of RUNX1 in Leukemia, *Frontiers in immunology*, 6 (2015) 499.

- [43] O.N. Kuvardina, J. Herglotz, S. Kolodziej, N. Kohrs, S. Herkt, B. Wojcik, T. Oellerich, J. Corso, K. Behrens, A. Kumar, H. Hussong, H. Urlaub, J. Koch, H. Serve, H. Bonig, C. Stocking, M.A. Rieger, J. Lausen, RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation, *Blood*, 125 (2015) 3570-3579.
- [44] E. Roulet, P. Bucher, R. Schneider, E. Wingender, Y. Dusserre, T. Werner, N. Mermod, Experimental analysis and computer prediction of CTF/NFI transcription factor DNA binding sites, *J Mol Biol*, 297 (2000) 833-848.
- [45] E. Roulet, S. Busso, A.A. Camargo, A.J. Simpson, N. Mermod, P. Bucher, High-throughput SELEX SAGE method for quantitative modeling of transcription-factor binding sites, *Nat Biotechnol*, 20 (2002) 831-835.
- [46] P. Malho, K. Dunn, D. Donaldson, R.R. Dubielzig, Z. Birand, M. Starkey, Investigation of prognostic indicators for human uveal melanoma as biomarkers of canine uveal melanoma metastasis, *J Small Anim Pract*, 54 (2013) 584-593.
- [47] R.M. Gronostajski, Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development, *Gene*, 249 (2000) 31-45.
- [48] K.R. Steffensen, E. Holter, K.A. Tobin, S. Leclerc, J.A. Gustafsson, S.L. Guerin, W. Eskild, Members of the nuclear factor 1 family reduce the transcriptional potential of the nuclear receptor LXR α promoter, *Biochemical and biophysical research communications*, 289 (2001) 1262-1267.
- [49] J. Nilsson, G. Bjursell, M. Kannius-Janson, Nuclear Jak2 and transcription factor NF1-C2: a novel mechanism of prolactin signaling in mammary epithelial cells, *Mol Cell Biol*, 26 (2006) 5663-5674.
- [50] C. Duval, M. Gaudreault, F. Vigneault, L. Touzel-Deschenes, P.J. Rochette, B. Masson-Gadais, L. Germain, S.L. Guerin, Rescue of the transcription factors Sp1 and NFI in human skin keratinocytes through a feeder-layer-dependent suppression of the proteasome activity, *J Mol Biol*, 418 (2012) 281-299.

- [51] J. Murtagh, F. Martin, R.M. Gronostajski, The Nuclear Factor I (NFI) gene family in mammary gland development and function, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 8 (2003) 241-254.
- [52] W.Y. Kim, M. Sieweke, E. Ogawa, H.J. Wee, U. Englmeier, T. Graf, Y. Ito, Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains, *EMBO J*, 18 (1999) 1609-1620.
- [53] D.E. Zhang, C.J. Hetherington, S. Meyers, K.L. Rhoades, C.J. Larson, H.M. Chen, S.W. Hiebert, D.G. Tenen, CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter, *Mol Cell Biol*, 16 (1996) 1231-1240.
- [54] C. Hernandez-Munain, M.S. Krangel, c-Myb and core-binding factor/PEBP2 display functional synergy but bind independently to adjacent sites in the T-cell receptor delta enhancer, *Mol Cell Biol*, 15 (1995) 3090-3099.
- [55] N. Pencovich, R. Jaschek, A. Tanay, Y. Groner, Dynamic combinatorial interactions of RUNX1 and cooperating partners regulates megakaryocytic differentiation in cell line models, *Blood*, 117 (2011) e1-14.
- [56] M. Bertrand-Philippe, R.G. Ruddell, M.J. Arthur, J. Thomas, N. Mungalsingh, D.A. Mann, Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene transcription by RUNX1 and RUNX2, *The Journal of biological chemistry*, 279 (2004) 24530-24539.
- [57] S.R. Bowers, F.J. Calero-Nieto, S. Valeaux, N. Fernandez-Fuentes, P.N. Cockerill, Runx1 binds as a dimeric complex to overlapping Runx1 sites within a palindromic element in the human GM-CSF enhancer, *Nucleic Acids Res*, 38 (2010) 6124-6134.
- [58] K.B. Umansky, Y. Gruenbaum-Cohen, M. Tsoory, E. Feldmesser, D. Goldenberg, O. Brenner, Y. Groner, Runx1 Transcription Factor Is Required for Myoblasts Proliferation during Muscle Regeneration, *PLoS Genet*, 11 (2015) e1005457.

- [59] M. Ichikawa, A. Yoshimi, M. Nakagawa, N. Nishimoto, N. Watanabe-Okochi, M. Kurokawa, A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia, *Int J Hematol*, 97 (2013) 726-734.
- [60] M.L. Slattery, A. Lundgreen, J.S. Herrick, B.J. Caan, J.D. Potter, R.K. Wolff, Associations between genetic variation in RUNX1, RUNX2, RUNX3, MAPK1 and eIF4E and risk of colon and rectal cancer: additional support for a TGF-beta-signaling pathway, *Carcinogenesis*, 32 (2011) 318-326.
- [61] S.P. Huang, Y.H. Lan, T.L. Lu, J.B. Pao, T.Y. Chang, H.Z. Lee, W.H. Yang, C.J. Hsieh, L.M. Chen, L.C. Huang, W.C. Ting, B.Y. Bao, Clinical significance of runt-related transcription factor 1 polymorphism in prostate cancer, *BJU Int*, 107 (2011) 486-492.
- [62] J. Planaguma, M. Gonzalez, A. Doll, M. Monge, A. Gil-Moreno, T. Baro, A. Garcia, J. Xercavins, F. Alameda, M. Abal, J. Reventos, The up-regulation profiles of p21WAF1/CIP1 and RUNX1/AML1 correlate with myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma, *Hum Pathol*, 37 (2006) 1050-1057.
- [63] C.J. Scheitz, T.S. Lee, D.J. McDermitt, T. Tumber, Defining a tissue stem cell-driven Runx1/Stat3 signalling axis in epithelial cancer, *EMBO J*, 31 (2012) 4124-4139.
- [64] M.S. Recouvreux, E.N. Grasso, P.C. Echeverria, L. Rocha-Viegas, L.H. Castilla, C. Schere-Levy, J.M. Tocci, E.C. Kordon, N. Rubinstein, RUNX1 and FOXP3 interplay regulates expression of breast cancer related genes, *Oncotarget*, 7 (2016) 6552-6565.
- [65] P.J. Appleford, A. Woollard, RUNX genes find a niche in stem cell biology, *J Cell Biochem*, 108 (2009) 14-21.
- [66] C.S. Hoi, S.E. Lee, S.Y. Lu, D.J. McDermitt, K.M. Osorio, C.M. Piskun, R.M. Peters, R. Paus, T. Tumber, Runx1 directly promotes proliferation of hair follicle stem cells and epithelial tumor formation in mouse skin, *Mol Cell Biol*, 30 (2010) 2518-2536.

3. Discussion

3.1. Nos lignées de mélanome uvéal

Nos lignées de mélanome uvéal sont dérivées de tumeurs primaires de patients atteints de mélanome uvéal. Elles se sont avérées être un excellent outil d'étude pour cette problématique. Par nos analyses de profilage génique sur biopuce à ADN nous avons réussi à identifier des lignées de mélanome uvéal qui expriment de faibles niveaux de transcription du gène HTR2B (T97, T108, T143) ainsi qu'une lignée qui exprime un niveau élevé de ce gène (T142) (Figure 1A du chapitre 2). Nous avons veillé à travailler sur ces lignées uniquement en bas passage (inférieurs à P10) afin d'éviter les éventuelles hétérogénéités qui peuvent être causées par une mise en culture prolongée (92).

Les niveaux d'expression de la protéine HTR2B ont été vérifiés par immunobuvardage de type Western (figure 1C du chapitre 2), ainsi que par des marquages en immunofluorescence (figure 1D du chapitre 2). La protéine HTR2B semble être aussi bien exprimée par nos lignées à hauts niveaux que par nos lignées à bas niveaux transcriptionnels du gène HTR2B, suggérant que même les cellules à bas niveaux transcriptionnels de HTR2B maintiennent des niveaux protéiques stables. Nous croyons que la stabilité de la protéine HTR2B pourrait être assurée par des modifications post-traductionnelles qui permettraient d'augmenter sa demi vie en ralentissant son «*turn-over*» ainsi que sa dégradation dans la cellule.

3.1.1. Contribution du facteur de transcription NFI

Les facteurs de transcription NFI «*Nuclear Factor one*» sont des protéines nucléaires identifiées pour la première fois en 1982 chez le poulet (93). Ces facteurs peuvent jouer un rôle d'activateur (94) ou de répresseur (95, 96) de la transcription de gènes cellulaires et viraux (97, 98) en se liant sous forme de dimères à leur séquence palindromique consensus 5'-TGGCANNNTGCCA-3'.

Cette séquence est reconnue à une très haute affinité et retrouvée à de nombreuses reprises dans les génomes viraux et cellulaires au niveau d'enhancers et de silenciers de plusieurs gènes, permettant alors la modulation de l'expression de ces derniers (99, 100). De nombreuses études ont démontré la présence de ce motif de liaison dans différents tissus tels que le cerveau (101), les poumons (102), le foie (103), les intestins (104) et plusieurs autres (105, 106).

Quatre isoformes différents sont identifiés chez les vertébrés: NFIA, NFIB, NFIC, et NFIX (107), présentant des homologues entre les espèces. La diversité des fonctions régulatrices exercées par les membres de cette famille de facteurs de transcription est assurée par la multiplicité des gènes codants (NFI A, B, C, X), des phénomènes d'épissage alternatifs subis par les transcrits NFI (qui assure la production de variants au sein même de chaque isoforme NFI), ainsi que par des phénomènes d'hétérodimérisation (108, 109). Les variants de ces protéines résultants de phénomènes d'épissage alternatifs démontrent des capacités catalytiques distinctes (110).

L'expression des différents isoformes de la famille des FTs NFI a été très étudiée chez le modèle murin, où elle s'est avérée être très complexe. Chez la souris adulte, les quatre isoformes sont fortement exprimés dans les poumons, le foie, le coeur, ainsi que d'autres tissus, mais faiblement exprimés dans la rate et les testicules (111). Cependant, ces niveaux sont soumis à des fluctuations d'expression de manière séquentielle, au cours de l'embryogénèse, ce qui suggère que ces isoformes jouent un rôle dans la régulation de l'expression tissu-spécifique des gènes qui sont sous leur contrôle au cours du développement (111).

Les isoformes de la famille NFI sont constitués de 420 à 500 acides aminés, répartis en deux domaines fonctionnels importants : le domaine de liaison à l'ADN MH1 ("Mad homology 1") en N-terminal (112), ainsi que le domaine d'activation de la transcription CTF ("CCAAT box-binding transcription factor") en C-terminal (113) (Figure 10). Le domaine CTF présente des différences entre les isoformes NFI, il démontre aussi une homologie avec le domaine C-terminal de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II, et est essentiel à la régulation de la transcription par ces FTs (114,115).

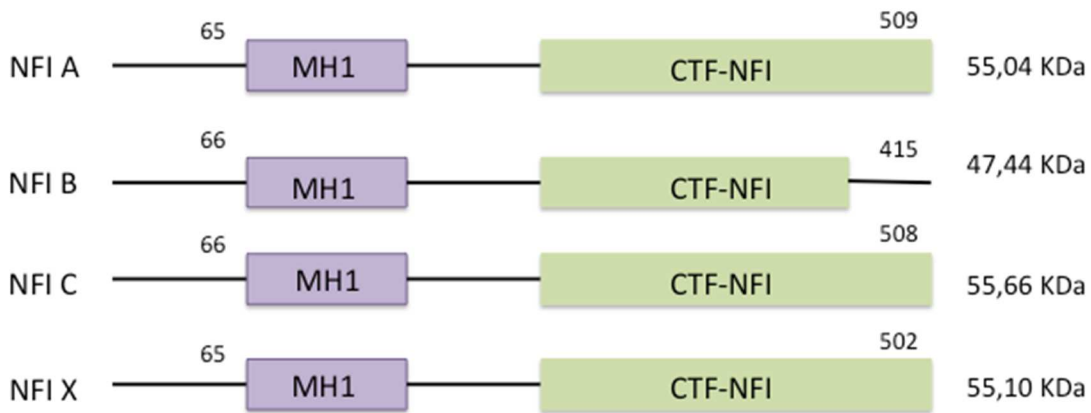


Figure 10 : Domaines fonctionnels des isoformes NFI. MH1 : Mad Homology 1, domaine de liaison à l'ADN. CTF : CCAAT box-binding transcription factor, domaine d'activation de la transcription.

Les phénomènes d'épissages alternatifs permettent d'obtenir des variants de ce domaine de régulation de la transcription, permettant ainsi le recrutement de cofacteurs de différentes nature, ce qui explique les différentes modalités de régulation retrouvées chez les FTs de la famille NFI (115, 116). Le domaine N-terminal, quant à lui, est composé de 200 acides aminés qui permettent la liaison à l'ADN et la dimérisation de ce FT en formant des homo ou hétérodimères (117).

Les FTs de la famille NFI possèdent la capacité d'interférer avec la liaison d'autres FTs et de compétitionner pour la liaison d'un seul et même site de reconnaissance. C'est le cas, par exemple, pour le promoteur du gène codant la sous unité de l'intégrine $\alpha 5$, où NFI interfère avec la liaison du FT Sp1 ("specificity protein 1") (118).

3.1.1.1. L'isoforme NFIA

Le gène codant l'isoforme NFIA chez l'humain est situé sur le chromosome 1, dans la région 1p31.3-p31.2. Il s'agit d'un gène composé de 11 exons produisant au final une protéine de 509 acides aminés. Plus de 12 variants de NFIA ont été identifiés, issus de phénomènes d'épissage alternatifs (113, 119).

L'étude menée par l'équipe du Dr. Nagase (119) a démontré une expression modérée à élevée de l'isoforme NFIA dans tous les tissus étudiés, dont le coeur, le foie, le cerveau, les poumons, les ovaires, le muscle squelettique, les reins, le pancréas ainsi que les testicules.

L'abolition de l'expression du gène NFIA chez la souris par "*knock out*" mène à des anomalies et des malformations cérébrales, une absence du corps calleux ainsi qu'une dilatation ventriculaire, causant la mort dans les deux premières semaines de vie des souris (119). Ce même phénomène d'hydrocéphalie est observé chez l'Homme souffrant d'haploinsuffisance en NFIA, ce qui cause des anomalies du système nerveux central ainsi que des défaillances du système urinaire en périphérie (120).

3.1.1.2. L'isoforme NFIB

Chez l'Homme le gène codant NFIB est localisé sur le chromosome 9 dans la région 9p 24.1, et est constitué de 9 exons codants une protéine de 420 acides aminés (Figure 10). Plus de dix variants issus d'épissage alternatifs ont été identifiés pour ce gène, leur taille variant de 168 à 570 acides aminés (113).

Le profil d'expression tissulaire de cet isoforme se rapproche de l'isoforme NFIA, où on le retrouve exprimé à des niveaux modérés et élevés dans plusieurs organes (cf. organes cités ci-dessus pour NFIA).

L'abolition de l'expression de NFIB par « *knock out* » chez la souris cause une létalité dans les premières heures de vie. Ce FT est essentiel à la maturation des poumons (121), ainsi qu'au développement du cerveau, où l'on retrouve des anomalies semblables à celles causées par l'absence de l'isoforme NFIA cité ci-dessus (113).

3.1.1.3. L'isoforme NFIC

Le gène codant l'isoforme NFIC chez l'Homme est localisé sur le chromosome 19, dans la région 19p13.3, il s'agit d'un gène comportant 11 exons qui codent pour une protéine de 508 acides aminés (Figure 10). Plus de six variants ont été identifiés pour ce gène, dont les longueurs varient de 428 à 508 acides aminés (113).

Un « *knock out* » de cet isoforme chez la souris cause un phénotype particulier, pour lequel on observe une absence de racines dentaires chez les souris. Ces dernières présentent alors des taux de mortalité élevés dus aux problèmes d'alimentation qu'elles rencontrent ainsi que des retards de croissance (122).

3.1.1.4. L'isoforme NFIX

Le gène codant la protéine NFIX chez l'Homme est localisé sur le chromosome 19 dans la région 19p 13.3, il comporte 10 exons qui encodent pour une protéine de 501 acides aminés (Figure 10). Plus de six variants de NFIX ont été définis dont la longueur varie de 403 à 510 acides aminés (113). L'abolition de l'expression de l'isoforme NFIX chez la souris cause des anomalies structurales au niveau du cerveau regroupant une absence de corps calleux, ainsi qu'un phénotype d'hydrocéphalie. De plus, ces souris présentent des aberrations squelettiques sévères dues à des retards dans le processus d'ossification ainsi qu'à une dégénérescence des disques intervertébraux (123), ce qui mène à une mort précoce durant les premiers jours de vie.

Au cours de notre travail de recherche, la transfection des délétants du gène HTR2B nous a permis de définir une alternance particulière de fortes régions régulatrices positives et négatives (« *silencer* » distal et proximal, figure 3D du manuscrit), au sein desquelles nous retrouvons des sites de liaisons potentiels pour de nombreux facteurs de transcription. La famille des facteurs de transcription NFI se démarque par son nombre important de sites de liaisons potentiels sur nos deux régions « *silencer* » définies (plus de 17 sites de liaisons potentiellement occupés par le FT NFI (figure 2A du chapitre 2)), ce qui suggère qu'au moins une partie de la régulation d'expression génique du gène HTR2B humain est assurée par la famille des FTs NFI. Sachant que les quatre isoformes de cette famille de facteurs de transcription peuvent réguler aussi bien positivement que négativement l'expression des gènes qui sont sous leur contrôle (100), nous nous sommes demandé quelle était la contribution de ces FTs dans la régulation du gène HTR2B.

Nous avons alors vérifié quels étaient les différents isoformes de la famille NFI exprimés par nos lignées de mélanome uvéal (T97, T108, T142 et T143) par immunobuvardage de type Western (figure 4C chapitre 2). Ces résultats nous ont permis de confirmer que nos lignées expriment bien ces différents isoformes mais à des combinatoires différentes : toutes les lignées, à l'exception de la lignée T108 qui n'exprime que les isoformes NFIA et NFIX, expriment les 4 isoformes NFI.

L'étape suivante de notre travail consistait à vérifier la capacité fonctionnelle des isoformes NFI exprimés par nos lignées de mélanome uvéal (ces FTs accomplissent-ils leur rôle de facteur de transcription en liant leur séquence cible à haute affinité ?). Cette analyse, réalisée grâce à des études de retard sur gel EMSA (« Electrophoretic mobility shift assay » (figure 4A et 4B du chapitre 2)), nous a permis de démontrer que nos lignées MU expriment des isoformes NFI pouvant spécifiquement reconnaître leur séquence cible à haute affinité. Par ailleurs, ces travaux nous ont permis d'observer que la lignée T108 est celle qui présente le moins de signal en retard sur gel (Figure 4A du chapitre 2), ce qui est en accord avec les résultats de notre précédente analyse en immunobuvardage Western pour laquelle les cellules T108 n'expriment que les isoformes NFIA et NFIX (Figure 4C du chapitre 2).

Au cours de cette étude sur les différents isoformes des facteurs de transcription NFI, nous avons obtenu un résultat surprenant qui va à l'encontre du consensus jusqu'à maintenant admis concernant les différents membres de la famille de ces FTs. Plusieurs études, dont celles de l'équipe du Dr. Gronostajski, suggèrent que les domaines de liaison à l'ADN de tous les isoformes NFI sont fondamentalement semblables et permettent à ces protéines de reconnaître la même séquence consensus avec la même affinité de reconnaissance (100). Nos résultats démontrent que les quatre isoformes NFI peuvent démontrer des variations subtiles qui leur sont propres dans la reconnaissance de la séquence cible d'ADN qu'ils reconnaissent. En effet, la figure 5A du chapitre 2 montre que les quatre isoformes NFI utilisés ici peuvent lier, avec des affinités différentes, la même sonde consensus à haute affinité qui leur est présentée.

Il s'agit ici de résultats obtenus grâce à des protéines recombinantes surexprimées chez la bactérie, purifiées sur colonne de chitine, puis phosphorylées par la caséine kinase II (CKII), afin de garantir leur bonne fonctionnalité en liant spécifiquement leur séquence cible à haute affinité, selon un protocole pour lequel nous sommes très familiers (124, 125).

Toutefois, l'incubation d'une sonde radiomarquée portant la séquence de la région négative distale (« silencer » distal) du gène HTR2B humain (qui contient également plusieurs sites NFI potentiels) en présence des quatre isoformes NFI (Figure 5B du chapitre 2) a permis d'observer une liaison uniquement avec les isoformes NFIC et NFIX mais pas avec les isoformes NFIA et NFIB, ce qui confirme cette notion de subtilité de liaison entre les différents isoformes NFI.

La transfection des différents mutants ponctuels (figure 6B du chapitre 2) des sites de liaison des facteurs de transcription NFI identifiés dans le cadre de cette étude nous a permis d'évaluer le type de régulation exercée par les membres de cette famille (activateur ou répresseur de la transcription du gène). Ainsi, dans la lignée T108, le FT NFI exerce sans contredit une influence positive sur l'expression du gène HTR2B humain (figure 6C du chapitre 2) puisque la mutation du site -9 NFI abolit presque totalement l'activité transcriptionnelle dirigée par le promoteur du gène HTR2B. Ce résultat est confirmé par la surexpression des différents isoformes NFI au sein de cette même lignée (figure 6E du chapitre 2), où l'on voit l'activité de notre gène rapporteur augmenter en présence des isoformes NFIA et NFIB (alors que les isoformes NFIC et NFIX ne semblent exercer aucune influence sous ses conditions). De ce fait, dans le cadre de notre étude, NFI semble être un activateur de la transcription du gène HTR2B. Cependant, les quatre sites de liaison pour le FT NFI analysés par mutagenèse dirigée (-9, -210, -1249 et -1275) n'exercent vraisemblablement pas des régulations positives de même ampleur. En effet, le site -9 NFI, dont la mutation diminue de manière drastique l'activité de notre gène rapporteur, ressort clairement comme étant le plus puissant des quatre sites analysés suivi, en second lieu, du site -210 NFI, dont la mutation mène à une baisse de l'activité du gène rapporteur. S'ensuivent ensuite le site NFI en position -1249 dont la mutation produit une tendance à la baisse du gène rapporteur, et pour finir, le site en position -1275, dont la mutation ne semble avoir

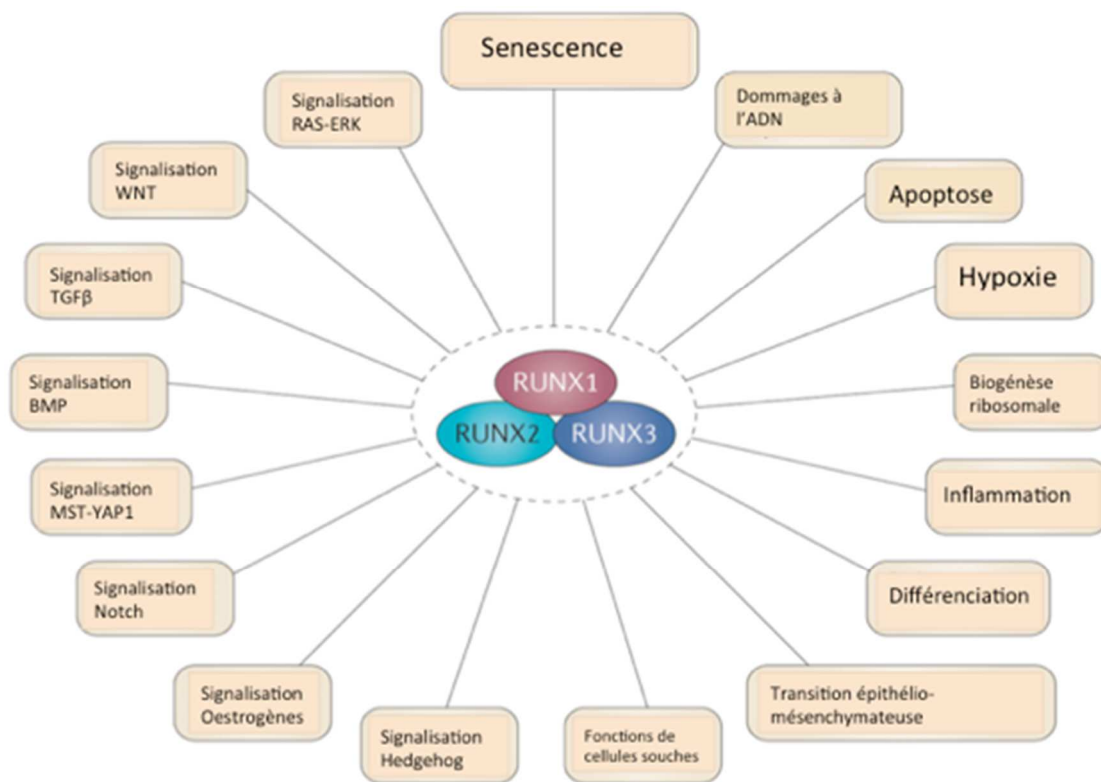
que très peu d'impact sur l'expression de notre gène rapporteur. Ces observations sont en accord avec le degré d'identité observé entre les sites de liaison NFI identifiés et la séquence consensus reconnue par le FT NFI (figure 6A du chapitre 2) : plus le site de liaison pour NFI est similaire à la séquence consensus, plus ce site est reconnu par le FT NFI qui va pouvoir y exercer son influence régulatrice positive, ce qui augmente sa robustesse. Le site NFI -9, le plus puissant des quatre sites NFI analysés, démontre d'ailleurs la plus haute homologie (14 nucléotides conservés sur une possibilité de 15) avec la séquence consensus à haute affinité reconnue par le FT NFI.

3.1.2. Contribution du facteur de transcription RUNX1

Sachant que la régulation de l'expression génique est un phénomène très complexe mettant en jeu plusieurs acteurs, dont plusieurs familles de facteurs de transcription (autres que le NFI trouvé précédemment), une étude plus approfondie de la région régulatrice négative distale (« *silencer* » distal) a été réalisée. L'analyse de ce fragment en retard sur gel EMSA combinée à la technique d'interférence de méthylation au DMS a révélé des points de contacts entre une protéine nucléaire et la sonde génomique utilisée en position -1127 (figure 7A et 7B du chapitre 2). Dans cette liaison, trois résidus guanine sont impliqués et semblent indispensables à la liaison de ce facteur (figure 7B du chapitre 2). La séquence portant les 3 résidus guanine identifiés par cette méthode est spécifique et reconnue avec une probabilité de 100% par un unique facteur de transcription : RUNX1 («Runt-related transcription factor 1») (ou AML-1) selon le logiciel JASPER. Cependant, le profil des complexes formés sur gel de retard nous montre la formation de plusieurs complexes (S1, S2 et S3 de la figure 7A du chapitre 2), dont certains sont multi-bandes. En revanche, les résidus guanines identifiés pour chacun de ces complexes par la technique d'interférence de méthylation au DMS sont identiques, ce qui suggère que les points de contacts dans l'ADN Silencer-distal sont toujours établis par le même facteur de transcription (en l'occurrence RUNX1). Ainsi, les différences de mobilité électrophorétiques observées sur gel EMSA résulteraient de l'interaction de RUNX1 avec d'autres protéines nucléaires.

3.1.2.1. La famille de facteurs de transcription RUNX

Les FTs de la famille RUNX sont des régulateurs essentiels pour de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose ainsi que la différenciation cellulaire (126) (Figure 11).



Nature Reviews | Cancer

Figure 11 : Les différents isoformes RUNX communiquent avec une multitude de voies signalétiques clé définissant le devenir cellulaire. La voie WNT est associée au renouvellement cellulaire, la voie TGFβ (*Transforming growth factor-β*) est liée à la réponse inflammatoire, l'apoptose et les métastases. BMP (*bone morphogenetic protein*). MST-YAP1 (*mammalian STE20-like protein kinase-Yes-associated protein 1*). Image adaptée de (126).

Les protéines RUNX seules sont de faibles régulateurs transcriptionnels et requièrent des interactions avec des cofacteurs afin d'augmenter leur activité (127). Des études ont démontré l'interaction des FTs de la famille RUNX à de nombreux régulateurs transcriptionnels incluant des modificateurs chromatinien tels que le complexe PRC1 (« *Polycomb repressive complex 1* ») (128), des histones déacétylases HDAC (129, 130), ainsi que le coactivateur transcriptionnel p300 acétyltransférase (131, 132).

Le gène RUNX1 code pour le facteur de transcription « *Runt-related* » qui fait partie de la famille de gènes RUNX, comprenant RUNX1, RUNX2 et RUNX3. Les facteurs de transcription de la famille RUNX sont hétérodimériques et composés d'une sous unité α codée par RUNX1, RUNX2 et RUNX3 qui lie l'ADN grâce à son domaine Runt (Figure 12) (133), ainsi qu'une sous unité β codée par le gène CBF β (*Core Binding Factor β*) qui augmente l'affinité de liaison de la sous unité α pour sa séquence cible d'ADN.

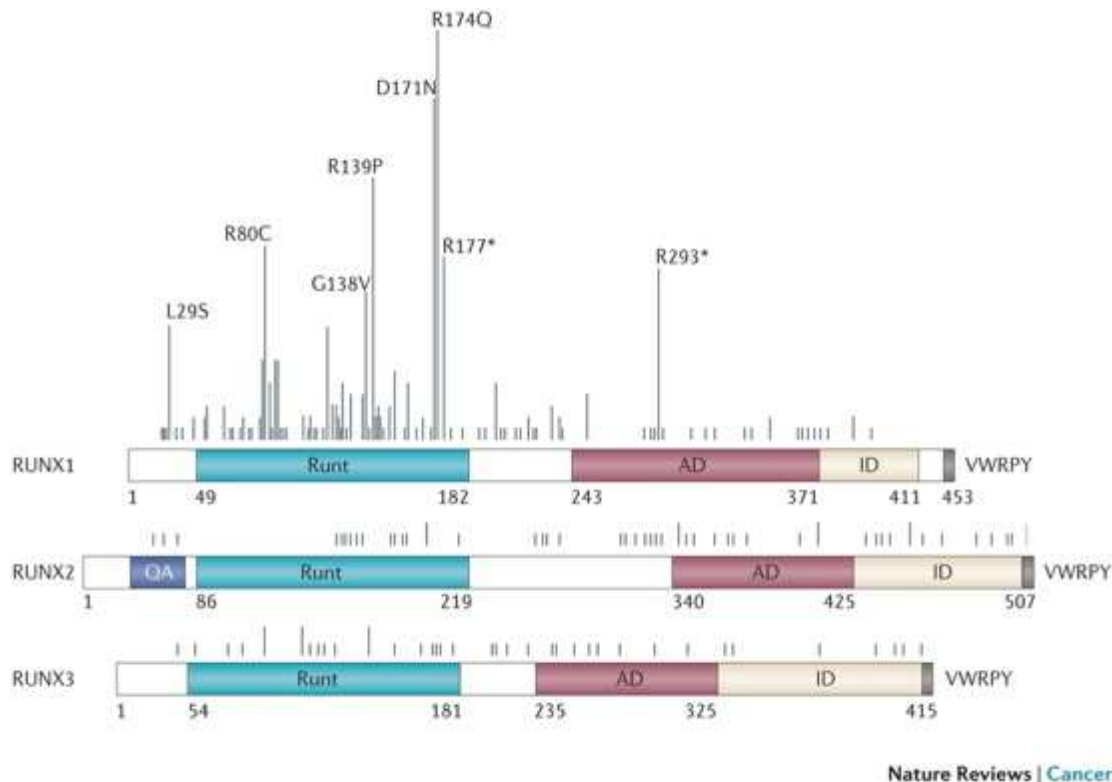


Figure 12 : Domaines fonctionnels des isoformes RUNX. Domaine Runt de liaison à l'ADN (Runt). Domaine d'Activation (AD). Domaine Inhibiteur (ID). Motif VWRPY à l'extrémité C-terminale (interaction avec le corépresseur Groucho). Barres: fréquence relative de substitution d'acides aminés lors de cancers chez l'humain. Astérisque : mutations de substitutions non sens. QA : répétitions Glutamine/Alanine. Image tirée de (126).

Les gènes RUNX chez les mammifères possèdent deux promoteurs, le premier distal et le second proximal au site d'initiation de la transcription, qui sont sollicités selon les besoins de la cellule et son niveau de différenciation, ce qui permet de créer des isoformes définis pour ces FTs, ayant des queues N-terminales différentes (127, 133). Les phénomènes d'épissages alternatifs sont à l'origine du restant des isoformes RUNX identifiés (126, 127).

La partie C-terminale des FTs RUNX agit comme un échafaudage qui recrute et interagit avec une multitude de protéines, conférant de multiples modalités de régulation par ces FTs qui peuvent être soit des répresseurs ou activateurs de la transcription génique (134). Tous les isoformes RUNX lient le même motif d'ADN PyGPyGGTPy (où Py est une pyrimidine).

Beaucoup d'études ont caractérisé la famille de FTs RUNX chez la souris, où les gènes RUNX1, RUNX2 et RUNX3 ont été localisés sur les chromosomes murins 16, 17 et 4, respectivement, tandis que leurs orthologues chez l'humain sont localisés respectivement aux coordonnées génétiques suivantes 21q22.12, 6p21 et 1p36.1 (135, 136). Les protéines de la famille de FTs RUNX présentent un domaine nommé Runt (RD) de 128 acides aminés, très hautement conservé entre les espèces (humain, souris, drosophile, le nématode *Caenorhabditis elegans...*), et démontre des capacités de liaison à l'ADN ainsi que des domain/es fonctionnels d'hétérodimérisation à des cofacteurs de la régulation transcriptionnelle (Figure 12) (136, 137, 138).

Globalement la capacité de RUNX à exercer des effets régulatoires opposés est due aux phénomènes d'épissages alternatifs subis par le transcrit, à la nature du cofacteur recruté (coactivateurs ou corepresseurs de la transcription), ainsi qu'aux modifications post-traductionnelles qui modulent sa liaison à l'ADN. En effet, une étude a démontré que de multiples phosphorylations de RUNX1 sont indispensables aux étapes précoces de l'hématopoïèse et le développement des lymphocytes T (139).

Les gènes RUNX sont des régulateurs développementaux essentiels lors de l'étape de la spécification cellulaire. Même s'ils reconnaissent la même séquence d'ADN, leurs queues C-terminales distinctes lient différents partenaires de régulation ce qui augmente la complexité des mécanismes de régulation génique accomplis par les membres de cette famille de facteurs de transcription. Cette régulation croisée par les différentes isoformes dépend de leur niveau d'expression dans les différents tissus.

3.1.2.2. Profil d'expression des isoformes RUNX

L'expression du transcrit RUNX1 est détectable dans tous les organes examinés, exceptés le coeur et le cerveau où les niveaux sont très bas. Cependant, les niveaux d'expression de ces transcrits diffèrent selon les tissus et s'avèrent plus élevés dans le thymus (cellules du système immunitaire tels que les lymphocytes T et B), la rate, ainsi que la moelle épinière et les cellules hématopoïétiques chez l'Homme (126, 140).

Les niveaux d'expression de RUNX2 sont détectables dans plusieurs tissus à des seuils faibles, les plus hauts niveaux d'expression étant observés au niveau de la moelle osseuse, des cellules du système immunitaire, ainsi que du tractus gastrointestinal (140, 126).

Le transcrit RUNX3 est exprimé de manière quasi ubiquitaire mais à des niveaux bas chez l'Homme, les plus hauts niveaux détectés ayant été observés au niveau de la moelle osseuse ainsi que des cellules du système immunitaire (126, 140).

3.1.2.2. Interactions des RUNX avec leurs cofacteurs

RUNX1 active la transcription génique en interagissant avec des coactivateurs de la transcription tels que p300 et CREB (131, 141), mais il peut aussi agir en tant qu'inhibiteur de la transcription en interagissant avec des corépresseurs de la transcription génique tels que mSin3A, TLE (« Transducin-like enhancer protein 1 », homologue de Groucho chez les mammifères) (142) et les histones deacétylases (HDACs ; Figure 13). L'interaction de RUNX1 avec ces cofacteurs est essentielle pour la réalisation des étapes de l'hématopoïèse dans le fœtus mais aussi à la maturation des mégacaryocytes, ainsi que les lymphocytes T et B chez la souris adulte (143). D'autres cofacteurs transcriptionnels interagissent avec RUNX1, tels que CEBF/ α , ELF2, ELF4 (144), MyoD (145), et CHIP (146).

Un exemple de coopérativité entre RUNX1 et ETS1 a été démontré, la liaison du domaine inhibiteur de RUNX1 à ETS1 empêchant le recrutement du cofacteur CBF β , ce qui renforce l'affinité de ce complexe à l'ADN cible et entraîne une activation synergique du promoteur régulé (127, 147).

Ce gène est aussi la principale cible des réarrangements chromosomiques (translocation (8;21) et inversion (16)) retrouvés dans les cas de leucémies infantiles (plus de 25% des cas), d'où son second nom AML1 pour « Acute myeloid Leukemia », ce qui démontre que RUNX1 et/ou ses gènes cibles sont essentiels à l'hématopoïèse de toutes ces lignées (148).

Le gène RUNX1 est composé de 9 exons et les analyses en buvardage Northern démontrent la présence de 6 transcrits principaux dont la taille varie de 2.2 à 7.5 kb et qui s'expliquent par la présence de deux promoteurs distincts, des phénomènes d'épissages alternatifs, ainsi que l'usage de sites de polyadénylations différents (149). Il présente un très haut niveau d'homologie avec le gène Runt chez la drosophile qui permet la segmentation de l'abdomen de l'animal, mais aussi avec le facteur PEBP2 (« polyomavirus enhancer binding protein 2 ») de la souris (149).

Des études chez lesquelles l'expression de l'isoforme RUNX1 a été supprimée par « knock out » chez la souris ont démontré que RUNX1 est indispensable à l'hématopoïèse fœtale puisque ces souris meurent *in utero* au stade embryonnaire E12.5 (150), et démontrent des cellules incapables de se différencier en érythrocytes fonctionnels. De plus, ces souris démontrent une absence totale de tous les progéniteurs myéloïdes et érythroïdes. Une seconde étude a démontré que les souris KO pour RUNX1 meurent entre les stades embryonnaires E11.5 et E 12.5 à cause d'hémorragies dans le système nerveux central ainsi qu'à des nécroses du tissu cérébral en l'absence de l'expression de gène RUNX1 (151).

RUNX1 est un FT qui lie sa séquence cible en recrutant de nombreux partenaires protéiques, dont Ets-1 (173), C/EBP (174), ainsi que c-Myb (175). Ces résultats expliquent l'apparition de ces nombreux complexes multibandes lors d'analyses de retard sur gel EMSA (figure 8A du chapitre 2) Cette capacité d'interactions multiples procure une qualité de plateforme de recrutement à ce FT, qui, selon le cofacteur en question ainsi que le contexte chromatinien environnant, va réguler de manière positive ou négative l'expression des gènes qui sont sous son contrôle.

Des mutations monoalléliques (mutations ponctuelles, des délétions dans le domaine Runt...) du gène RUNX1 dans les lignées germinales sont suffisantes à créer des prédispositions pour des leucémies myéloïdes aiguës (152, 153-155).

RUNX2, quant à lui, interagit avec plusieurs protéines tels que le récepteur aux androgènes, la cycline B1, et de nombreuses protéines SMADS («SMA ans MAD related protein») (134) (Figure 13). RUNX2 est une protéine essentielle au bon déroulement de l'ostéogénèse (156, 157).

Des mutations monoalléliques dans le domaine Runt de RUNX2 mènent à une maladie des os nommée dysplasie cléidocrânienne (158). L'amplification de la région chromosomique 6p21 contenant RUNX2 est un réarrangement retrouvé dans plusieurs formes d'ostéosarcomes (159) et pourrait donc être l'une des étapes précoces du développement de cette maladie (160). De plus, la surexpression de RUNX2 est associée à un mauvais pronostic de réponse au traitement par chimiothérapie de ce type de cancer (161).

Les protéines Notch ainsi que différentes HDACs ont été identifiées en tant que partenaires d'interaction du facteur RUNX3 (134) (Figure 13). Plusieurs études ont démontré que l'isoforme RUNX3 joue un rôle dans la neurogénèse (162, 163), la différenciation des lymphocytes dans le thymus (164, 165), ainsi que le contrôle de la prolifération et de l'apoptose des cellules de l'épithélium gastrique, dont la dérégulation peut mener à des cancers gastriques (166).

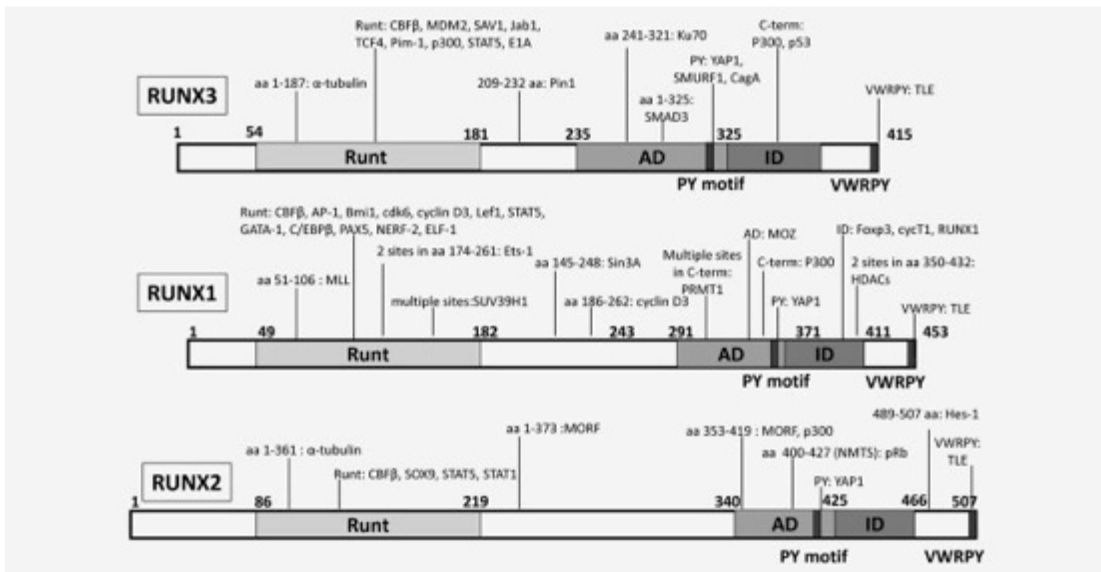


Figure 13 : Protéines interagissant avec les membres de la famille de facteurs de transcription RUNX. Certains cofacteurs ont été identifiés chez la souris dont les protéines ont une très forte homologie aux isoformes humains. AD : Domaine d'activation, ID : Domaine d'inhibition, NMTS : Séquence d'adressage à la matrice nucléaire. Figure tirée de (134).

La région chromosomique où se situe RUNX3 (1p36–35) est fréquemment délétée dans de multiples formes de cancers tels que le cancer de la vessie (167), le cancer des poumons (168), ainsi que les cancers gastriques (169, 170). Les mutations ponctuelles de RUNX3 sont relativement rares, deux d'entre elles ayant été identifiées dans le cancer de la vessie (171). RUNX3 semble jouer le rôle de suppresseur de tumeurs dans le cas du cancer gastrique (172).

Lors de notre étude, nous nous sommes assuré que nos lignées de MU expriment bien le FT RUNX1 par des analyses sur biopuce à ADN (figure 8C ; chapitre 2), où il s'est avéré que toutes nos lignées expriment RUNX1, alors que la lignée T108 est celle qui exprime les niveaux les plus faibles de ce FT. Ces résultats ont été confirmés par qPCR (figure 8D du chapitre 2). Un profil d'expression semblable est retrouvé au niveau protéique par des analyses en immunobuvargade de type Western : T108 s'avère ainsi la lignée qui exprime le moins le facteur de transcription RUNX1 (figure 8E du chapitre 2).

La destruction du site de liaison du FT RUNX1 dans la région Silencer-distal du gène HTR2B par mutagenèse dirigée des trois résidus guanine indispensables à sa liaison augmente considérablement le niveau d'expression de notre gène rapporteur (figure 8F du chapitre 2), suggérant un rôle de régulateur négatif pour le FT RUNX1 dans le contexte de notre étude.

Une analyse de compétition en retard sur gel EMSA a été réalisée afin d'identifier certains partenaires présents dans les complexes protéiques établis par RUNX1. Ainsi, l'ajout d'un oligonucléotide non-marqué portant la séquence à haute affinité pour le FT AP-1 a diminué environ de moitié le signal normalement produit par RUNX1, suggérant qu'une interaction RUNX1-AP-1 puisse expliquer la formation de certains des complexes multi-bandes observés en retard sur gel EMSA (figure 8B du chapitre 2).

Cette observation a déjà été rapportée dans la littérature (176, 177, 178), l'interaction entre RUNX1 et AP-1 offre l'opportunité à de multiples possibilités régulatrices. Lors de la différenciation mégacaryocytaire RUNX1 recrute AP-1 à des sites où le motif de liaison du FT AP-1 sont absents, de même, AP-1 recrute RUNX1 à des sites où les motifs de reconnaissance de RUNX1 sont absents, ce qui potentialise et rend possible des régulations par ces FTs sur de nouvelles régions géniques. De plus, lors de notre étude, trois sites de liaisons potentiels pour le FT AP-1 (figure 2A du chapitre 2) ont été identifiés à proximité du site de liaison du FT RUNX1 dans le silencer distal aux positions suivantes -1225/-1219 (5'-TGcCTCA-3'), -1074/-1068 (5'-aGACTCA-3') and -1021/-1015 (5'-TGAGcCA-3'), ce qui augmente la probabilité d'une coopération entre ces deux FTs.

Le facteur de transcription RUNX1 présente beaucoup d'intérêt puisque la dérégulation de ce FT a été rapportée dans de nombreux types de cancers chez l'humain autres que la leucémie (181), le cancer colorectal (182), le cancer de la prostate (183), le cancer de l'ovaire (184) ainsi que le cancer de la peau (185).

4. Conclusion et perspectives

En dépit du fait que le mélanome uvéal soit la tumeur intraoculaire la plus fréquente chez la population adulte et qu'il s'agisse d'une forme de cancer très agressive puisque dans plus de la moitié des cas, il évoluera en une maladie métastatique mortelle, aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à l'étude de la régulation génique du gène HTR2B humain, dont la surexpression demeure l'indice le plus fiable d'évoluer vers la maladie métastatique selon la signature définie par l'équipe du Dr. W. Harbour en 2010. Il s'agit donc de l'objectif principal de notre étude : décortiquer le mode de régulation du gène HTR2B humain dans nos lignées de mélanome uvéal afin de mieux comprendre d'où provient cette aberration d'expression génique, signe d'une évolution vers une forme métastatique du mélanome uvéal.

En effet, l'analyse sur biopuces à ADN des différents FTs identifiés comme pouvant participer à l'expression du gène HTR2B dans cette étude au sein de nos lignées MU à hauts ou à bas niveaux d'expression du gène HTR2B nous démontrent des perturbations importantes dans les niveaux d'expression de certains de ces facteurs. Ce travail s'est basé sur l'hypothèse selon laquelle cette aberration d'expression du gène HTR2B humain dans les lignées métastatiques peut être expliquée par des niveaux d'expression modifiés des facteurs de transcriptions qui modulent l'expression du gène HTR2B et/ou à une modification de leur capacité à réguler ce gène.

Cette étude est une amorce dans l'étude de la régulation génique du gène HTR2B humain dans le cadre du mélanome uvéal et vise à expliquer moléculairement les éléments qui peuvent expliquer une telle surexpression du gène HTR2B dans les lignées métastatiques du mélanome uvéal.

L'expression du gène HTR2B est gouvernée en grande partie par les FTs qui en modulent l'expression. Parmi ces derniers, les FTs de la famille NFI semblent jouer un rôle d'activateurs de la transcription du gène HTR2B. À l'inverse, RUNX1 semble jouer un rôle de répresseur de la transcription de ce gène.

Ce FT est très intéressant car il agit comme une vraie plateforme de recrutement de plusieurs partenaires protéiques afin de moduler l'expression génique. De plus, il est dérégulé dans de nombreux types de cancers tel que les cas de leucémies, d'où son second nom AML-1 « Acute Myeloid Leukemia 1 protein ». Ainsi, travailler sur ces FTs représente non seulement un intérêt pour le mélanome uvéal, où ils jouent un rôle majeur, mais aussi pour d'autres types de cancers et de maladies, où ils subissent des dérégulations.

Ce travail ne représente que le premier pas dans l'étude de la régulation de ce gène. Il nous apparaît évident que d'autres FTs participent à cette régulation, soit d'une manière directe ou indirecte, en agissant comme plateforme de recrutement pour d'autres cofacteurs. Par ailleurs, il est probable que des éléments plus distaux dans le génome interviennent également dans la régulation d'expression de ce gène, tels que des LCR ('Locus control regions') ou des isolateurs (186, 187), en plus des modifications épigénétiques qui s'opèrent sur le gène HTR2B, et ce, sur toute la longueur du promoteur.

De ce fait, de nombreuses perspectives s'offrent à un tel projet. L'étude du facteur de transcription RUNX1 a été réalisée pour le moment uniquement au sein de la lignée T108 qui s'est avérée être un excellent outil de transfection. Cependant, cette lignée exprime des niveaux bas de RUNX1. Il serait alors utile de compléter l'étude du mutant RUNX1 dans les lignées présentant des niveaux élevés de RUNX1 (T97, T142, T143) où la mutation de ce site de liaison devrait avoir un impact plus important sur la régulation de ce gène.

Cette expérience de transfection est présentement en cours et sera réalisée par électroporation des plasmides d'intérêt à l'aide du *Neon* (*Neon Transfection System*; Invitrogen), une technique plus efficace pour ces lignées qui sont réfractaires à la méthode de transfection à la lipofectamine, contrairement à la lignée T108.

L'utilisation de la technique d'interférence à l'ARN est une méthode de choix afin de valider l'importance de la régulation de l'expression du gène HTR2B par les FTs NFI et RUNX1. Cette approche consisterait à créer des shRNAs dirigés contre les transcrits des différents isoformes NFI ainsi que l'ARNm RUNX1 et à les introduire dans nos lignées de MU en les infectant à l'aide de vecteurs lentiviraux qui les encodent, ce qui nous permettrait de vérifier quel impact entrainerait l'extinction de ces FTs sur l'expression de notre gène rapporteur.

Bien que plus onéreuse, la technologie CRISPR-Cas 9 pourrait s'avérer être très utile, dans la mesure où elle permettrait d'éteindre l'expression des différents FTs que l'on étudie *in vivo*, de manière stable, afin d'évaluer l'impact sur l'expression de notre gène d'intérêt dans nos lignées de MU.

Par ailleurs, l'identification du site réel d'initiation de la transcription constitue un aspect intéressant à explorer pour compléter l'étude du promoteur du gène HTR2B humain. Bien que cette information 'théorique' soit disponible sur de nombreuses banques de données, il serait tout de même intéressant de confirmer ces données par des approches plus classiques telles que la technique d'extension d'amorces (188) et le RACE (Rapid amplification of cDNA ends) (189).

Ainsi, comprendre le mode de régulation d'un gène d'une telle importance nous permettra, à plus long terme, de moduler son expression en le ciblant thérapeutiquement selon qu'on veuille le stimuler (dans les cancers où il joue le rôle de suppresseur de tumeurs) ou l'inhiber (dans les cas où il accomplit le rôle d'oncogène) entre autre par des molécules chimiques. Le but ultime d'un tel traitement consistant à faire basculer la signature génique présentée par les patients à haut risque d'évoluer vers la maladie métastatique (classe 2) vers une signature de classe 1 à faible probabilité de métastases, ce qui pourrait permettre de contourner l'agressivité d'un tel cancer.

Bibliographie

1. Shields. Intraocular tumors: a text and atlas. 1992.
2. Albert DM, Niffenegger AS, Willson JK. Treatment of metastatic uveal melanoma: review and recommendations. *Surv Ophthalmol.* 1992;36(6):429-38.
3. Borthwick NJ, Thombs J, Polak M, Gabriel FG, Hungerford JL, Damato B, et al. The biology of micrometastases from uveal melanoma. *J Clin Pathol.*64(8):666-71.
4. Lorigan JG, Wallace S, Mavligit GM. The prevalence and location of metastases from ocular melanoma: imaging study in 110 patients. *AJR Am J Roentgenol.* 1991;157(6):1279-81.
5. Sumich P, Mitchell P, Wang JJ. Choroidal nevi in a white population: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol.* 1998;116(5):645-50.
6. Shields CL, Shields JA, Kiratli H, De Potter P, Cater JR. Risk factors for growth and metastasis of small choroidal melanocytic lesions. *Ophthalmology.* 1995;102(9):1351-61.
7. Dessert S. Le mélanome de l'oeil, de la recherche de pointe aux traitements innovants à l'institut Curie. Dossier de presse. 2009.
8. Marieb EN. Human anatomy and physiology. 2010.
9. McBee JK, Palczewski K, Baehr W, Pepperberg DR. Confronting complexity: the interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina. *Progress in retinal and eye research.* 2001;20(4):469-529.
10. Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. *Progress in retinal and eye research.*29(2):144-68.
11. Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. The melanocyte lineage in development and disease. *Development.* 2015;142(7):1387.
12. Delevoye C, Giordano F, van Niel G, Raposo G. [Biogenesis of melanosomes - the chessboard of pigmentation]. *Medecine sciences : M/S.* 2011;27(2):153-62.
13. Riley PA. Radicals in melanin biochemistry. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1988;551:111-9; discussion 9-20.
14. Hach P, Borovansky J, Vedralova E. Melanosome--a sophisticated organelle. *Sb Lek.* 1993;94(2):113-23.

15. Vancoillie G, Lambert J, Nayaert JM. Melanocyte biology and its implications for the clinician. *European journal of dermatology : EJD*. 1999;9(3):241-51.
16. Hearing VJ, Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1991;5(14):2902-9.
17. Boissy RE. The melanocyte. Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes, and hair. *Dermatologic clinics*. 1988;6(2):161-73.
18. Mims JL III SJ. Follow up studies of suspicious choroidal naevi. *Ophthalmology*. 197;85:929-43.
19. Negrier S, Fervers B, Bailly C, Beckendorf V, Cupissol D, Dore JF, et al. Cutaneous melanoma. *Br J Cancer*. 2001;84 Suppl 2:81-5.
20. Shields CL, Furuta M, Mashayekhi A, Berman EL, Zahler JD, Hoberman DM, et al. Clinical spectrum of choroidal nevi based on age at presentation in 3422 consecutive eyes. *Ophthalmology*. 2008;115(3):546-52 e2.
21. al SAe. *Ophthalmology*. 2005;112(10):1784-1789.
22. Kivelä T ES. *Ophthalmology*. 2006;113(5):887-888.
23. Schwartz LH, Ferrand R, Boelle PY, Maylin C, D'Hermies F, Virmont J. Lack of correlation between the location of choroidal melanoma and ultraviolet-radiation dose distribution. *Radiat Res*. 1997;147(4):451-6.
24. Singh AD, Borden EC. Metastatic uveal melanoma. *Ophthalmol Clin North Am*. 2005;18(1):143-50, ix.
25. Spagnolo F, Caltabiano G, Queirolo P. Uveal melanoma. *Cancer Treat Rev*. 38(5):549-53.
26. Egan KM, Seddon JM, Glynn RJ, Gragoudas ES, Albert DM. Epidemiologic aspects of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol*. 1988;32(4):239-51.
27. Kincaid MC. Uveal Melanoma. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 1998;5(4):299-309.
28. Eskelin S, Pyrhonen S, Summanen P, Hahka-Kemppinen M, Kivela T. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment. *Ophthalmology*. 2000;107(8):1443-9.
29. Manschot WA, van Strik R. Uveal melanoma: therapeutic consequences of doubling times and irradiation results; a review. *Int Ophthalmol*. 1992;16(2):91-9.

30. Henderson E, Margo CE. Iris melanoma. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2008;132(2):268-72.
31. McCartney AC. Pathology of ocular melanomas. *British medical bulletin*. 1995;51(3):678-93.
32. Tasman W. JEA. Tumors of the uveal Tract. 2013.
33. Augsburger JJ, Gamel JW. Clinical prognostic factors in patients with posterior uveal malignant melanoma. *Cancer*. 1990;66(7):1596-600.
34. Guenel P, Laforest L, Cyr D, Fevotte J, Sabroe S, Dufour C, et al. Occupational risk factors, ultraviolet radiation, and ocular melanoma: a case-control study in France. *Cancer Causes Control*. 2001;12(5):451-9.
35. Moan J, Porojnicu AC, Dahlback A. Ultraviolet radiation and malignant melanoma. *Advances in experimental medicine and biology*. 2008;624:104-16.
36. Young LH, Egan KM, Walsh SM, Gragoudas ES. Familial uveal melanoma. *American journal of ophthalmology*. 1994;117(4):516-20.
37. Prescher G, Bornfeld N, Hirche H, Horsthemke B, Jockel KH, Becher R. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet*. 1996;347(9010):1222-5.
38. Scholes AG, Damato BE, Nunn J, Hiscott P, Grierson I, Field JK. Monosomy 3 in uveal melanoma: correlation with clinical and histologic predictors of survival. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(3):1008-11.
39. Kilic E, van Gils W, Lodder E, Beverloo HB, van Til ME, Mooy CM, et al. Clinical and cytogenetic analyses in uveal melanoma. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006;47(9):3703-7.
40. Landreville S, Agapova OA, Harbour JW. Emerging insights into the molecular pathogenesis of uveal melanoma. *Future oncology*. 2008;4(5):629-36.
41. Singh AD, Shields CL, Shields JA. Prognostic factors in uveal melanoma. *Melanoma Res*. 2001;11(3):255-63.
42. Seddon JM, Albert DM, Lavin PT, Robinson N. A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma. *Arch Ophthalmol*. 1983;101(12):1894-9.
43. Bechrakis NE, Sehu KW, Lee WR, Damato BE, Foerster MH. Transformation of cell type in uveal melanomas: a quantitative histologic analysis. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(10):1406-12.

44. Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, Duan S, Cao L, Worley LA, et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science*.330(6009):1410-3.
45. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med*.363(23):2191-9.
46. Harbour JW, Chao DL. A molecular revolution in uveal melanoma: implications for patient care and targeted therapy. *Ophthalmology*.121(6):1281-8.
47. Patel M, Smyth E, Chapman PB, Wolchok JD, Schwartz GK, Abramson DH, et al. Therapeutic implications of the emerging molecular biology of uveal melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.17(8):2087-100.
48. Martin M, Masshofer L, Temming P, Rahmann S, Metz C, Bornfeld N, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. *Nat Genet*.45(8):933-6.
49. Onken MD, Worley LA, Tuscan MD, Harbour JW. An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma. *J Mol Diagn*.12(4):461-8.
50. WH. S. Philadelphia: WB Saunders Compagny. 1986.
51. Dithmar S, Diaz CE, Grossniklaus HE. Intraocular melanoma spread to regional lymph nodes: report of two cases. *Retina*. 2000;20(1):76-9.
52. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011;331(6024):1559-64.
53. Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Dormancy of metastatic melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 2010;23(1):41-56.
54. Samarasinghe B. *The Hallmarks of Cancer 6: Tissue Invasion and Metastasis*. 2013.
55. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*. 1991;64(2):235-48.
56. Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiological reviews*. 2003;83(2):337-76.
57. Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. *Current opinion in genetics & development*. 2008;18(1):48-53.
58. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991;251(5000):1451-5.

59. Wehrle-Haller B. The Role of Integrins in Cell Migration. Madame Curie Bioscience Database [Internet]. 2013.
60. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69(1):11-25.
61. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(29):21785-8.
62. Woodward JK RI, Elshaw SR, Burn JL, Sisley K. Invasive and noninvasive uveal melanomas have different adhesive properties. *Eye*. 2005;19:342-8.
63. Elshaw SR, Sisley K, Cross N, Murray AK, MacNeil SM, Wagner M, et al. A comparison of ocular melanocyte and uveal melanoma cell invasion and the implication of alpha1beta1, alpha4beta1 and alpha6beta1 integrins. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(6):732-8.
64. Larouche N, Larouche K, Beliveau A, Leclerc S, Salesse C, Pelletier G, et al. Transcriptional regulation of the alpha 4 integrin subunit gene in the metastatic spread of uveal melanoma. *Anticancer research*. 1998;18(5A):3539-47.
65. Weiss L, Schmid-Schonbein GW. Biomechanical interactions of cancer cells with the microvasculature during metastasis. *Cell biophysics*. 1989;14(2):187-215.
66. Fingleton B. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2006;11:479-91.
67. Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nature reviews Drug discovery*. 2007;6(6):480-98.
68. van der Velden PA, Zuidervaart W, Hurks MH, Pavey S, Ksander BR, Krijgsman E, et al. Expression profiling reveals that methylation of TIMP3 is involved in uveal melanoma development. *International journal of cancer*. 2003;106(4):472-9.
69. Fokas E, Engenhardt-Cabillic R, Daniilidis K, Rose F, An HX. Metastasis: the seed and soil theory gains identity. *Cancer metastasis reviews*. 2007;26(3-4):705-15.
70. Fidler IJ. Melanoma Metastasis. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*. 1995;2(5):398-404.
71. Cunningham ET, et al. Uveal tract and sclera. *Asbury's General Ophthalmology* 18e. 2011.

72. Cancer SCd. Cancer de l'oeil. 2015.
73. Cancer SCd. Cancer de l'oeil: Traitement du cancer de l'oeil. 2015.
74. Augsburger JJ, Correa ZM, Shaikh AH. Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma. American journal of ophthalmology. 2009;148(1):119-27.
75. Medecine USo. Department of radiation oncology, treatment options. 2016.
76. Peper L. VUMC offers brachytherapy to treat eye tumors. 2016.
77. Zimmerman LE, McLean IW, Foster WD. Does enucleation of the eye containing a malignant melanoma prevent or accelerate the dissemination of tumour cells. The British journal of ophthalmology. 1978;62(6):420-5.
78. Damato B. Does ocular treatment of uveal melanoma influence survival? British journal of cancer. 2010;103(3):285-90.
79. Mariani P, Piperno-Neumann S, Servois V, Berry MG, Dorval T, Plancher C, et al. Surgical management of liver metastases from uveal melanoma: 16 years' experience at the Institut Curie. Eur J Surg Oncol. 2009;35(11):1192-7.
80. Buder K, Gesierich A, Gelbrich G, Goebeler M. Systemic treatment of metastatic uveal melanoma: review of literature and future perspectives. Cancer medicine. 2013;2(5):674-86.
81. Woodman SE. Metastatic uveal melanoma: biology and emerging treatments. Cancer J.18(2):148-52.
82. Landreville S, Agapova OA, Matatall KA, Kneass ZT, Onken MD, Lee RS, et al. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and differentiation in uveal melanoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2012;18(2):408-16.
83. Mittal R, Debs LH, Patel AP, Nguyen D, Patel K, O'Connor G, et al. Neurotransmitters: The Critical Modulators Regulating Gut-Brain Axis. Journal of cellular physiology. 2016.
84. Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. Pharmacol Ther. 2001;92(2-3):179-212.
85. Banes AK, Shaw SM, Tawfik A, Patel BP, Oghi S, Fulton D, et al. Activation of the JAK/STAT pathway in vascular smooth muscle by serotonin. American journal of physiology Cell physiology. 2005;288(4):C805-12.

86. Choi DS, Ward SJ, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L. 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development*. 1997;124(9):1745-55.
87. Nebigil CG, Etienne N, Messaddeq N, Maroteaux L. Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT_{2B} receptor signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(10):1373-5.
88. Soll C, Jang JH, Riener MO, Moritz W, Wild PJ, Graf R, et al. Serotonin promotes tumor growth in human hepatocellular cancer. *Hepatology*. 51(4):1244-54.
89. Fernandez-Ranvier GG, Weng J, Yeh RF, Khanafshar E, Suh I, Barker C, et al. Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression profiling. *Arch Surg*. 2008;143(9):841-6; discussion 6.
90. Dizeyi N, Bjartell A, Hedlund P, Tasken KA, Gadaleanu V, Abrahamsson PA. Expression of serotonin receptors 2B and 4 in human prostate cancer tissue and effects of their antagonists on prostate cancer cell lines. *Eur Urol*. 2005;47(6):895-900.
91. Henriksen R, Dizeyi N, Abrahamsson PA. Expression of serotonin receptors 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B} and 5-HT₄ in ovary and in ovarian tumours. *Anticancer research*. 32(4):1361-6.
92. Mouriaux F, Zaniolo K, Bergeron MA, Weidmann C, De La Fouchardiere A, Fournier F, et al. Effects of Long-term Serial Passaging on the Characteristics and Properties of Cell Lines Derived From Uveal Melanoma Primary Tumors. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(13):5288-301.
93. Rupp RA, Sippel AE. Chicken liver TGGCA protein purified by preparative mobility shift electrophoresis (PMSE) shows a 36.8 to 29.8 kd microheterogeneity. *Nucleic acids research*. 1987;15(23):9707-26.
94. Gao B, Jiang L, Kunos G. Transcriptional regulation of alpha(1b) adrenergic receptors (alpha(1b)AR) by nuclear factor 1 (NF1): a decline in the concentration of NF1 correlates with the downregulation of alpha(1b)AR gene expression in regenerating liver. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(11):5997-6008.
95. Laniel MA, Poirier GG, Guerin SL. Nuclear factor 1 interferes with Sp1 binding through a composite element on the rat poly(ADP-ribose) polymerase promoter to modulate its activity in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(23):20766-73.

96. Nakamura M, Okura T, Kitami Y, Hiwada K. Nuclear factor 1 is a negative regulator of gadd153 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2001;37(2 Pt 2):419-24.
97. Vicent GP, Zaurin R, Nacht AS, Font-Mateu J, Le Dily F, Beato M. Nuclear factor 1 synergizes with progesterone receptor on the mouse mammary tumor virus promoter wrapped around a histone H3/H4 tetramer by facilitating access to the central hormone-responsive elements. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(4):2622-31.
98. Wang H, Wu D, Wang X, Chen G, Zhang Y, Yan W, et al. Hepatitis B virus surface protein-induced hPIAS1 transcription requires TAL1, E47, MYOG, NFI, and MAPK signal pathways. *Biological chemistry*. 2016;397(11):1173-85.
99. Eskild W, Simard J, Hansson V, Guerin SL. Binding of a member of the NF1 family of transcription factors to two distinct cis-acting elements in the promoter and 5'-flanking region of the human cellular retinol binding protein 1 gene. *Molecular endocrinology*. 1994;8(6):732-45.
100. Gronostajski RM. Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene*. 2000;249(1-2):31-45.
101. Inoue T, Tamura T, Furuichi T, Mikoshiba K. Isolation of complementary DNAs encoding a cerebellum-enriched nuclear factor I family that activates transcription from the mouse myelin basic protein promoter. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(31):19065-70.
102. Bachurski CJ, Kelly SE, Glasser SW, Currier TA. Nuclear factor I family members regulate the transcription of surfactant protein-C. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(52):32759-66.
103. Jackson DA, Rowader KE, Stevens K, Jiang C, Milos P, Zaret KS. Modulation of liver-specific transcription by interactions between hepatocyte nuclear factor 3 and nuclear factor 1 binding DNA in close apposition. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(4):2401-10.
104. Xu H, Uno JK, Inouye M, Collins JF, Ghishan FK. NF1 transcriptional factor(s) is required for basal promoter activation of the human intestinal NaPi-IIb cotransporter gene. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2005;288(2):G175-81.
105. Murtagh J, Martin F, Gronostajski RM. The Nuclear Factor I (NFI) gene family in mammary gland development and function. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2003;8(2):241-54.
106. Artlett CM, Chen SJ, Varga J, Jimenez SA. Modulation of basal expression of the human alpha1(I) procollagen gene (COL1A1) by tandem NF-1/Sp1

- promoter elements in normal human dermal fibroblasts. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 1998;17(6):425-34.
107. Rupp RA, Kruse U, Multhaup G, Gobel U, Beyreuther K, Sippel AE. Chicken NFI/TGGCA proteins are encoded by at least three independent genes: NFI-A, NFI-B and NFI-C with homologues in mammalian genomes. *Nucleic acids research*. 1990;18(9):2607-16.
 108. Qian F, Kruse U, Lichter P, Sippel AE. Chromosomal localization of the four genes (NFIA, B, C, and X) for the human transcription factor nuclear factor I by FISH. *Genomics*. 1995;28(1):66-73.
 109. Chaudhry AZ, Vitullo AD, Gronostajski RM. Nuclear factor I (NFI) isoforms differentially activate simple versus complex NFI-responsive promoters. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(29):18538-46.
 110. Kruse U, Sippel AE. The genes for transcription factor nuclear factor I give rise to corresponding splice variants between vertebrate species. *Journal of molecular biology*. 1994;238(5):860-5.
 111. Chaudhry AZ, Lyons GE, Gronostajski RM. Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1997;208(3):313-25.
 112. Gounari F, De Francesco R, Schmitt J, van der Vliet P, Cortese R, Stunnenberg H. Amino-terminal domain of NF1 binds to DNA as a dimer and activates adenovirus DNA replication. *The EMBO journal*. 1990;9(2):559-66.
 113. Grunder A, Qian F, Ebel TT, Mincheva A, Lichter P, Kruse U, et al. Genomic organization, splice products and mouse chromosomal localization of genes for transcription factor Nuclear Factor One. *Gene*. 2003;304:171-81.
 114. Meisterernst M, Rogge L, Foeckler R, Karaghiosoff M, Winnacker EL. Structural and functional organization of a porcine gene coding for nuclear factor I. *Biochemistry*. 1989;28(20):8191-200.
 115. Mermod N, O'Neill EA, Kelly TJ, Tjian R. The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell*. 1989;58(4):741-53.
 116. Dusserre Y, Mermod N. Purified cofactors and histone H1 mediate transcriptional regulation by CTF/NF-I. *Molecular and cellular biology*. 1992;12(11):5228-37.
 117. Gronostajski RM. Analysis of nuclear factor I binding to DNA using degenerate oligonucleotides. *Nucleic acids research*. 1986;14(22):9117-32.

118. Gingras ME, Masson-Gadais B, Zaniolo K, Leclerc S, Drouin R, Germain L, et al. Differential binding of the transcription factors Sp1, AP-1, and NF1 to the promoter of the human alpha5 integrin gene dictates its transcriptional activity. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(1):57-67.
119. Nagase T, Kikuno R, Ishikawa KI, Hirosawa M, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVI. The complete sequences of 150 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. 2000;7(1):65-73.
120. Lu W, Quintero-Rivera F, Fan Y, Alkuraya FS, Donovan DJ, Xi Q, et al. NF1A haploinsufficiency is associated with a CNS malformation syndrome and urinary tract defects. *PLoS genetics*. 2007;3(5):e80.
121. Steele-Perkins G, Plachez C, Butz KG, Yang G, Bachurski CJ, Kinsman SL, et al. The transcription factor gene Nfib is essential for both lung maturation and brain development. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(2):685-98.
122. Steele-Perkins G, Butz KG, Lyons GE, Zeichner-David M, Kim HJ, Cho MI, et al. Essential role for NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(3):1075-84.
123. Driller K, Pagenstecher A, Uhl M, Omran H, Berlis A, Grunder A, et al. Nuclear factor I X deficiency causes brain malformation and severe skeletal defects. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(10):3855-67.
124. Hong I, Kim YS, Choi SG. Simple purification of human antimicrobial peptide dermcidin (MDCD-1L) by intein-mediated expression in E.coli. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2010;20(2):350-5.
125. Manconi B, Cabras T, Vitali A, Fanali C, Fiorita A, Inzitari R, et al. Expression, purification, phosphorylation and characterization of recombinant human statherin. *Protein expression and purification*. 2010;69(2):219-25.
126. Ito Y, Bae SC, Chuang LS. The RUNX family: developmental regulators in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2015;15(2):81-95.
127. Ito Y. RUNX genes in development and cancer: regulation of viral gene expression and the discovery of RUNX family genes. *Advances in cancer research*. 2008;99:33-76.
128. Yu M, Mazor T, Huang H, Huang HT, Kathrein KL, Woo AJ, et al. Direct recruitment of polycomb repressive complex 1 to chromatin by core binding transcription factors. *Molecular cell*. 2012;45(3):330-43.
129. Westendorf JJ, Zaidi SK, Cascino JE, Kahler R, van Wijnen AJ, Lian JB, et al. Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and

- represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(22):7982-92.
130. Guo H, Friedman AD. Phosphorylation of RUNX1 by cyclin-dependent kinase reduces direct interaction with HDAC1 and HDAC3. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(1):208-15.
 131. Aikawa Y, Nguyen LA, Isono K, Takakura N, Tagata Y, Schmitz ML, et al. Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation. *The EMBO journal*. 2006;25(17):3955-65.
 132. Wee HJ, Voon DC, Bae SC, Ito Y. PEBP2-beta/CBF-beta-dependent phosphorylation of RUNX1 and p300 by HIPK2: implications for leukemogenesis. *Blood*. 2008;112(9):3777-87.
 133. Levanon D, Groner Y. Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene*. 2004;23(24):4211-9.
 134. Chuang LS, Ito K, Ito Y. RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins. *International journal of cancer*. 2013;132(6):1260-71.
 135. Bae SC, Ogawa E, Maruyama M, Oka H, Satake M, Shigesada K, et al. PEBP2 alpha B/mouse AML1 consists of multiple isoforms that possess differential transactivation potentials. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(5):3242-52.
 136. Bae SC, Takahashi E, Zhang YW, Ogawa E, Shigesada K, Namba Y, et al. Cloning, mapping and expression of PEBP2 alpha C, a third gene encoding the mammalian Runt domain. *Gene*. 1995;159(2):245-8.
 137. Calabi F, Rhodes M, Williamson P, Boyd Y. Identification and chromosomal mapping of a third mouse runt-like locus. *Genomics*. 1995;26(3):607-10.
 138. Coffman JA. Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. *Cell biology international*. 2003;27(4):315-24.
 139. Yoshimi M, Goyama S, Kawazu M, Nakagawa M, Ichikawa M, Imai Y, et al. Multiple phosphorylation sites are important for RUNX1 activity in early hematopoiesis and T-cell differentiation. *European journal of immunology*. 2012;42(4):1044-50.
 140. The human protein atlas.
 141. Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K, Ohki M. Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *The EMBO journal*. 1998;17(11):2994-3004.

142. Imai Y, Kurokawa M, Tanaka K, Friedman AD, Ogawa S, Mitani K, et al. TLE, the human homolog of groucho, interacts with AML1 and acts as a repressor of AML1-induced transactivation. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;252(3):582-9.
143. Yamagata T, Maki K, Mitani K. Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis. *International journal of hematology*. 2005;82(1):1-8.
144. Takahashi S, Harigae H, Kameoka J, Sasaki T, Kaku M. AML1B transcriptional repressor function is impaired by the Flt3-internal tandem duplication. *British journal of haematology*. 2005;130(3):428-36.
145. Philipot O, Joliot V, Ait-Mohamed O, Pellentz C, Robin P, Fritsch L, et al. The core binding factor CBF negatively regulates skeletal muscle terminal differentiation. *PloS one*. 2010;5(2):e9425.
146. Shang Y, Zhao X, Xu X, Xin H, Li X, Zhai Y, et al. CHIP functions an E3 ubiquitin ligase of Runx1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;386(1):242-6.
147. Ellis MJ, Ding L, Shen D, Luo J, Suman VJ, Wallis JW, et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature*. 2012;486(7403):353-60.
148. Lo Coco F, Pisegna S, Diverio D. The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias. *Haematologica*. 1997;82(3):364-70.
149. Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, et al. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic acids research*. 1995;23(14):2762-9.
150. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*. 1996;84(2):321-30.
151. Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(8):3444-9.
152. Mangan JK, Speck NA. RUNX1 mutations in clonal myeloid disorders: from conventional cytogenetics to next generation sequencing, a story 40 years in the making. *Critical reviews in oncogenesis*. 2011;16(1-2):77-91.
153. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufirin D, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with

- propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nature genetics*. 1999;23(2):166-75.
154. Matheny CJ, Speck ME, Cushing PR, Zhou Y, Corpora T, Regan M, et al. Disease mutations in RUNX1 and RUNX2 create nonfunctional, dominant-negative, or hypomorphic alleles. *The EMBO journal*. 2007;26(4):1163-75.
 155. Osato M, Asou N, Abdalla E, Hoshino K, Yamasaki H, Okubo T, et al. Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. *Blood*. 1999;93(6):1817-24.
 156. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997;89(5):755-64.
 157. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997;89(5):765-71.
 158. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, et al. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*. 1997;89(5):773-9.
 159. Lau CC, Harris CP, Lu XY, Perlaky L, Gogineni S, Chintagumpala M, et al. Frequent amplification and rearrangement of chromosomal bands 6p12-p21 and 17p11.2 in osteosarcoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 2004;39(1):11-21.
 160. Martin JW, Zielenska M, Stein GS, van Wijnen AJ, Squire JA. The Role of RUNX2 in Osteosarcoma Oncogenesis. *Sarcoma*. 2011;2011:282745.
 161. Sadikovic B, Thorner P, Chilton-Macneill S, Martin JW, Cervigne NK, Squire J, et al. Expression analysis of genes associated with human osteosarcoma tumors shows correlation of RUNX2 overexpression with poor response to chemotherapy. *BMC cancer*. 2010;10:202.
 162. Inoue K, Ozaki S, Shiga T, Ito K, Masuda T, Okado N, et al. Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nature neuroscience*. 2002;5(10):946-54.
 163. Levanon D, Bettoun D, Harris-Cerruti C, Woolf E, Negreanu V, Eilam R, et al. The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *The EMBO journal*. 2002;21(13):3454-63.
 164. Taniuchi I, Osato M, Egawa T, Sunshine MJ, Bae SC, Komori T, et al. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell*. 2002;111(5):621-33.

165. Woolf E, Xiao C, Fainaru O, Lotem J, Rosen D, Negreanu V, et al. Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(13):7731-6.
166. Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*. 2002;109(1):113-24.
167. Matsumoto H, Matsuyama H, Fukunaga K, Yoshihiro S, Wada T, Naito K. Allelic imbalance at 1p36 may predict prognosis of chemoradiation therapy for bladder preservation in patients with invasive bladder cancer. *British journal of cancer*. 2004;91(6):1025-31.
168. Nomoto S, Haruki N, Tatematsu Y, Konishi H, Mitsudomi T, Takahashi T, et al. Frequent allelic imbalance suggests involvement of a tumor suppressor gene at 1p36 in the pathogenesis of human lung cancers. *Genes, chromosomes & cancer*. 2000;28(3):342-6.
169. Ezaki T, Yanagisawa A, Ohta K, Aiso S, Watanabe M, Hibi T, et al. Deletion mapping on chromosome 1p in well-differentiated gastric cancer. *British journal of cancer*. 1996;73(4):424-8.
170. Schwab M, Praml C, Amler LC. Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes, chromosomes & cancer*. 1996;16(4):211-29.
171. Kim WJ, Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Li QL, et al. RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors. *Cancer research*. 2005;65(20):9347-54.
172. Ito Y. Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. *Oncogene*. 2004;23(24):4198-208.
173. Kim WY, Sieweke M, Ogawa E, Wee HJ, Englmeier U, Graf T, et al. Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *The EMBO journal*. 1999;18(6):1609-20.
174. Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, Rhoades KL, Larson CJ, Chen HM, et al. CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF alpha2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(3):1231-40.
175. Hernandez-Munain C KM. c-Myb and core-binding factor/PEBP2 display functional synergy but bind independently to adjacent sites in the T-cell receptor delta enhancer. *Molecular and cellular biology*. 1995;15:3090-9.

176. Pencovich N, Jaschek R, Tanay A, Groner Y. Dynamic combinatorial interactions of RUNX1 and cooperating partners regulates megakaryocytic differentiation in cell line models. *Blood*. 2011;117(1):e1-14.
177. Bertrand-Philippe M, Ruddell RG, Arthur MJ, Thomas J, Mungalsingh N, Mann DA. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene transcription by RUNX1 and RUNX2. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(23):24530-9.
178. Bowers SR, Calero-Nieto FJ, Valeaux S, Fernandez-Fuentes N, Cockerill PN. Runx1 binds as a dimeric complex to overlapping Runx1 sites within a palindromic element in the human GM-CSF enhancer. *Nucleic acids research*. 2010;38(18):6124-34.
179. Appleford PJ, Woollard A. RUNX genes find a niche in stem cell biology. *Journal of cellular biochemistry*. 2009;108(1):14-21.
180. Hoi CS, Lee SE, Lu SY, McDermitt DJ, Osorio KM, Piskun CM, et al. Runx1 directly promotes proliferation of hair follicle stem cells and epithelial tumor formation in mouse skin. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(10):2518-36.
181. Ichikawa M, Yoshimi A, Nakagawa M, Nishimoto N, Watanabe-Okochi N, Kurokawa M. A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia. *International journal of hematology*. 2013;97(6):726-34.
182. Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS, Caan BJ, Potter JD, Wolff RK. Associations between genetic variation in RUNX1, RUNX2, RUNX3, MAPK1 and eIF4E and risk of colon and rectal cancer: additional support for a TGF-beta-signaling pathway. *Carcinogenesis*. 2011;32(3):318-26.
183. Huang SP, Lan YH, Lu TL, Pao JB, Chang TY, Lee HZ, et al. Clinical significance of runt-related transcription factor 1 polymorphism in prostate cancer. *BJU international*. 2011;107(3):486-92.
184. Planaguma J, Gonzalez M, Doll A, Monge M, Gil-Moreno A, Baro T, et al. The up-regulation profiles of p21WAF1/CIP1 and RUNX1/AML1 correlate with myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *Human pathology*. 2006;37(8):1050-7.
185. Scheitz CJ, Lee TS, McDermitt DJ, Tumber T. Defining a tissue stem cell-driven Runx1/Stat3 signalling axis in epithelial cancer. *The EMBO journal*. 2012;31(21):4124-39.
186. Burgess-Beusse B, Farrell C, Gaszner M, Litt M, Mutskov V, Recillas-Targa F, et al. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99 Suppl 4:16433-7.

187. Deng W, Lee J, Wang H, Miller J, Reik A, Gregory PD, et al. Controlling long-range genomic interactions at a native locus by targeted tethering of a looping factor. *Cell*. 2012;149(6):1233-44.
188. Carey MF, Peterson CL, Smale ST. The primer extension assay. *Cold Spring Harbor protocols*. 2013;2013(2):164-73.
189. Yeku O FM. Rapid amplification of cDNA ends (RACE). *Methods Mol Biol* 2011;703:107-22. doi: 10.1007/978-1-59745-248-9_8.